

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

Influência de Diferentes Estados Nutricionais e infecção por
***Herpetomonas muscarum* no Metabolismo Redox de *Stomoxys calcitrans*,**
a mosca-dos-estábulos.

FRANCISCO RÔMULO OLIVEIRA MAGALHÃES

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTADOS NUTRICIONAIS E
INFECÇÃO POR *Herpetomonas muscarum* NO METABOLISMO
REDOX DE *Stomoxys calcitrans*, A MOSCA-DOS-ESTÁBULOS.**

FRANCISCO RÔMULO OLIVEIRA MAGALHÃES

Sob a orientação da Professora
Patrícia Fampa Negreiros Lima

e Coorientação da Professora
Daniela Cosentino Gomes

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor**, no
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica - RJ

Abril, 2024



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 1312/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.019738/2024-59

Seropédica-RJ, 17 de abril de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FRANCISCO RÔMULO OLIVEIRA MAGALHÃES

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor** em Ciências, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 18/04/2024

(Assinado digitalmente em 23/04/2024 21:44)

CLAUDIA BEZERRA DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###035#8

(Assinado digitalmente em 23/04/2024 18:59)

EMERSON GUEDES PONTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: ###553#7

(Assinado digitalmente em 18/04/2024 19:09)

PATRICIA FAMPA NEGREIROS LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matrícula: ###921#5

(Assinado digitalmente em 18/04/2024 11:57)

EVELIZE FOLLY DAS CHAGAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.717-##

(Assinado digitalmente em 23/04/2024 21:04)

ANGELA HAMPSHIRE DE CARVALHO SANTOS LOPES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.617-##

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M188i Magalhães, Francisco Rômulo Oliveira, 1984-
Influência de Diferentes Estados Nutricionais e
infecção por *Herpetomonas muscarum* no Metabolismo
Redox de *Stomoxys calcitrans*, a mosca-dos-estábulo.
/ Francisco Rômulo Oliveira Magalhães. - Seropédica -
RJ, 2024.
123 f.: il.

Orientadora: Patrícia Fampa Negreiros Lima.
Coorientadora: Daniela Cosentino Gomes.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências
Veterinárias, 2024.

1. Metabolismo Redox. 2. NADPH oxidases. 3.
Vetores Mecânicos. 4. Espécies Reativas de Oxigênio.
5. Fisiologia do Inseto. I. Lima, Patrícia Fampa
Negreiros, 1976-, orient. II. Gomes, Daniela
Cosentino, -, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em
Ciências Veterinárias. IV. Título.

Dedico este trabalho, primeiramente a Deus, que foi minha maior força nos momentos de escuridão; à minha família, cuja força e esperança reacenderam a minha própria quando mais precisei. E à educação pública, por tornar este sonho possível.
A todos, minha eterna gratidão.

"Todos que estão seriamente envolvidos na busca da ciência acabam se convencendo de que um espírito se manifesta nas leis do universo — um espírito vastamente superior ao do homem." – Albert Einstein.

BIOGRAFIA

Francisco Rômulo Oliveira Magalhães, filho de Maria do Socorro Oliveira Magalhães e Francisco Herculano Magalhães, é pai de João Victor Magalhães e de Lis Magalhães. Nasceu no município de Capanema, no estado do Pará. Biólogo graduado pela Universidade Federal do Pará, foi bolsista de Iniciação Científica (PIBIC), trabalhando na área de parasitologia durante sua graduação. Nesse período, realizou trabalhos em parceria com a Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), desenvolvendo estudos sobre ectoparasitas.

Concluiu seu mestrado também na Universidade Federal do Pará, no Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, com o projeto intitulado “Aplicação de PCR para detecção de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em amostras de frango obtidas em mercados municipais da microrregião do estado do Pará”, sob a orientação da Prof^ª. Dra. Talita Roos. Durante o mestrado, realizou estágio nas áreas de biologia molecular e microbiologia de alimentos.

Em 2020, foi aprovado no processo seletivo para doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, orientado pelas Dras. Patrícia Fampa e Daniela Consetino. Alternou suas pesquisas entre o Laboratório de Parasitos e Vetores e o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes e foi contemplado com uma bolsa integral de pesquisa concedida pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Em 2023, recebeu a bolsa “Doutorado Nota 10”, disponibilizada pela FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), que se estendeu até o final do curso. Durante sua trajetória acadêmica, participou de grupos de pesquisa, desenvolveu estudos, apresentou trabalhos em congressos, simpósios e cursos de aperfeiçoamento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado forças, mesmo quando eu achava não ter mais nenhuma. Agradeço à minha família, em especial à minha esposa Kamila, que me fez ver a luz nos momentos mais obscuros e por ser essa mulher tão guerreira e parceira. Aos meus filhos, Lis e João Victor, que são minha força constante para buscar meus objetivos. Agradeço aos meus pais que, mesmo estando longe durante toda essa trajetória do doutorado, se fizeram presentes, me apoiando e incentivando. Às minhas irmãs, que sempre estiveram comigo e que sempre tiveram uma palavra amiga quando eu mais precisei. Aos meus sobrinhos, que também considero como meus filhos, obrigado por todo amor que vocês me dão. E claro, às minhas avós. E também a todo o restante da minha família que, de algum modo, esteve comigo nessa jornada. Agradeço também aos meus primos/irmãos e grandes amigos, Jacy e Heri, pelo apoio desde que cheguei ao Rio de Janeiro, me recebendo em sua residência, sem o apoio deles, não sei se teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Patrícia Fampa, ou simplesmente Paty, pela oportunidade e por todo o apoio durante todo esse período. Tenho por ela uma tremenda admiração e a considero uma amiga, um ser humano realmente incrível. Agradeço à minha coorientadora, Dra. Daniela Consetino, a Dani, por todo seu apoio durante essa jornada, por todas as vezes que esteve ali comigo na bancada me ajudando, por todos os conselhos e críticas construtivas, que me fizeram admirá-la e tê-la como uma amiga.

À equipe do Laboratório de Parasitos e Vetores, que com toda a garra fez nosso laboratório funcionar e, com isso, conseguimos desenvolver esse projeto. Em particular à Ludmilla, que foi minha parceira de laboratório e de tantas conversas sensacionais, além de claro, Lucas, Fellipe e Tati, que tornaram momentos pesados mais leves. Karina e Day, que sempre que precisei estiveram ali para ajudar, além de todo seu empenho para manter nossa colônia produzindo. E claro, aos ICs que passaram pelo nosso laboratório.

À toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes e ao Dr. Emerson Pontes por terem aberto as portas e me tratado como membro da equipe desde o início. Ao meu amigo e irmão Luan Valim Santos, por todo apoio não só nos meus estudos, mas também por todo apoio emocional e amizade, um verdadeiro “anjo” que Deus mandou para me ajudar nessa caminhada, um pesquisador formidável. Aos amigos Elaine e Matheus, que assim como Luan, estiveram sempre me apoiando profissional e emocionalmente.

À equipe do LASAVE do Instituto de Veterinária da UFRRJ, em especial ao Prof. Dr. Huarrison Azevedo e à pesquisadora Patrícia Gonzaga, que disponibilizaram seu laboratório, equipamentos e conhecimento para a realização de análises moleculares presentes neste trabalho.

Às pesquisadoras Dra. Keyla e Dra. Bia, e ao Prof. Dr. Pedro Lagerblad, pelo auxílio na confecção das microscopias presentes neste trabalho.

Expresso minha sincera gratidão aos colaboradores da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz da UFRRJ, com um agradecimento especial ao Zeca, pela disponibilidade e auxílio constante sempre que necessário.

Minha gratidão estende-se aos membros da banca examinadora por dedicarem seu valioso tempo e compartilharem seu vasto conhecimento, contribuindo significativamente para o aprimoramento da minha pesquisa.

Sou igualmente grato ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pelo suporte educacional e pelas oportunidades de desenvolvimento acadêmico proporcionadas. Agradeço à CAPES e à FAPERJ pelo financiamento desta pesquisa, por meio das bolsas de apoio disponibilizadas.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

RESUMO

MAGALHÃES, Francisco Rômulo Oliveira. **Influência de Diferentes Estados Nutricionais e infecção por *Herpetomonas muscarum* no Metabolismo Redox de *Stomoxys calcitrans*, a mosca-dos-estábulo**. 2024. 123p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Stomoxys calcitrans, comumente conhecida como mosca-dos-estábulo, é um vetor mecânico significativo que desempenha um papel crucial na transmissão de patógenos em ambientes pecuários, impactando a saúde animal e causando perdas econômicas. Nosso estudo foca na expressão das NADPH oxidases (NOX), enzimas que produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) sob determinados estímulos e com papéis diversos nas atividades metabólicas e o metabolismo redox de *S. calcitrans*, sob condições nutricionais variadas, incluindo jejum, alimentação com sacarose e alimentação com sangue. Investigamos também os mesmos parâmetros após infecção com *Herpetomonas muscarum*, um tripanosomatídeo monoxênico encontrado previamente infectando naturalmente a mosca por nosso grupo. O objetivo desta pesquisa é verificar a expressão das enzimas NOX e a modulação das respostas pró e antioxidante em *S. calcitrans*, particularmente em resposta a diferentes estados nutricionais e à infecção com o protozoário. A metodologia adotada englobou técnicas de análise bioinformática para identificação, caracterização das isoformas de NOX, seguidas de experimentos de expressão gênica quantitativa por PCR em tempo real para medir os níveis de NOX no intestino e corpo gorduroso do inseto, além das atividades redox, tanto pró como antioxidantes. Genes para as enzimas NOX 5 e DOUX1/2 foram identificados a partir do genoma de *S. calcitrans*, apresentando homologia com os de *Drosophila melanogaster* e *Musca domestica*. Os resultados revelaram uma variação significativa na expressão dos genes das enzimas NOX em resposta aos diferentes estados nutricionais, além de um aumento notável na expressão de NOX5 no corpo gorduroso após a infecção por *H. muscarum*. Além disso, foi observado que o estado nutricional afeta diretamente a atividade redox, modulando tanto a produção de moléculas pró oxidantes quanto a ativação de respostas antioxidantes. As moscas em jejum e alimentadas com sangue mostraram um aumento na atividade redox, indicando um possível mecanismo adaptativo para lidar com o estresse oxidativo. Em contraste, as moscas alimentadas com sacarose apresentaram uma resposta redox menos intensa, sugerindo diferenças na gestão do estresse oxidativo de acordo com a dieta. Sugere-se um papel das enzimas NOX na regulação do metabolismo redox de *S. calcitrans*, influenciando a capacidade do inseto de responder a desafios nutricionais e patogênicos. A modulação da expressão de NOX e da atividade redox, investigados pela primeira vez no presente trabalho em *S. calcitrans*, sugere mecanismos adaptativos complexos que permitem ao inseto manter a homeostase em face de variações ambientais e infecções. Estes achados ampliam a compreensão sobre a biologia de vetores de doenças, oferecendo perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de controle vetorial que explorem a vulnerabilidade do inseto ao estresse oxidativo.

PALAVRAS-CHAVE: Transmissão mecânica; NADPH oxidases; espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Francisco Rômulo Oliveira. **Influence of Different Nutritional States and Infection by *Herpetomonas muscarum* on the Redox Metabolism of *Stomoxys calcitrans*, the Stable Fly.** 2024. 123p. Thesis (PhD in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Stomoxys calcitrans, commonly known as the stable fly, is a significant mechanical vector that plays a crucial role in the transmission of pathogens in livestock environments, impacting animal health and causing economic losses. Our study focuses on the expression of NADPH oxidases (NOX), enzymes that produce reactive oxygen species (ROS) under certain stimuli, and have various roles in the metabolic activities and redox metabolism of *S. calcitrans*, under varied nutritional conditions, including fasting, feeding on sucrose, and blood feeding. We also investigated the same parameters following infection with *Herpetomonas muscarum*, a monoxenous trypanosomatid previously found to naturally infect the fly by our group. The aim of this research is to verify the expression of the NOX enzymes and the modulation of pro- and antioxidant responses in *S. calcitrans*, particularly in response to different nutritional states and protozoan infection. The adopted methodology encompassed bioinformatic analysis techniques for identification, characterization of NOX isoforms, followed by quantitative gene expression experiments through real-time PCR to measure the levels of NOX in the insect's gut and fat body, as well as redox activities, both pro- and antioxidants. Genes for the NOX5 and DUOX1/2 enzymes were identified from the genome of *S. calcitrans*, showing homology with those of *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica*. The results revealed a significant variation in the expression of the NOX enzyme genes in response to the different nutritional states, in addition to a notable increase in NOX5 expression in the fat body after *H. muscarum* infection. Furthermore, it was observed that the nutritional state directly affects redox activity, modulating both the production of pro-oxidant molecules and the activation of antioxidant responses. Flies in fasting and blood-fed conditions showed an increase in redox activity, indicating a possible adaptive mechanism to deal with oxidative stress. In contrast, sucrose-fed flies exhibited a less intense redox response, suggesting differences in the management of oxidative stress according to the diet. A role of NOX enzymes in regulating the redox metabolism of *S. calcitrans* is suggested, influencing the insect's ability to respond to nutritional and pathogenic challenges. The modulation of NOX expression and redox activity, investigated for the first time in the present work in *S. calcitrans*, suggests complex adaptive mechanisms that allow the insect to maintain homeostasis in the face of environmental variations and infections. These findings broaden the understanding of the biology of disease vectors, offering perspectives for the development of vector control strategies that exploit the insect's vulnerability to oxidative stress.

KEYWORDS: Mechanical transmission; NADPH oxidase enzymes; Reactive Oxygen Species.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre a sequência de isoformas de NOX de *S. calcitrans* e outras espécies

Tabela 2. Primers específicos para os genes DUOX1, NOX5, EF1 e Rpl32.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Visão geral *Stomoxys calcitrans*.
- Figura 2.** Diferença entre machos e fêmeas da espécie *Stomoxys calcitrans*.
- Figura 3.** Diagrama de células associadas a diferentes regiões do intestino do adulto *Stomoxys calcitrans*.
- Figura 4.** Ciclo de vida *Stomoxys calcitrans* .
- Figura 5.** Representação esquemática das diferentes isoformas de NOX presentes em artrópodes
- Figura 6.** Análise filogenética molecular de isoformas de NOX em diferentes organismos
- Figura 7.** Sequência completa de aminoácidos da enzima DUOX1 destacando as regiões dos domínios funcionais
- Figura 8.** Representação gráfica dos domínios funcionais da DUOX1, gerada pelo HMMER.
- Figura 9.** Sequência de aminoácidos da enzima NOX5 destacando as regiões dos domínios funcionais
- Figura 10.** Representação gráfica dos domínios funcionais da enzima NOX5, obtida através da ferramenta HMMER.
- Figura 11.** Principais moduladores de EROs e alvos de H₂O₂.
- Figura 12.** Fluxo lipídico em insetos hematófagos após a ingestão de sangue, retratando a jornada metabólica dos lipídios desde a digestão até o apoio à reprodução
- Figura 13.** Expressão relativa dos genes de NADPH oxidase no intestino de *Stomoxys calcitrans* sob diferentes estados nutricionais.
- Figura 14.** Expressão relativa dos genes de NADPH oxidase no Corpo Gorduroso (CG) de *Stomoxys calcitrans* em resposta a diferentes estados nutricionais.
- Figura 15.** Geração de Superóxido (O₂^{•-}) em diferentes tecidos de *S. calcitrans* expostos a condições de dietas específicas.
- Figura 16.** Quantificação de H₂O₂ em diferentes grupos de homogenatos de tecidos de *S. calcitrans* expostos a diferentes condições alimentares.
- Figura 17.** Comparação da produção de H₂O₂ entre diferentes órgãos divididos em grupos de homogenatos de *S. calcitra* expostos a diferentes condições alimentares.
- Figura 18.** Variação na oxidação dos grupos tióis em *Stomoxys calcitrans* submetidas a diferentes estados nutricionais.
- Figura 19.** Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em *Stomoxys calcitrans* em resposta a diferentes regimes nutricionais.
- Figura 20.** Atividade da catalase em *Stomoxys calcitrans* submetidas a diferentes estados nutricionais.
- Figura 21.** Atividade da glutaciona peroxidase (GPx) em tecidos de *Stomoxys calcitrans* submetidas a diferentes condições nutricionais.
- Figura 22.** Geração de EROs em intestino de moscas *S. calcitrans* em jejum por 24h após emergirem.
- Figura 23.** Geração de EROs em intestino de moscas *S. calcitrans* alimentadas com sangue por 24h após emergirem.
- Figura 24.** Geração de EROs em intestino de moscas *S. calcitrans* alimentadas com sacarose por 24h após emergirem.

- Figura 25.** Concentrações de Triacilglicerol (TAG) em *Stomoxys calcitrans* submetidas a diferentes estados nutricionais.
- Figura 26.** *Herpetomonas muscarum* parasitando intestino de *Stomoxys calcitrans*, em microscopia eletrônica de varredura.
- Figura 27.** Análise da expressão gênica de NADPH oxidases no intestino de *Stomoxys calcitrans* após infecção por *Herpetomonas muscarum*.
- Figura 28.** Expressão gênica diferencial de NADPH oxidases no corpo gorduroso de *Stomoxys calcitrans* em resposta à infecção por *Herpetomonas muscarum*.

LISTA DE ABREVIACOES

CAT:	Catalase
cDNA:	DNA Complementar
DHE:	Diidroetdio oxidante-sensível
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPI:	Difenilenoiodnio
DUOX:	Dual Oxidase
EROs:	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH:	Glutationa
GPx:	Glutationa Peroxidase
H₂O₂:	Peróxido de Hidrognio
HO:	Heme Oxigenase
HRP:	Peroxidase de Rbano
MAPA:	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NOX:	NADPH Oxidases
O₂⁻:	Superóxido
PBS:	Tampão Fosfato Salino
qPCR:	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RT-PCR:	Reação de transcriptase reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
SOD:	Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I: “Identificação de Enzimas NADPH Oxidases em <i>Stomoxys calcitrans</i> ”	5
2. INTRODUÇÃO	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1. <i>Stomoxys calcitrans</i> (Mosca-dos-Estábulo)	10
3.2. A importância econômica de <i>Stomoxys calcitrans</i>	13
3.3. Família NADPH Oxidases (NOX)	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Análises <i>in silico</i> e caracterização bioinformática	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Identificação de NOX, caracterização bioinformática e comparação com outros organismos	20
6. DISCUSSÃO	27
CAPÍTULO II: “Atividade Redox de <i>S. calcitrans</i> em Diferentes Estados Nutricionais”	30
7. INTRODUÇÃO	33
8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
8.1. Estresse Oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	34
8.2. Metabolismo Lipídico em Insetos Hematófagos	38
9. MATERIAIS E MÉTODOS	42
9.1. Desenho de primers	42
9.2. Extração de RNA	43
9.3. Síntese de cDNA	43
9.4. Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)	43
9.5. PCR Quantitativa (qPCR)	44
9.6. Detecção de EROs em intestino de <i>S. calcitrans</i>	44
9.7. Quantificação de Superóxido	45
9.8. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) após diferentes dietas	45
9.9. Quantificação de Grupamentos Tióis Oxidados	46
9.10. Ensaio de Superóxido Dismutase (SOD)	46
9.11. Ensaio de Catalase	47
9.12. Ensaio de Glutathione Peroxidase (GPx)	47
9.13. Determinação de Triacilglicerol (TAG)	48
9.14. Análise Estatística	48

10. RESULTADOS.....	49
10.1. Expressão Relativa de genes NOX em <i>S. calcitrans</i>	49
10.2. Geração de Superóxido (O ₂ ⁻) em diferentes condições alimentares.....	51
10.3. Produção de Peróxido de hidrogênio	52
10.4. Oxidação dos Grupos Tióis em <i>Stomoxys calcitrans</i> em Resposta a Diferentes Estados Nutricionais	55
10.5. Atividade de SOD em <i>S. calcitrans</i>	56
10.6. Avaliação da Atividade Antioxidante em <i>S. calcitrans</i> : Catalase e Glutaciona Peroxidase.....	57
10.7. Produção de EROs em intestinos de <i>S. calcitrans</i>	60
10.8. Metabolismo de TAG em <i>S. calcitrans</i>	62
11. DISCUSSÃO	64
CAPÍTULO III: “Efeitos da Infecção por <i>Herpetomonas muscarum</i> na Expressão de NADPH Oxidases” ..	73
12. INTRODUÇÃO	76
13. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	78
13.1. <i>Stomoxys calcitrans</i> como hospedeiro de microrganismos.....	78
13.2. Tripanossomatídeos e o Gênero <i>Herpetomonas</i>	79
14. MATERIAIS E METÓDOS	83
14.1. Ensaio de infecção de <i>Stomoxys calcitrans</i> por <i>Herpetomonas muscarum</i>	83
14.2. Extração de RNA.....	83
14.3. Síntese de cDNA	83
14.4. Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)	84
14.5. PCR Quantitativa (qPCR).....	84
15. RESULTADOS.....	86
16. DISCUSSÃO	89
17. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
ANEXOS.....	10

1. INTRODUÇÃO GERAL

Stomoxys calcitrans, comumente conhecida como mosca-dos-estábulos, é um inseto que se destaca dentro do cenário da entomologia por seus hábitos e impacto na vida animal. Este inseto hematófago, reconhecido por sua picada incômoda, se alimenta de sangue de uma variedade de hospedeiros, tendo preferência por mamíferos de grande porte, como bovinos, equinos e, em certas condições, até seres humanos (ZUMPT, 1973; MULLENS *et al.*, 2006; BALDACCHINO *et al.*, 2013).

O comportamento alimentar da mosca-dos-estábulos transcende o mero incômodo, estando ligado a questões mais sérias como a transmissão mecânica de patógenos e a redução significativa no bem-estar e na produtividade dos animais afetados (Yeruham e Braverman, 1995). Devido à sua ampla distribuição geográfica e à sua capacidade de se adaptar a diversos ambientes, *S. calcitrans* representa uma ameaça constante à pecuária mundial, configurando-se como um dos alvos prioritários em estudos de controle de pragas (CORTINAS, 2006; TAYLOR *et al.*, 2012).

Na indústria pecuarista, um dos fatores críticos que afetam diretamente a produtividade é o bem-estar animal. Neste cenário, a presença da *S. calcitrans*, emerge como uma causa significativa de estresse para animais como equinos e bovinos. Este estresse, decorrente de picadas dolorosas, não só compromete o comportamento alimentar dos animais, mas também resulta em uma redução notável na produção de carne e leite, elementos vitais para a economia global do setor (PALAVESAM *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2018). Além disso, os indivíduos pertencentes ao gênero *Stomoxys* podem ter uma frequência de alimentação inconsistente, influenciada especialmente pelas ações dos animais hospedeiros que, incomodados com a dor das picadas, tentam afugentar as moscas de suas costas ou patas. O intervalo entre as refeições desses organismos pode variar amplamente, de 4 a 72 horas (KUNZ e MONTY, 1976; FOIL e HOGSETTE, 1994).

No continente americano, estima-se que a mosca-dos-estábulos seja responsável por ocasionar um prejuízo anual avaliado em US\$ 2,5 bilhões, além de causar uma redução de mais de 12 kg no peso de novilhas e garrotes. No Brasil, foram aproximadamente 400 milhões de dólares em 2023, representando um alto prejuízo econômico ao setor agropecuário. De acordo com a Embrapa (2023), essa praga é capaz de diminuir a produção de leite em até 60% e causar uma redução de 30% no ganho de peso dos animais, além de provocar complicações no

processo de reprodução. Essas perdas podem ser, em grande parte, atribuídas ao estresse induzido pelas picadas das moscas nos animais, uma vez que esses insetos podem permanecer próximos aos animais, rodeando-os por um período de até 24 horas e podendo realizar até 40 picadas em apenas cinco minutos (TAYLOR, 2012; GRISI et al., 2014; BARROS et al., 2023).

Além dos danos diretos provocados pelo *S. calcitrans* em áreas de produção, essa espécie pode atuar como um vetor mecânico para vários patógenos, afetando a saúde pública. Sua presença em grande número em áreas rurais, aliada a seus hábitos alimentares, a torna importante na propagação de diversos microrganismos. Graças à sua habilidade de transportar agentes infecciosos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos, o *S. calcitrans* desempenha um papel crucial na transmissão de doenças. Uma revisão de 2013 destaca a ampla gama de patógenos transmitidos por essa mosca, reforçando seu potencial como vetor (BALDACCHINO et al., 2013).

A transmissão mecânica é uma consequência da alimentação sanguínea nos insetos hematófagos, podendo ocorrer tanto pela contaminação das partes bucais, como pela regurgitação do conteúdo do trato digestório (BALDACCHINO et al., 2013).

Apesar de sua relevante importância veterinária e do genoma já descrito, existem poucos estudos sobre a fisiologia de *S. calcitrans*. Adicionalmente, seu potencial papel como vetor mecânico na transmissão de patógenos já foi relatado (BALDACCHINO et al., 2013). Portanto, aprofundar-se no estudo da biologia e fisiologia deste inseto pode elucidar aspectos do seu desenvolvimento e disseminação na natureza.

Em insetos, trabalhos recentes relacionam a importância da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em eventos como defesa pelo sistema imune (DUBOVSKIY et al., 2008), na interação inseto-patógeno (PAN et al., 2012; COSENTINO-GOMES et al., 2014) e na digestão e estados nutricionais de insetos hematófagos (ALVES-BEZERRA et al., 2014).

As enzimas NADPH oxidases (NOX) são oxidases dependentes de NADPH que catalisam a geração de EROs, frequentemente superóxidos, com produção secundária de peróxido de hidrogênio, a partir do oxigênio molecular. A primeira NOX descrita, hoje conhecida como NOX2, é uma enzima presente em algumas células do sistema imune (por exemplo, neutrófilos e macrófagos), capaz de gerar EROs como parte do mecanismo imune inato contra microrganismos invasores. Posteriormente, novas isoformas foram descritas em células não fagocíticas. Atualmente, existem ao todo sete isoformas presentes em mamíferos (NOX1-5, DUOX1/2), que são expressas em uma ampla variedade de tecidos, gerando EROs

de forma regulada em resposta a diferentes estímulos, tais como fatores de crescimento, citocinas e sinalização por cálcio. Além disso, análises evolutivas mostram que estas enzimas ocorrem em quase todos os organismos eucarióticos (LAMBETH, 2004; KAWAHARA et al., 2007).

As enzimas NOX4, NOX5 e DUOXs representam algumas das principais isoformas de NOX encontradas em artrópodes. Nas moscas do gênero *Drosophila*, as enzimas NOX5 e DUOXs são essenciais na geração de EROs, desempenhando um papel crucial nas respostas antimicrobianas dos epitélios que formam a barreira mucosa. Além disso, essas enzimas têm uma função importante na imunidade intestinal desses organismos e na defesa contra patógenos no trato gastrointestinal (LI et al., 2018). Em outros insetos, foi demonstrado que o silenciamento de isoformas de NOX reduz a expressão de certos peptídeos antimicrobianos, limitando assim o crescimento de bactérias no lúmen gastrointestinal (PAN et al., 2012).

Em estudos recentes nosso grupo detectou *Herpetomonas muscarum* na hemolinfa de *S. calcitrans* do campo (ROSA, 2022). Trata-se de um tripanossomatídeo monoxênico, grupo de protozoários que tem como hospedeiros artrópodes e com potencial de controle biológico de vetores, que já havia sido descrito em outras moscas como *Musca domestica* e *Drosophila melanogaster* (MASLOV et al., 2019). Além do ineditismo da descrição na mosca-dos-estábulo, será um valioso patógeno nos estudos de imunidade da mosca.

A ampla expressão dessas enzimas em diferentes células, incluindo aquelas não relacionadas ao sistema imune, levanta a questão da importância das EROs geradas pelas enzimas NOX em vários organismos e tecidos. Esse tema tem sido frequentemente abordado em organismos superiores. Tais enzimas são comumente ativadas em resposta a condições de estresse, como invasões por patógenos, falta de nutrientes e dano físico (AGUIRRE & LAMBETH, 2010). No entanto, os trabalhos que exploram suas funções em moscas hematófagas, tais como a *Stomoxys calcitrans*, são limitados.

As enzimas NOX produtoras de EROs se apresentam como ótimas moléculas a serem estudadas devido ao seu papel em processos importantes no metabolismo, como reparo tecidual, estresse oxidativo, metabolismo nutricional e imunidade, de diferentes organismos (AGUIRRE & LAMBETH, 2010).

Neste presente estudo, pretendemos investigar a função das enzimas NOX e entender a modulação da sua expressão. Analisaremos o papel da geração de EROS e como essa modulação, sinalização e controle de redução-oxidação (redox) influenciam a biologia da *S. calcitrans*, especialmente em resposta a diferentes estados nutricionais e infecção por

Herpetomonas muscarum Adicionalmente, essa pesquisa vai verificar o perfil lipídico de triacilglicerol e avaliar se o estresse oxidativo causou alterações em seus níveis. Importante destacar, os dados coletados e analisados nesta pesquisa são inéditos, representando uma contribuição significativa ao conhecimento existente sobre o metabolismo oxirredutor e a resposta ao estresse oxidativo em *S. calcitrans* sob diversas condições nutricionais e na resposta à infecção.

A estrutura desta tese é delineada para explorar de forma abrangente o papel das NOX em *S. calcitrans*, com um foco particular em sua expressão e no metabolismo oxirredutor sob diversas condições nutricionais e infecção por patógenos. Esta análise detalhada visa desvendar como esses elementos fundamentais interagem e influenciam a fisiologia da mosca, contribuindo para nossa compreensão do metabolismo redox e seu papel na adaptação a diferentes estímulos.

No Capítulo 1, 'Identificação de Enzimas NADPH Oxidases em *Stomoxys calcitrans*', iniciamos conhecendo mais sobre *S. calcitrans* e com a identificação e análise das enzimas NOX, estabelecendo a base para compreender sua função e expressão dentro deste organismo. O Capítulo 2, 'Atividade Redox em Diferentes Estados Nutricionais', examina como variações no estado nutricional influenciam a atividade redox mediada por estas enzimas, refletindo sobre o impacto no metabolismo desse inseto. E o Capítulo 3, 'Efeitos da Infecção por *Herpetomonas muscarum* na Expressão de NADPH Oxidases', investiga como a expressão de NOX é afetada pela infecção por *Herpetomonas muscarum*. Esta seção foca em analisar as alterações nos níveis de expressão, contribuindo para uma compreensão mais profunda da reação fisiológica de *S. calcitrans* à infecção, sem se aprofundar nas respostas imunológicas específicas.

Cada capítulo contribui para um entendimento mais profundo das complexas interações entre a expressão de enzimas NOX, o metabolismo redox, e as respostas imunológicas em *S. calcitrans*, abrindo caminhos para futuras pesquisas nesta área.

CAPÍTULO I:
Identificação de Enzimas e Caracterização de NADPH Oxidases em
Stomoxys calcitrans

RESUMO

MAGALHÃES, Francisco Rômulo Oliveira. **Influência de Diferentes Estados Nutricionais e infecção por *Herpetomonas muscarum* no Metabolismo Redox de *Stomoxys calcitrans*, a mosca-dos-estábulo**. 2024. 123p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Stomoxys calcitrans, conhecida como mosca-dos-estábulo, é um inseto de grande importância na produção pecuária devido ao seu comportamento hematófago e seu papel como vetor mecânico de patógenos. A identificação e caracterização das enzimas NADPH oxidases (NOX) em *S. calcitrans* são cruciais para entender os mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua influência no metabolismo do inseto. As NADPH oxidases são essenciais na regulação do estresse oxidativo, desempenhando papéis vitais na defesa imunológica e na digestão do sangue. Neste capítulo, foi realizada uma análise detalhada das isoformas de NOX presentes em *S. calcitrans*, utilizando técnicas de bioinformática. Foram identificadas cinco isoformas de NOX, com alta similaridade às isoformas encontradas em *Musca domestica* e *Drosophila melanogaster*. A análise filogenética revelou uma conservação significativa dessas enzimas entre diferentes espécies de insetos, destacando sua importância evolutiva. Os resultados mostram que as isoformas de NOX em *S. calcitrans* possuem regiões conservadas críticas para sua atividade enzimática, como os domínios de ligação ao NADPH e ao FAD. A caracterização bioinformática das sequências de aminoácidos confirmou a presença de domínios funcionais típicos das NADPH oxidases, sugerindo que essas enzimas desempenham um papel importante na biologia redox da mosca. Este estudo fornece novas informações sobre a biologia de *S. calcitrans*, elucidando a função das NADPH oxidases no metabolismo redox do inseto. Os achados ampliam a compreensão sobre os mecanismos adaptativos de *S. calcitrans*, oferecendo perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de controle vetorial que explorem a vulnerabilidade do inseto ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Stomoxys calcitrans*, NADPH oxidases, metabolismo redox, controle vetorial.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Francisco Rômulo Oliveira. **Influence of Different Nutritional States and Infection by *Herpetomonas muscarum* on the Redox Metabolism of *Stomoxys calcitrans*, the Stable Fly.** 2024. 123p. Thesis (PhD in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Stomoxys calcitrans, commonly known as the stable fly, is a significant insect in livestock production due to its hematophagous behavior and role as a mechanical vector of pathogens. Identifying and characterizing NADPH oxidase (NOX) enzymes in *S. calcitrans* is crucial for understanding the mechanisms of reactive oxygen species (ROS) production and their influence on the insect's metabolism. NADPH oxidases are essential in regulating oxidative stress, playing vital roles in immune defense and blood digestion. In this chapter, a detailed analysis of the NOX isoforms present in *S. calcitrans* was conducted using bioinformatics techniques. Five NOX isoforms were identified, showing high similarity to isoforms found in *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster*. Phylogenetic analysis revealed significant conservation of these enzymes among different insect species, highlighting their evolutionary importance. The results show that NOX isoforms in *S. calcitrans* have conserved regions critical for their enzymatic activity, such as NADPH and FAD binding domains. Bioinformatic characterization of the amino acid sequences confirmed the presence of typical NADPH oxidase functional domains, suggesting that these enzymes play an important role in the redox biology of the fly. This study provides new insights into the biology of *S. calcitrans*, elucidating the function of NADPH oxidases in the insect's redox metabolism. The findings enhance the understanding of *S. calcitrans* adaptive mechanisms, offering perspectives for developing vector control strategies that exploit the insect's vulnerability to oxidative stress.

Keywords: *Stomoxys calcitrans*, NADPH oxidases, redox metabolism, vector control.

2. INTRODUÇÃO

A *S. calcitrans*, comumente conhecida como mosca-dos-estábulos, é um díptero de significativa relevância para a produção animal e pecuária devido à sua ampla distribuição mundial e comportamento hematófago em animais de sangue quente. Predominantemente encontrada em ambientes de confinamento, onde a alta densidade de hospedeiros potenciais facilita tanto sua alimentação quanto sua reprodução, essa mosca não só incomoda os animais com suas dolorosas picadas, mas também interfere na produção pecuária, reduzindo a qualidade do leite e da carne, devido ao estresse significativo e o impacto na saúde geral do rebanho. O impacto econômico é agravado pelo seu papel como vetor mecânico de patógenos, ameaçando a saúde animal. A eficácia no controle dessa praga está intrinsecamente ligada ao entendimento aprofundado de sua biologia e fisiologia.

O uso de intervenções que alterem o equilíbrio redox ou inibam a atividade de enzimas chave podem reduzir a viabilidade ou a capacidade reprodutiva dessas moscas, apresentando uma abordagem inovadora e direcionada para seu manejo. Nesse contexto a identificação e o estudo sobre enzimas como as NADPH Oxidases (NOX) e seu papel na fisiologia desses insetos, podendo oferecer pistas valiosas para o desenvolvimento de estratégias que interfiram em vias metabólicas específicas.

As NOX surgem como alvos promissores para essas intervenções. Essas enzimas, fundamentais no controle do estresse oxidativo, atuam na produção regulada de espécies reativas de oxigênio (EROs), elementos cruciais para a manutenção do equilíbrio redox celular. Em insetos hematófagos como a *S. calcitrans*, a função das NOX estende-se além da simples gestão do estresse oxidativo, influenciando diretamente processos fisiológicos vitais como a digestão do sangue e a defesa imunológica. A compreensão detalhada da atividade das NOX em moscas-dos-estábulos pode revelar novas abordagens para mitigar os impactos negativos desses insetos na pecuária.

A identificação de inibidores específicos dessas enzimas ou modulação do ambiente redox pode fornecer estratégias seletivas para controlar suas populações sem prejudicar os hospedeiros ou o meio ambiente. Este enfoque nas enzimas específicas sublinha a importância de estudar NOX, não apenas para compreender melhor a biologia desses insetos, mas também para o desenvolvimento de métodos de controle de pragas mais precisos, eficazes e sustentáveis.

Todos os ensaios realizados nesse capítulo têm por objetivo o esclarecimento de detalhes sobre a resultados obtidos na identificação e caracterização das isoformas de NOX em *S. calcitrans*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Stomoxys calcitrans* (Mosca-dos-Estábulos)

S. calcitrans (Linnaeus, 1758) são artrópodes da família Muscidae, distribuídos mundialmente e ocorrendo também na América do Sul. Popularmente conhecidas como moscas-dos-estábulos, esses insetos são considerados uma grande praga para as criações de bovinos e equinos. Os machos e fêmeas dessa espécie são hematófagos, alimentando-se de duas a quatro vezes ao dia nos períodos mais quentes do ano; porém, em períodos frios, podem interromper a alimentação sanguínea, passando então a alimentar-se somente de néctar e seiva de plantas. No entanto, essa alimentação não é exclusiva, pois as moscas-dos-estábulos adultas precisam da refeição de sangue para a oviposição e o desenvolvimento dos ovos, assim como para a produção de fluidos seminais (TAYLOR, 2006; BRITO et al., 2008; BARROS et al., 2023).

As moscas adultas medem de 4 a 7 mm de comprimento e possuem características morfológicas marcantes, sendo facilmente reconhecidas devido à sua protuberante probóscide, projetada para frente e localizada na região craniana, e por seus palpos curtos (Figura 1). Possuem veias M1+2 das asas suavemente curvadas. Além disso, apresentam uma tonalidade acinzentada e exibem quatro listras longitudinais no tórax, que estão posicionadas na parte dorsal. O abdômen, de tamanho reduzido, exhibe manchas escuras nos segundo e terceiro segmentos abdominais (MARCONDES, 2001; MASMEATATHIP et al., 2006).

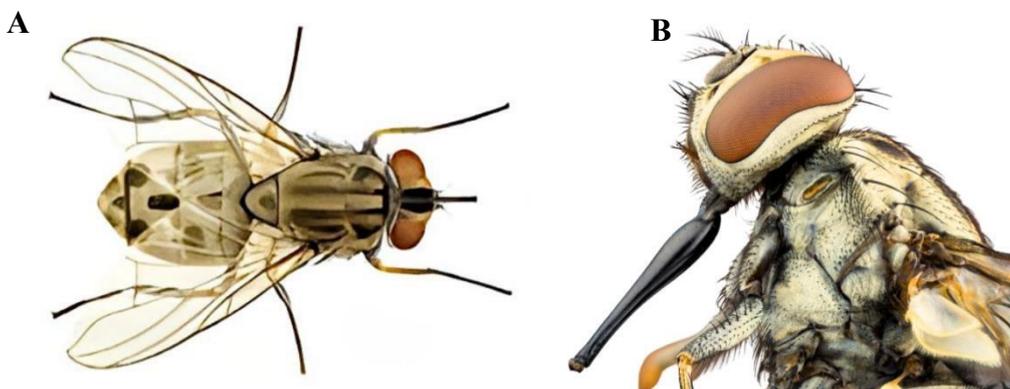


Figura 1. Visão geral *Stomoxys calcitrans*. (A) *Stomoxys calcitrans* (visão dorsal). (B) destaque do aparelho bucal (vista lateral). Adaptado de Cummings e Murray (2006). Fonte (B): Canva, 2023.

A principal diferença entre machos e fêmeas está na posição dos olhos, tendo as fêmeas olhos dicópticos e os machos olhos holópticos (Figura 2) (BRITO et al., 2008).

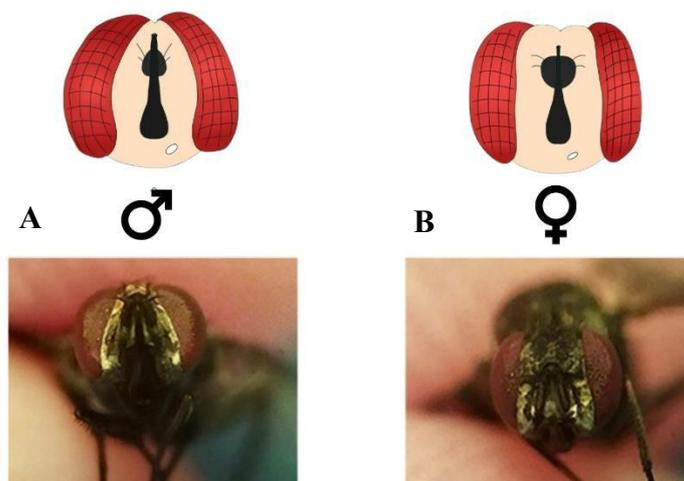


Figura 2. Diferença entre machos e fêmeas da espécie *Stomoxys calcitrans*. Machos com olhos holópticos (A) e fêmeas olhos dicópticos (B). Adaptado de Rosa (2022).

O sistema digestório de *S. calcitrans* (Figura 3), assim como na maioria dos insetos, possui o intestino médio estrutural e funcionalmente diferenciado ao longo de seu comprimento. Tanto o intestino médio quanto o anterior estão diretamente ligados ao proventrículo (TULLOCH, 1906; BILLINGSLEY & LEHANE, 1996). O encontro do intestino anterior e médio ocorre no proventrículo (a), que conta com células especializadas na produção da matriz peritrófica. Além disso, as células do epitélio intestinal de *S. calcitrans* exibem formato arredondado e presença de microvilosidades (BILLINGSLEY & LEHANE, 1996; ROSA, 2022).

O intestino médio apresenta uma zona reservatória, composta por células especializadas na absorção de água e uma extensa lâmina basal. Esse arranjo é crucial, pois alguns artrópodes, especialmente os hematófagos, consomem grandes quantidades de comida em momentos espaçados, requerendo uma adaptação estrutural significativa do seu sistema digestório (BERRIDGE, 1970; BILLINGSLEY & LEHANE, 1996). Uma porção do trato digestório, geralmente na parte frontal, possui adaptações estruturais que facilitam o estiramento e a rápida transferência de água do sangue ingerido para a hemolinfa.

Na parte final do intestino médio, identifica-se uma área conhecida como zona opaca, composta por diversas vesículas secretoras responsáveis pela secreção e síntese de proteinases

digestivas. Segue-se a região posterior do intestino, que tem como principal função a absorção de nutrientes. Esta é caracterizada por apresentar uma extensa superfície coberta por microvilosidades e pelo armazenamento de vesículas lipídicas no interior das células, denominada zona lipoide (BILLINGSLEY & LEHANE, 1996)

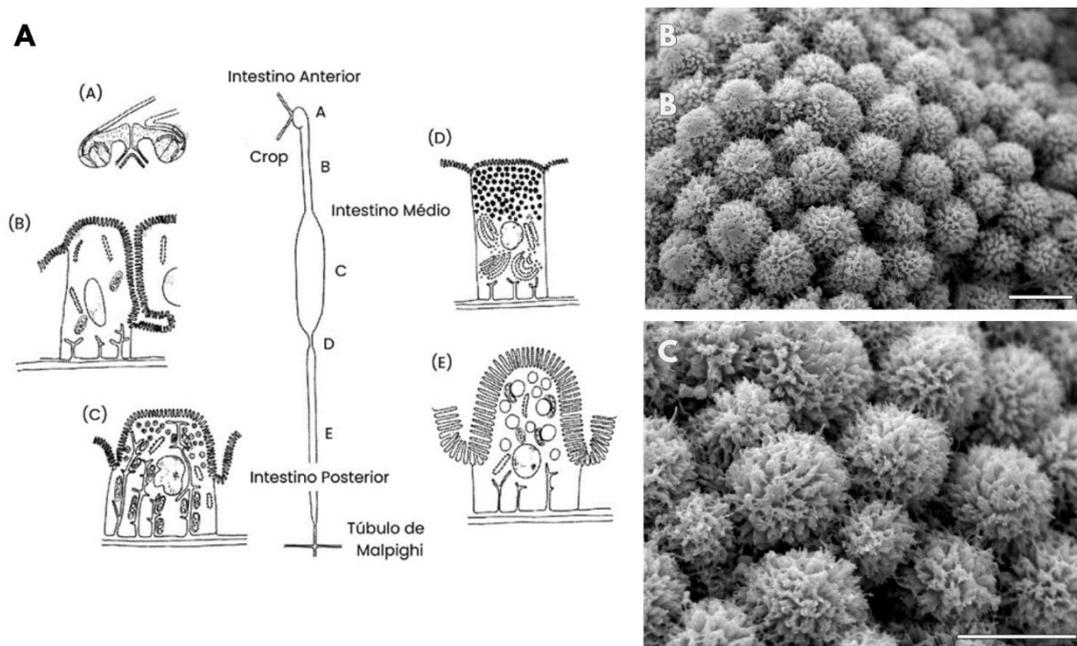


Figura 3. Diagrama de células associadas a diferentes regiões do intestino do adulto *Stomoxys calcitrans*. O intestino anterior e o intestino médio se encontram no proventrículo (A), que possui células especializadas na produção da matriz peritrófica. O sangue proveniente do papo passa pelo proventrículo e pelo intestino médio torácico (B), onde as células não são especializadas, em direção à zona de reserva (C), onde as células possuem muitas mitocôndrias, uma lâmina basal extensa e são especializadas na absorção de água. Na zona opaca curta (D), onde as proteinases digestivas são sintetizadas e secretadas, as células são ricas em vesículas secretoras e retículo endoplasmático rugoso. Finalmente, a zona lipídica (E) localizada no início do intestino posterior é responsável principalmente pela absorção de nutrientes e se caracteriza por uma grande área superficial de microvilosidades e pela acumulação de vesículas lipídicas no citoplasma. Adaptado de Billingsley & Lehane (1996) e Rosa (2022).

As fêmeas dessa espécie podem colocar até 400 ovos ao longo da vida, em posturas distintas. As formas imaturas, na natureza, se desenvolvem em matéria orgânica, até mesmo em fezes de bovinos e equinos misturadas a palha seca, grama cortada e resíduos de plantações de cana, preferencialmente material fermentado, desde que mantidos aerados entre 15 e 30°C (BRITO *et al.*, 2008). As larvas apresentam desenvolvimento de primeiro (L1), segundo (L2) e terceiro (L3) estágios. A duração do ciclo de vida de *S. calcitrans* na natureza (Figura 4) acontece em média de 30 dias, o processo de desenvolvimento e sobrevivência desses insetos, estão diretamente ligados a fatores abióticos ambientais, como temperatura e umidade, sendo que em condições favoráveis, na faixa entre os 25°C a 30°C, a duração do ciclo total do inseto, indo do ovo até o indivíduo adulto (KOLLER *et al.*, 2009; FLORENCIO *et al.*, 2020).

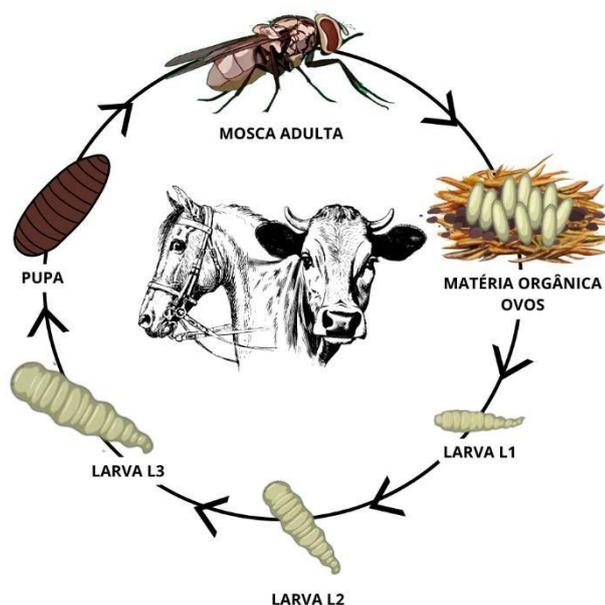


Figura 4. Ciclo de vida *Stomoxys calcitrans*. A duração do ciclo de vida de *S. calcitrans* na natureza acontece em média de 30 dias, passando por diferentes estágios de desenvolvimento. Fonte: Adaptado de Rosa, 2022.

A reprodução desses insetos está relacionada diretamente com o substrato onde ocorre a postura de ovos, crescimento de larvas, desenvolvimento de pupas e formação de indivíduos adultos, que podem variar desde matéria orgânica vegetal decomposta a dejetos bovinos misturados com feno e silagem que acabam sendo uma boa fonte nutricional, além de oferecer ótimas condições de desenvolvimento para essas moscas (BROCE et al., 2005; CORRÊA et al., 2013; COOK et al., 2018).

A população da mosca dos estábulos tem se mantido presente nas instalações pecuárias onde as condições oferecidas são propícias para seu crescimento. Nesses estabelecimentos é recorrente a combinação de elementos como restos de comidas e dejetos de animais, ou até outros elementos como feno e cana de açúcar triturada, se tornando ambientes ideais para a postura de ovos e o desenvolvimento das larvas desses insetos. Portanto, a manutenção da higiene e uma destinação apropriada dos resíduos representam os fatores cruciais a prevenção e controle desses artrópodes (MENEZES, 2016).

3.2. A importância econômica de *Stomoxys calcitrans*

Popularmente conhecida como mosca-dos-estábulos, *S. calcitrans* é uma grande praga na criação de gado e cavalos. Sua picada dolorida e seu comportamento alimentar agressivo

e persistente levam os animais a uma situação de estresse extremo e desenvolvimento de dermatite necrótica (ZUMPT, 1973; YERUHAM, 1995; CORTINAS, 2006). A proporção de uma mosca por animal é o suficiente para reduzir a produção de leite em 0,7% (BRUCE & DECKER, 1958). Animais infestados pela mosca-dos-estábulo podem ter redução de 19% no ganho de peso e diminuição de 40 a 60% da produção de leite (CAMPBELL, 2001).

Segundo a EMBRAPA (2022), estima-se que no Brasil os prejuízos econômicos ocasionados por esses artrópodes custaram, aproximadamente, 400 milhões de dólares ao setor, destes cerca de 50% na produção de leite e 25% na de carne. Em 2018, foram calculados cerca de R\$ 3,5 milhões de reais de prejuízos que os danos diretos e indiretos resultantes de surtos que afetaram uma usina e em 90 propriedades pecuárias num raio de até 30 km (GOMES et al., 2018). Com a presença de *S. calcitrans* no ambiente, os animais diminuem o tempo de descanso conforme as populações da mosca crescem e passam então a formar bandos na tentativa de se defender das picadas da mosca, o que leva ao aumento do estresse térmico (WIEMAN et al., 1992). Um estudo publicado nos Estados Unidos já atribuiu prejuízos econômicos anuais no valor de 2,2 bilhões de dólares relacionados à presença da mosca-dos-estábulo (TAYLOR, 2012).

A estimativa para o ano de 2023 é que a agropecuária brasileira tenha um faturamento de R\$ 1,216 trilhões de reais total, sendo 347,9 bilhões gerados diretamente pela pecuária bovina (MAPA, 2023). Nos últimos anos, a agropecuária foi um dos setores que mais cresceu economicamente no país, tendo influência direta no crescimento do PIB brasileiro (SERIGATI, 2013; IBGE, 2023). Considerando todos esses fatores expostos, percebemos a importância da atividade pecuária para a economia nacional, tornando-se extremamente necessária a busca por soluções de problemas existentes nesse cenário.

3.3. Família NADPH Oxidases (NOX)

A família de enzimas NOX (Figura 5) é responsável pela produção fisiológica de EROs, catalisando essa geração por meio da oxidação do NADPH e redução do O₂. Essa produção é amplamente mantida em quase todos os organismos multicelulares, revelando uma notável conservação evolutiva (LAMBETH E NEISH, 2014; KATO et al., 2016).

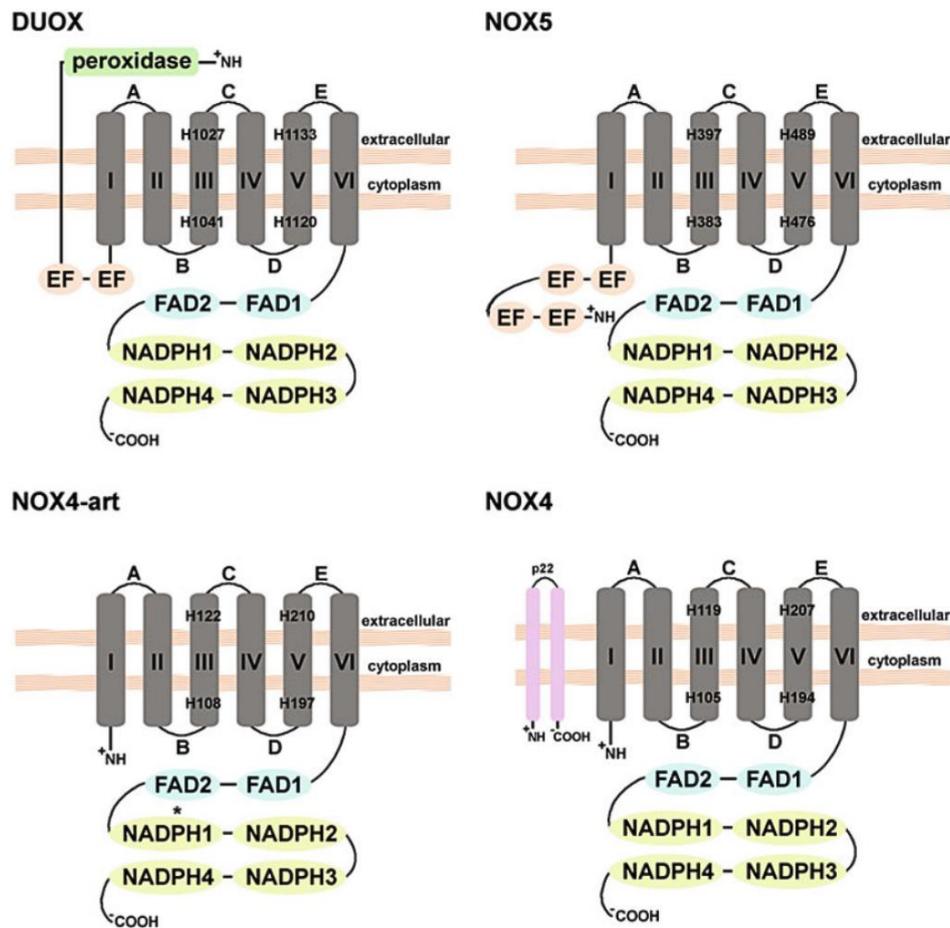


Figura 5. Representação esquemática das diferentes isoformas de NOX presentes em artrópodes. Modelos que mostram alças e domínios importantes, com base em suas estruturas primárias e previsões de modelagem. Todas as NOX têm o domínio redutase férrico com seis hélices hidrofóbicas (cinza escuro) contendo os quatro resíduos de histidina conservados. O domínio NOX é colorido em azul claro (FAD1-2) e amarelo claro (NADPH1 a 4). Segmentos e alças são identificados por letras maiúsculas. A NOX4 de *Homo sapiens* (AAF68973.1) precisa da subunidade p22phox (rosa) para funcionar corretamente e essa subunidade não está presente em artrópodes. Adaptado de Gandara e Oliveira (2023).

As NOX possuem funções fundamentais na biologia celular, abrangendo desde a transmissão de sinais intracelulares até a proteção contra microrganismos invasores. Isso engloba processos de sinalização celular e mecanismos de defesa antimicrobiana (GANDARA et al. 2017).

As enzimas NOX entraram no campo da biologia celular inicialmente graças às contribuições fundamentais de BERNARD BABIOR et al. (1973). Seu trabalho pioneiro elucidou o poder microbicida das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas por fagócitos de mamíferos. Esse estudo inicial foi seguido pela identificação de enzimas com atividade similar em diversos tipos de células presentes não apenas em vertebrados, mas também em invertebrados, fungos, plantas e eucariotos unicelulares. As enzimas NOX

rapidamente se consolidaram como uma significativa fonte de EROs em eucariotos, ao lado das mitocôndrias (AGUIRRE E LAMBETH, 2010).

Os avanços de pesquisas deram uma visão diferenciada sobre as EROs geradas por NOX demonstrando seu complexo papel de sinalização, não estando atreladas apenas com processos oxidantes, sendo apontadas como importantes participantes em uma variedade de funções celulares (SIES et al., 2017). Em análise feita por GANDARA et al. (2017) demonstrou-se que essa adaptabilidade nas funções fisiológicas e na transdução de sinais celulares foi reforçada pelo acúmulo de informações sobre a evolução da família de enzimas NOX. Esses estudos revelaram que quase todos os grupos de organismos eucarióticos contêm elementos pertencentes à família NOX, o que sugere uma origem ancestral do NOX em estágios muito iniciais da evolução.

Estudos confirmaram a existência de um total de sete variações de isoformas NOX presentes em mamíferos (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2), todas as quais são expressas em uma diversificada gama de tecidos. Em artrópodes as principais isoformas encontradas foram NOX5, DUOX1, DUOX2 e NOX4 (LAMBETH et al., 2007; QUIN E GAUSS 2007; KATO et al., 2016; GANDARA et al. 2017).

Além disso, a presença de NOX4-art também foi detectada em diferentes linhagens de artrópodes, decodificando proteínas ligadas a produção de peróxido de hidrogênio (GANGARA et al., 2017). No mosquito *Anopheles gambiae*, vetor de malária, foi mostrado que o sistema heme peroxidase (HPX2)/NOX5 atua na nitração do epitélio intestinal levando a uma resposta anti-*Plasmodium* com consequente opsonização do parasito que ativa o sistema complemento quando o mesmo atinge a hemolinfa. Esse sistema é ativado pela via JNK (DE OLIVEIRA et al., 2012; GARVER et al., 2013).

Segundo KAWAHARA et al. (2007), a presença de outra enzima, denominada NOXm, que são ligadas a hábitos hematófagos de mosquitos, tem seu aumento associado a infecções bacterianas de algumas espécies como *Aedes aegypti*, e causam o aumento transcricional dessa coenzima, juntamente com a DUOX. O silenciamento dessas enzimas leva à redução na expressão de peptídeos antimicrobianos específicos, como a Atacina e a Defensina, limitando assim a proliferação bacteriana no tecido gastrointestinal. Esse processo destaca o papel vital dessas enzimas na regulação da resposta imune inata e na manutenção da homeostase microbiana no sistema digestivo (PAN et al, 2012). Em moscas do gênero *Drosophila*, as enzimas NOX e DUOX são essenciais para geração de EROs presentes em respostas

antimicrobianas de epitélios da barreira mucosa. Além disso, estão associadas à imunidade intestinal dessa espécie e na defesa contra patógenos entéricos (LI *et al.*, 2018).

Todas essas proteínas apresentam dois domínios fundamentais que também são partilhados com as enzimas redutase férrica: um domínio transmembranar contendo heme e um domínio C-terminal da desidrogenase citoplasmática (DH), o qual contém sítios de ligação para o flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e o nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (SUMIMOTO, 2008; ZHANG *et al.*, 2013).

As variantes de NOX apresentam duas moléculas de heme na porção transmembranar e, na região citosólica, um local de ligação para FAD e outro para NADPH, que é o substrato para essas enzimas, e o elétron gerado por sua oxidação é transportado por meio do FAD e dois hemes até chegar ao O₂, o aceptor final, que se liga na parte extramembranar da proteína. Como resultado, o ânion O₂^{•-} é gerado, sendo a principal fonte de EROs para a maioria das variantes de NOX. No entanto, algumas isoformas produzem predominantemente H₂O₂ (LAMBETH, 2004; LAMBETH *et al.*, 2007; QUIN E GAUSS 2007; KATO *et al.*, 2016).

Uma NOX4 específica, referida como NOX4-art, está presente em várias, mas não em todas as espécies de artrópodes, sugerindo a presença de um homólogo de NOX4 no ancestral comum do artrópode, seguido por vários eventos de perda independentes (GANDARA *et al.*, 2017).

As isoformas DUOX são as mais estudadas em artrópodes, já tendo sido descrita em mosquitos do gênero *Anopholes*, em *Drosophila melanogaster* e em outros insetos, sendo parte da primeira linha de defesa dos artrópodes. A primeira evidência de que a microbiota intestinal estava sob controle de uma enzima DUOX foi obtida em mosca-das-frutas (*D. melanogaster*), que é utilizada como um modelo para estudar o sistema imunológico de insetos. A sinalização da proteína G α subunidade q (G α q)-PLC β regula a atividade do DUOX através da mobilização de íons Ca²⁺, e quando essa sinalização é suprimida no intestino médio de moscas adultas, observa-se um aumento na taxa de mortalidade após uma infecção bacteriana oral de baixa intensidade (Ha *et al.*, 2005, 2009). Além disso, a regulação da atividade do DUOX em moscas é influenciada por fatores como a serotonina e a Mesh (proteína associada à membrana intestinal) que desempenha um papel importante no controle da proliferação de bactérias intestinais, regulando a expressão de DUOX por meio de uma cascata de fosforilação MAPK JNK/ERK mediada por Arrestina (XIAO *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2022).

A expressão tanto da proteína Mesh quanto de DUOX está associada à composição da microbiota bacteriana presente no intestino. Em mosquitos, essa expressão aumenta significativamente logo após uma refeição de sangue, o que está diretamente relacionado ao aumento dramático da população bacteriana no intestino após essa ingestão (XIAO et al., 2015, 2017). *Glossina morsitans* (Mosca Tsé-tsé) é naturalmente resistente à infecção por tripanossomas devido a uma combinação de fatores, incluindo a idade da mosca, a presença de moléculas tripanolíticas materno-derivadas e o estado da microbiota. No entanto, moscas maduras que são refratárias à infecção demonstram níveis elevados de transcritos de AMP (adenosina monofosfato), óxido nítrico sintase (NOS) e DUOX quando desafiadas com o parasita *Trypanosoma brucei rhodesiense* (WEISS et al., 2013).

A expressão aumentada de NOX 5 no intestino médio de mosquitos já foi descrita em insetos dípteros que se alimentaram com sangue infectado pelo parasita *Plasmodium berghei*. Quando o gene que codifica a NOX5 foi silenciado, ocorreu uma diminuição na nitração de proteínas no intestino médio dos mosquitos *A. gambiae*. Isso tem como resultado a propiciação do estabelecimento de um número maior de oocistos do parasita no mosquito. Nesse contexto, a via de sinalização JNK desempenha um papel central, regulando a infecção pelo *P. berghei* por meio das enzimas heme peroxidase 2 e NOX5. Essas enzimas trabalham em conjunto para promover a nitração do parasita da malária, e essa reação, por sua vez, ativa uma proteína semelhante ao complemento do mosquito chamada TEP1 (GARVER et al., 2013; ZHU et al., 2022).

Em moscas-dos-estábulo, *S. calcitrans*, apesar de não ter estudos descritos diretamente relacionados às famílias NOX, com a descrição do seu genoma pode se notar presença de genes que expressam diversas proteínas, como citocromo P450 (CYP), aquaporinas AQP, cisteína, entre outros envolvidos em processos relacionados a sinalização redox (OLAFSON et al. 2021).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análises *in silico* e caracterização bioinformática

Para realização das consultas *in silico* e análise dos dados prévios de bioinformática para identificação das sequências de NOX e identificação se o grupo de proteínas hipotéticas mostram similaridade estrutural e se apresentam homologia com isoformas, foi utilizado o banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A tabela para pontuações de alinhamento foi construída a partir de informações recuperadas da ferramenta de proteína BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) no site da NCBI, usando as ORFs detectadas com a respectiva sequência listada. A história evolutiva foi deduzida empregando o método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood) com base no modelo de correção de Poisson (ZUCKERKANDL & PAULING, 1965). A árvore de consenso foi construída após 1000 iterações. As investigações relacionadas à evolução foram realizadas utilizando o software MEGA7.

Para identificar, analisar e representar graficamente os domínios funcionais e conservados das sequências de NOX, foi empregada a ferramenta HMMER disponível no portal EBI (POTTER et al., 2018). A confirmação do domínio conservado recorreu ao uso do PFAM (FINN et al., 2016).

O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos foi realizado para identificar regiões conservadas e prever a estrutura e função das proteínas de interesse. Para tal, foi utilizada a ferramenta Clustal Omega, acessível online através do portal European Bioinformatics Institute (EBI) (Sievers & Higgins, 2014). As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando a configuração padrão do Clustal Omega, que aplica um algoritmo de alinhamento rápido e escalável, ideal para comparar múltiplas sequências simultaneamente. Este método foi escolhido por sua eficácia em gerar alinhamentos precisos, essenciais para a análise comparativa de domínios proteicos e para a inferência filogenética.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação de NOX, caracterização bioinformática e comparação com outros organismos

Nossos resultados iniciais, obtidos por análise in silico do banco de dados do NCBI, mostram que existe um grupo de cinco fases de leituras abertas (ORFs - open reading frames) em *S. calcitrans*, cujos produtos gênicos ainda estavam caracterizados como proteínas hipotéticas. Estas foram identificadas pelos números de acesso XP_013108905.1, XP_013108908.1, XP_013100740.1, XP_013100748.1 e XP_013100749.1 no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para realizar o rastreamento da proteína homóloga no genoma de *S. calcitrans*, utilizamos o algoritmo Blastp, com as sequências de NOX5 e DUOX1/2 de *Drosophila melanogaster* e *Musca domestica* como referência (Matthews et al., 2015). No entanto, três dessas sequências apresentam identidade de 82-86% com NOX5 de *Musca domestica* e 70-75% com NOX5 de *Drosophila melanogaster*. As outras duas sequências mostram similaridades de 93-98% com DUOX1/2 de *Drosophila melanogaster* (Anexo 1). Os produtos preditos deste grupo de proteínas mostram similaridade estrutural com as enzimas Nox, incluindo motivos de ligação para NADPH, FAD e dois grupamentos heme

A partir dessas sequências de aminoácidos, foram criadas uma tabela (Tabela 1) e uma árvore filogenética (Figura 6), representando as sequências de NOX encontradas em *S. calcitrans* e comparando-as com as sequências de outros organismos, revelando um alto grau de similaridade entre elas, em sua maioria bem acima de 50%.

Tabela 1. Comparação entre a sequência de isoformas de NOX de *S. calcitrans* e outras espécies.

GenBank ^a	Organismo	NOX	Similaridade ^b (%)	Identidade ^b (%)
XP_013108905.1	<i>Stomoxys calcitrans</i>	DUOX1	100	100
XP_013108908.1	<i>S. calcitrans</i>	DUOX2	99	99,74
XP_005191214.1	<i>Musca domestica</i>	DUOX	100	97,03
XP_037897374.1	<i>Glossina fuscipes</i>	DUOX	98	93,75
NP_001259968.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	DUOX C	98	93,74
XP_055902766.1	<i>Eupeodes corollae</i>	DUOX	99	91,63
XP_036342377.1	<i>Rhagoletis pomonella</i>	DUOX	99	91,6

XP_017023990.1	<i>Drosophila kikkawai</i>	DUOX	97	94,13
XP_055848873.1	<i>Episyrphus balteatus</i>	DUOX	98	91,78
XP_037809501.1	<i>Lucilia sericata</i>	DUOX	99	95,63
XP_021700455.1	<i>Aedes aegypti</i>	DUOX1	98	85,71
XP_013100740.1	<i>S. calcitrans</i>	NOX5 X1	100	100
XP_013100748.1	<i>S. calcitrans</i>	NOX5 X2	100	93,13
XP_013100749.1	<i>S. calcitrans</i>	NOX5 X3	86	99,92
KAI8118160.1	<i>Lucilia cuprina</i>	NOX5	100	74,5
XP_044571616.1	<i>Drosophila ananassae</i>	NOX5 X3	94	67,74
XP_034479033.1	<i>Drosophila innubila</i>	NOX5 X1	99	65,55

^a Números de acesso para as sequências de aminoácidos obtidos no GenBank.

^b Percentuais de identidade e similaridade foram calculados utilizando o algoritmo Blastp.

A análise filogenética das espécies mencionadas revelou que grupos monofiléticos já estabelecidos se mantiveram íntegros e inalterados. Além disso, todos os valores de suporte *bootstrap* apresentaram relevância substancial, destacando que estamos diante de uma proteína profundamente conservada, que se diversificou ao longo das etapas evolutivas, porém preservando com fidelidade suas relações genealógicas, indicando que as espécies dentro desse grupo têm um relacionamento evolutivo intrincado e compartilham essas características.

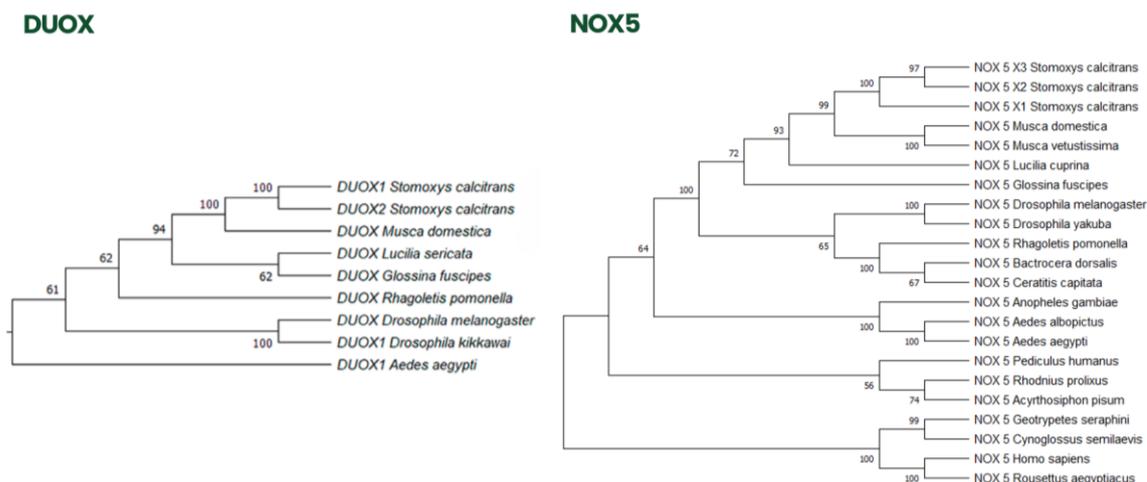


Figura 6. Análise filogenética molecular de isoformas de NOX em diferentes organismos. A história evolutiva foi inferida utilizando-se o método da Máxima Verossimilhança e o modelo de correção de Poisson. A árvore de consenso bootstrap inferida a partir de 1000 réplicas foi utilizada para representar a história evolutiva dos táxons analisados. A porcentagem de árvores replicadas em que os táxons associados agrupados na geração das árvores (1000 repetições) são mostrados ao lado dos galhos. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando-se os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando o modelo de Poisson e, em seguida, selecionando a topologia com valor de verossimilhança logarítmica superior. Esta análise envolveu 18 sequências de aminoácidos. Todas as posições dos ambíguos

foram removidas para cada par de sequências (opção de deleção pareada). Análises evolutivas foram conduzidas no MEGA11.

Os resultados obtidos através do alinhamento múltiplo e da análise de domínio de sequências da enzima DUOX1. A Figura 7 exibe a sequência de aminoácidos de DUOX1, onde as regiões de interesse estão destacadas com diferentes formatações para indicar os domínios funcionais identificados. Especificamente, a região da heme peroxidase (*An_peroxidase_like*) é marcada em verde, abrangendo os aminoácidos 48 a 569. As regiões correspondentes ao domínio de ligação ao FAD (*FAD binding*) e ao domínio de ligação ao NAD (*NAD binding 6*) são destacadas em azul escuro e azul claro, respectivamente, com as regiões de alinhamento de 1238 a 1331 para o FAD e de 1340 a 1495 para o NAD. Adicionalmente, a região *NOX_Duox_like_FAD_NADP*, sublinhada de 1242 a 1514, representa um domínio característico da família NOX de enzimas oxidativas.

```

01  MSFNIFKLRA NHHVKAFSLK ACLSLAVILL VLLDVNCYEK IYSQIEKQRY DGWYNNLAHP
61  DWGSVDShLV RKAPPSYSDG VYAMAGSNRP STRRLSRLFM RGRDGLGSKF NRTALLAFFG
121 QVVANEIVMA SESGCPiEMH RIEIEKCEM YDKECRGDKY IPFHRAAYDR STGQSPNAPR
181 EQINQMTAWI DGSFIYSTSE AWLNAMRSFH NGTLLTDKSG KLPVRNTMRV PLFNNPVPsv
241 MKMLSPERLE LLGDPRTNQN PAVLAFailF VRWHNTLAQR IKRAHSDWSD EEIfQRARRT
301 VIASLQNVIL YEYLPaFLAS ELRPYEGYNR DIHPGIGHIF QAAAFRFGHT MIPPGIYRRD
361 STcNYKkTPM GYPaIRLCST WWDSSDFFTD TSVEEILMGL SSQISEREDP VLCSdVRDKL
421 FGPMEfTRRD LGALNIMGR GRDGLPDiNSA REAFGLPKRA TWTdINPELF AKQPELLEML
481 ISAYNNQLDD VDVYVGGMLE SYGQPGELFT AVIKEQFERL RDSDRFWFEN DRNGIFTKEE
541 IEEIRKITMY DIIVNSTDIG VDDIQRDVFT WHEGDPCPQP MQLNATELEP CTYLEGFDYF
601 SGSELMFIYV CVFLGFVPIL CAGAGYCVVK LQNSKRRKlK IRQeALRAPQ HKGSVDKMLA
661 REWLHANHKR LVTVKFGPEA AIYTVDRKGE KLRTFSLKsv DVVTVEESAH NHIKKKPYIL
721 LRVPNDHDLV LELESYGARR KFVKKLEDFL ILHKKEMTLM EVNRDIMLAS AETRERRQKR
781 LEYFFREAYA LTFGLRPER RRRSDASTDG EVMTVMRTSL SKAEFAAALG MKPNDMFVRK
841 MFNIVDKDQD GRISFQEFLE TVVLFsRGKT DDKLRIIFDM CDNDRNGVID KGELSEMMRS
901 LVEIARTTSL GDDQVTELID GMFQDVGLEH KNHLTYQDFK LMMKEYKGFV VAIGLDCKGA
961 KQNFLDTSTN VARMTSFNIE PMQERPRHWM QEKWDSYITF LEENRQNIIFY LFLFYVITIV
1021 LFVERFIHYS FMAEHTDLRH IMGVGIATR GSAASLSFCY SLLLLTMARN LITKLKEFPI
1081 QQYIPLDSHI QFHKIAACTA LFFSVLHTVG HIVNFYHVST QSHENLKCLT REVHFASDYK
1141 PDITFWLFQT VTGTTGVMLF IIMCIIFVFA HPTIRKKAYK FFWNMHTLYI GLYLLSLIHG
1201 LARLTGPPRF WMFFLGPGIV YTLDKIVSLR TKYMALDVIE TELLPSDVIK IKFYRPPNLK
1261 YLSGQWVRLS CTAFRPHEMH SFTLTsAPHE NFLSCHIKAQ GPWTWKLrNY FDPCNYNAED
1321 QPKIRIEGPF GGGNQDWYKF EVAVMVGgGI GVTPYASILN DLVFGTSTNR YSGVACKKVY
1381 FLWICPSHKH FEWFIDVLRD VEKKDVTNVL EIHIFITQFF HKFDLRTTML YICENHFQRL
1441 SKTSIFTGLK AVNHfGRPDM SSFLKfVQKK HSYVSKIGVF SCGPRPLTKS VMSACdEVNK
1500 TRKLpYFIHH FENFG

```

Figura 7. Sequência completa de aminoácidos da enzima DUOX1 destacando as regiões dos domínios funcionais. As áreas em verde correspondem ao domínio AN_PEROXIDASE (aminoácidos 48-569), as marcadas em azul escuro representam o domínio de ligação ao FAD (aminoácidos 1238-1331), e as em azul claro indicam o domínio de ligação ao NAD (aminoácidos 1340-1495). A linha sublinhada destaca a extensão do domínio NOX_Duox_like_FAD_NADP (aminoácidos 1242-1514). As regiões sublinhadas e em negrito ressaltam a importância desses domínios para a atividade enzimática da DUOX1.

A Figura 8, gerada pelo HMMER, fornece uma representação gráfica dos domínios identificados na sequência de DUOX1, complementando a análise visual da Figura 7. Esta representação gráfica destaca a localização dos domínios AN_PEROXIDASE, ligador de FAD (FAD binding) e ligador NAD (NAD binding), consistentes com as regiões marcadas na sequência de aminoácidos. Os resultados obtidos indicam a presença de domínios conservados que são essenciais para a função enzimática de DUOX1, sugerindo um papel crucial na geração de EROs e na regulação de processos celulares associados a resposta imunológica e homeostase redox.

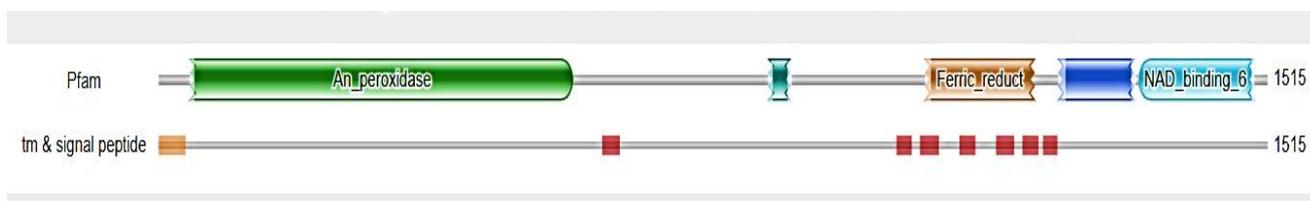


Figura 8. Representação gráfica dos domínios funcionais da DUOX1, gerada pelo HMMER. A barra verde representa o domínio *An Peroxidase Like*, a barra verde clara no meio indica uma proteína de sinalização EF Hand, a barra marrom sinaliza a região de redutase férrica (*Ferric_reduct*), as barras azul escuro e azul claro representam, respectivamente, os domínios de ligação ao *FAD* e ao *NAD*, correlacionando-se com as regiões identificadas na sequência de aminoácidos. A linha contínua abaixo da representação gráfica indica a localização do domínio *NOX_Duox_like_FAD_NADP*, sublinhando sua presença contínua ao longo da enzima

Continuando a análise das sequências de aminoácidos das enzimas da família NOX, a Figura 9 apresenta a sequência completa de NOX5, onde as regiões significativas foram marcadas para destacar domínios funcionais específicos. As regiões identificadas incluem o domínio de ligação ao NAD (*NAD_binding_6*), marcado em negrito e sublinhado na sequência e representado em azul claro no gráfico, abrangendo os aminoácidos 1282 a 1452. Além disso, o domínio de ligação ao FAD (*FAD_binding_8*) é visível em azul na sequência e azul escuro no gráfico, cobrindo os aminoácidos 890 a 964, e a região de redutase férrica (*Ferric_reduct*), indicada em vermelho na sequência e em marrom no gráfico.

```

01  MENNYKLTIN  TNSEQHRGSV  SSTNSLEVPA  TPTRSPKKVS  FSDDLPIATA  NNEENGPHHS
61  ANLANTTAAH  SSLNFASKTQ  SDKIMINNVY  NNNNIKTSD  FVRHLSTSPE  VNVEEVSAAE
121 MQQSQELQNP  VDFMLSQAAQ  YLEKLGHPAT  ATATTAVPPS  QONSPTQESQ  HHKFKSSLNI
181 DLNPSGLDPL  SVIKIPTPPP  SKSPSPPPAP  AVLELNRVNS  RSDSITASDM  STPSTMAARS
241 MKSSSSSES  TTSMDDPPYK  PRSSMVNGSS  NGGSMYPNNN  SSRPTLPHPP  TSPSSDMQEI
301 SEEHAVKYM  PYNLNVDKNN  CSSMELEAKR  DKIRWLLISE  CSALLGEGKH  TREGFRKLFL
361 QEEFQKLFH  LFDLDGNGYL  VQDRWIEHLK  GRLTDDRQMD  YAEQLESVAY  VICGENSKIT
421 FKNFNEIWQA  RGILDKLYRL  IDNDGTNSIS  TNQIMEFISH  LTNSRPRTGF  DKSSLARLEQ
481 LFRNTVGNR  EIRREEFKKI  VISKNPFFTE  RVFQIFDKDN  SGSISLQEFI  DAIQQFSGQS
541 ADDKIRFLFK  VYDIDGDGLI  QHKELHDVIR  ACMEENGMEF  SEDQIEDLTT  AMFEDADPYN
601 RGEITYEALK  NQLHKHGGLL  ENLSITIDRW  LVPLGQEAPV  SKSKSKLWNS  IPIPHQLTPA
661 YMRNNHVFT  YLFLYIAVNV  CLFISRAIQY  RASNGFVIVA  RACGQCLNFN  CAWVLVIMLR
721 HTLTYLRSRG  LSTYLPVDNH  IYLHKLGTIV  ISVLSLIHTV  MHLFNFSIIV  VNDPKINAGH
781 YTIGEWLLTD  RPGLFGLIPG  CANPTGMALF  IILLIMFICS  QPFVRRKGSF  EVFYWTHLLY
841 IPFWILVLFH  GPNFWKWFLV  PGIYIVERV  LRFVWMRGD  GPTYISSGLL  LPSKVIHLVI
901 KRPFNFNFR  GDYVFNIPV  IANYEWHFFT  ISSAPEQEDY  MWLHIRTVGE  WTNRLRYFE
961 KEQQRLHKG  VIAHKQAIPT  SLLQISEEN  TRTASSTPQT  DFLAQNLAKM  QHSSSYDSGM
1021 VTKAMQEQI  SPLRPPRHNY  APSKLATESI  SASHVEIMSQ  PTSSSDRIRS  IKKSLQRTFS
1081 RKDQAPKEK  LSGHSNDGFM  SDEYDVGGTT  ELGKRRKLLK  FMLEKPPLEK  SISLPDIGVK
1141 TKKRERTKAL  RTLGRSESER  SFDETRVRA  RLHSLGLAYM  SPQNKSLAQ  FRYMRNKPTI
1201 IAFKTPSIE  SQPEYSTDQT  DSVHTYNAIQ  AEEGRVPTGD  KSENNEINDD  KPEIVVSKPL
1261 EIFIDGPGYGA  PSSHIFMAQH  AVLIGTGIGV  TPFASILQSI  MHRYWKARHS  CPRCLYEWAS
1321 DIPKTVMNLR  KVDFFWINRD  QRSFEWVNL  LSQLEIEQAE  LGGAMERFLD  MHMYITSALQ
1381 RTDMKAVGLQ  LALDLLHEKG  KRDLITGLKT  RTNAGRPNWD  KVFKQLQAQK  KGKVTVFYCG
1441 PPQLAKTLRV  KCDQYGFAPR  KECF

```

Figura 9. Sequência de aminoácidos da enzima NOX5 destacando as regiões dos domínios funcionais. Os domínios são indicados por diferentes formatações e cores para facilitar a identificação. O domínio de ligação ao NAD (NAD_binding_6) é destacado em negrito e sublinhado na sequência e apresentado em azul claro no gráfico correspondente, com a região de alinhamento compreendendo os aminoácidos 1282 a 1452. O domínio de ligação ao FAD (FAD_binding_8) é indicado em azul na sequência e azul escuro no gráfico, abrangendo os aminoácidos 890 a 964. O componente tipo redutase férrica transmembranar (Ferric_reduct) é marcado em vermelho na sequência e marrom no gráfico, com uma região de alinhamento de 702 a 847. Estas anotações facilitam a visualização das áreas funcionais relevantes para a atividade enzimática da NOX5.

Complementando esses dados, a Figura 10 ilustra a representação gráfica dos domínios funcionais obtida através do HMMER, correlacionando-se diretamente com as anotações da sequência da Figura 9. Esta análise visual reforça os resultados obtidos para a DUOX1 e fornece evidências adicionais da presença de domínios conservados cruciais para as funções de NOX5, que incluem a geração de espécies reativas de oxigênio e a transferência de elétrons.



Figura 10. Representação gráfica dos domínios funcionais da enzima NOX5, obtida através da ferramenta HMMER. Os domínios são coloridos para corresponder à sequência de aminoácidos da Figura X. O domínio de ligação ao NAD é ilustrado em azul claro, o de ligação ao FAD em azul escuro e o componente tipo redutase férrica em marrom. Essa representação visual destaca a localização estratégica desses domínios na proteína e fornece uma referência direta para as regiões alinhadas na sequência de aminoácidos, reforçando a compreensão

da estrutura da NOX5 e seu potencial papel nas funções celulares relacionadas à geração de espécies reativas de oxigênio.

A análise revelou a presença de domínios funcionais críticos para a atividade enzimática. Em particular, o domínio de ligação ao NAD e o domínio de ligação ao FAD foram identificados e são essenciais para a atividade redox da enzima, que está envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio. Observamos também a presença da proteína de sinalização EF Hand, que é onipresente nos genomas de eucariotos e procariotos. Além disso, foi destacada a região do componente tipo redutase férrica transmembranar, implicando seu papel na transferência de elétrons através da membrana.

Nossas análises indicaram que as isoformas DUOX1 e DUOX2 mostram uma alta conservação de sequências entre si, sugerindo funções e estruturas proteicas similares (anexo). Isso indica que ambas as isoformas provavelmente desempenham papéis semelhantes na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) para processos como defesa contra patógenos e sinalização celular. Em contraste com a alta conservação observada entre DUOX1 e DUOX2, as sequências de NOX5 (1, 2, 3) são marcadamente diferentes das sequências DUOX, indicando diferenças substanciais na estrutura e função proteicas (anexo). Esta divergência sugere que as isoformas de NOX5 podem ter especializações funcionais distintas das proteínas DUOX, possivelmente refletindo adaptações a diferentes necessidades celulares ou contextos fisiológicos.

Os resultados apresentados para NOX5 ampliam a compreensão das características estruturais comuns e dos mecanismos moleculares potencialmente compartilhados pelas enzimas da família NOX. A identificação dos domínios de ligação de co-fatores em NOX5 é particularmente relevante, dada a importância dessas regiões na regulação da atividade enzimática e na resposta celular ao estresse oxidativo. As informações aqui detalhadas não apenas confirmam os padrões observados na DUOX1, mas também destacam a complexidade e a diversidade funcional dentro da família de proteínas NOX, sugerindo direções futuras para pesquisa e aplicações terapêuticas.

O resultado do alinhamento foi utilizado para elucidar relações evolutivas entre as sequências e para auxiliar na identificação de regiões funcionais conservadas entre as espécies estudadas. Esses achados fornecem um entendimento mais aprofundado da estrutura de DUOX

e NOX, o que é fundamental para elucidar sua função biológica e potencial aplicação em estratégias de modulação da atividade enzimática.

6. DISCUSSÃO

A mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans*, é um vetor mecânico de patógenos de importância veterinária causando importantes perdas econômicas na atividade pecuária (KHAFILA et al., 2022). Portanto, a busca por métodos de controle da proliferação dessa mosca é essencial. Trabalhos recentes relatam a importância de espécies reativas de oxigênio (EROs) em diversos eventos fisiológicos em artrópodes. As NADPH oxidases (NOX) são consideradas uma das principais enzimas responsáveis pela produção de EROs em diferentes organismos (SIES E JONES, 2020). Assim, direcionar estudos as moléculas envolvidas na fisiologia, metabolismo vetorial e imunologia de artrópodes, como as enzimas NOX, é uma estratégia promissora no controle de dípteros como *S. calcitrans*.

Neste trabalho, buscamos verificar pela primeira vez se *Stomoxys calcitrans* expressa diferentes isoformas da família NADPH oxidases, que são enzimas ligadas a produção de EROs. Com base nas sequências encontradas por nosso grupo no banco de dados do NCBI, cujos produtos gênicos são caracterizados como proteínas hipotéticas em *S. calcitrans* e que se assemelham a isoformas de NOX, realizamos a confecção de uma árvore filogenética afim de analisar a relação entre artrópodes que possuam genes semelhantes a essas moléculas, além de desenhamos primers para verificar a expressão dessas NOX em *S. calcitrans*.

As relações entre os grupos possuem alto grau de similaridade (em sua maioria bem acima de 50%) e altos percentuais de replicação, sendo que na maioria dos ramos se repetem em mais de 50% das árvores, pois corresponde ao percentual de árvores que possuíam tais agrupamentos em 1000 replicatas. Nossos resultados indicam que estamos lidando com uma molécula altamente preservada que passou por diferenciação ao longo do curso da evolução, mas ainda mantém suas conexões de ancestralidade. Diferentes estudos com NOX já demonstraram o alto grau de conservação dessas moléculas corroborando com nossos resultados (LAMBERTH, 2004; KAWAHARA et al. 2007; GANDARA et al., 2017; GANDARA E OLIVEIRA, 2023).

As sequências dessas NOX apresentam identidade de 86-82% com NOX5 de *Musca domestica* e 70-75% com NOX5 de *Drosophila melanogaster*. As outras duas sequências apresentam similaridades com DUOX1/2 de *D. melanogaster*. Vários estudos sobre DUOX em dípteros devido ao seu papel na defesa microbiana e no controle da homeostase do microbioma intestinal (GANDARA E OLIVEIRA, 2023).

Nossas análises também revelam aspectos interessantes da evolução das isoformas da enzima NOX5 entre diferentes espécies, particularmente dentro dos próprios tipos de NOX5 *S. calcitrans*. Observa-se que as isoformas X1 e X3 de *Stomoxys calcitrans* estão agrupadas no mesmo ramo, indicando uma proximidade evolutiva significativa entre elas, apesar de um valor de *bootstrap* de 55 sugerir alguma divergência. Este valor pode refletir variações nas sequências de aminoácidos que ainda permitem a classificação conjunta dessas duas isoformas no contexto de *S. calcitrans*, mas também aponta para diferenças que poderiam influenciar suas funções biológicas. Contrastando com as isoformas X1 e X3, a X2 parece diferir um pouco mais, compartilhando um ancestral comum, mas potencialmente seguindo um caminho evolutivo ligeiramente distinto, como demonstrado pelo agrupamento na árvore filogenética.

Ao expandir o foco para incluir outras espécies, notamos evidências de diversificação das NOX5 além de *S. calcitrans*. A ramificação que separa os insetos de outros grupos como vertebrados pode indicar um processo evolutivo que promoveu a especialização funcional da NOX5. Essa especialização pode refletir a adaptação das espécies a seus respectivos nichos ecológicos e às pressões seletivas distintas.

A presença dos domínios característicos do tipo peroxidase, EF-hand, região de redutase férrica e os domínios de ligação NAD e FAD que são conservados entre todos os ortólogos de DUOX e NOX5, demonstrou sua possível similaridade funcional. Resultados semelhantes foram obtidos em *Rhodnius prolixus* (DIAS et al., 2013).

O domínio de sinalização EF Hand, prevalente em genomas eucarióticos e procarióticos, foi uma das características observadas na análise, demonstrando que elas se enquadram em subgrupos regulados pelo cálcio, assim como visto em outros estudos (KRETSINGER & NOCKHOLDS, 1973; KAWAHARA et al. 2007). Além disso, os domínios de ligação ao NAD e ao FAD, cruciais para a atividade oxirredutora da enzima e consequente produção de espécies reativas de oxigênio, foram identificados (LAMBERTH, 2004). A análise também revelou a parte do componente tipo redutase férrica transmembranar, sublinhando sua função potencial na transferência de elétrons pela membrana.

Em um estudo realizado por Gandara et al. (2021), observou-se que as sequências e características estruturais de NOX5 de *R. prolixus* (RpNOX5), *A. pisum* (ApNOX5), *A. gambiae* (AgNOX5), *D. melanogaster* (DmNOX5) e *H. sapiens* (HsNOX5) apresentam os domínios característicos (domínios EF-hand, transmembrana e NOX) de RpNOX5, os quais são conservados entre todos os ortólogos NOX5 (Kawahara et al., 2007).

Nossas análises de alinhamento de múltiplas sequências envolvendo as proteínas DUOX e NOX5 revelou padrões de conservação notáveis. De forma interessante, esses resultados são semelhantes aos do estudo de que examinou a proteína RpDuox de *R. prolixus* em comparação com as sequências Duox de *Acyrtosiphon pisum*, *Anopheles gambiae* e *D. melanogaster* (DIAS et al., 2013). Assim como observado nesse trabalho, nosso alinhamento também destacou a conservação significativa entre essas proteínas, sugerindo uma função evolutiva conservada essencial para a sua atividade biológica.

Essa consistência nos padrões de conservação entre diferentes conjuntos de proteínas, DUOX e NOX5 em nosso caso, e as sequências DUOX de diferentes espécies nos trabalhos referenciados, reforça a importância dessas regiões conservadas. Essas semelhanças nos alinhamentos sublinham não apenas a relevância funcional dessas sequências em diversas espécies, mas também apontam para um papel evolutivo fundamental dessas proteínas na regulação de processos biológicos chave.

A convergência dos nossos resultados com aqueles encontrados na literatura sugere que a abordagem metodológica adotada é robusta e capaz de revelar aspectos fundamentais da biologia dessas proteínas. Além disso, essa semelhança nos resultados enfatiza a possibilidade de mecanismos de ação compartilhados entre as proteínas DUOX e NOX5, ampliando o entendimento da sua função e da evolução molecular dessas importantes famílias de proteínas.

Esse paralelo entre os estudos abre novos caminhos para investigações futuras sobre a significância funcional e evolutiva dessas conservações, potencialmente revelando alvos para intervenções terapêuticas ou estratégias de modulação em diversos contextos biológicos.

CAPÍTULO II:

Atividade Redox de *S. calcitrans* em Diferentes Estados Nutricionais

RESUMO

MAGALHÃES, Francisco Rômulo Oliveira. **Influência de Diferentes Estados Nutricionais e infecção por *Herpetomonas muscarum* no Metabolismo Redox de *Stomoxys calcitrans*, a mosca-dos-estábulo**. 2024. 123p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Este capítulo explora como os diferentes estados nutricionais de *Stomoxys calcitrans* afetam sua atividade redox. A pesquisa examina as variações na dieta e sua influência no metabolismo redox da mosca, buscando desvendar os mecanismos bioquímicos que regulam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As NADPH oxidases (NOX) desempenham um papel central na geração de EROs, impactando a homeostase redox. Foram realizadas análises de qPCR, ensaios bioquímicos e avaliações estatísticas para medir a expressão dos genes NOX, a atividade das enzimas pró-oxidantes, incluindo a produção de superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a oxidação dos grupos tióis, e atividades antioxidantes, das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx), além do metabolismo de triacilgliceróis (TAG) em *S. calcitrans* sob diferentes condições nutricionais, incluindo jejum, alimentação com sacarose e alimentação com sangue. Os resultados indicam que a expressão de NOX5 é aumentada em resposta ao jejum e ainda mais ao alimentar-se de sangue. Isso pode indicar que NOX5 está envolvido na resposta ao estresse nutricional ou na digestão do sangue. Já em DUOX1 tem sua expressão drasticamente reduzida no jejum, sugerindo que pode ser menos importante ou inibido neste estado nutricional. A dieta também influencia significativamente a atividade redox, com mudanças notáveis dos níveis de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$. Vemos também que as enzimas antioxidantes atuaram visando controlar esse ambiente oxidativo e em mosca alimentadas com sacaroses os níveis de antioxidantes foram altos, demonstrando um possível papel de proteção da alimentação com sacarose. Nossos estudos mostram que o estado nutricional afeta o estado redox dos grupos tióis nos tecidos digestivos de *S. calcitrans*. Observamos maior oxidação no Intestino Médio (IM) com dieta rica em proteínas, sugerindo maior vulnerabilidade ou adaptação metabólica. Em contraste, o Intestino Posterior (IP) apresentou menor oxidação em moscas alimentadas com sangue, indicando um possível mecanismo de proteção. O Corpo Gorduroso manteve seu estado redox constante, refletindo sua função na homeostase energética e no controle do estresse oxidativo. Esses dados destacam a complexidade da resposta redox em *S. calcitrans* e suas interações entre nutrição e fisiologia redox. Observou-se que moscas em jejum e alimentadas com sangue exibiram maior atividade oxidante e produção de EROs, sugerindo uma resposta ao estresse oxidativo. Em contraste, moscas alimentadas com sacarose mostraram uma resposta oxidante menos pronunciada. Esses achados indicam que o estado nutricional modula a atividade redox em *S. calcitrans*, influenciando tanto a produção de EROs quanto a ativação de respostas antioxidantes. Compreender as variações na atividade redox sob diferentes estados nutricionais oferece insights valiosos sobre a biologia de *S. calcitrans*. Os resultados deste estudo destacam a importância das NOX na regulação do metabolismo redox, fornecendo novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de controle da mosca-dos-estábulo.

Palavras-chave: Dieta, homeostase redox, estresse adaptativo.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Francisco Rômulo Oliveira. **Influence of Different Nutritional States and Infection by *Herpetomonas muscarum* on the Redox Metabolism of *Stomoxys calcitrans*, the Stable Fly.** 2024. 123p. Thesis (PhD in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

This chapter explores how the different nutritional states of *Stomoxys calcitrans* affect their redox activity. The research examines variations in diet and their influence on fly redox metabolism, seeking to unravel the biochemical mechanisms that regulate the production of reactive oxygen species (ROS). NADPH oxidases (NOX) play a central role in the generation of ROS, impacting redox homeostasis. qPCR analyses, biochemical assays and statistical evaluations were performed to measure the expression of NOX genes, the activity of pro-oxidant enzymes, including the production of superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and the oxidation of thiol groups, and antioxidant activities, of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPx), as well as the metabolism of triacylglycerols (TAG) in *S. calcitrans* under different nutritional conditions, including fasting, sucrose feeding, and blood feeding. The results indicate that NOX5 expression is increased in response to fasting and even more so when feeding on blood. This may indicate that NOX5 is involved in the nutritional stress response or digestion of the blood. On the other hand, in DUOX1 its expression is drastically reduced in fasting, suggesting that it may be less important or inhibited in this nutritional state. Diet also significantly influences redox activity, with notable changes of H_2O_2 and O_2^- levels. We also see that antioxidant enzymes acted to control this oxidative environment and in flies fed with sucrose the levels of antioxidants were high, demonstrating a possible protective role of sucrose feeding. Our studies show that nutritional status affects the redox status of thiol groups in the digestive tissues of *S. calcitrans*. We observed greater oxidation in the Midgut (MI) with a high-protein diet, suggesting greater metabolic vulnerability or adaptation. In contrast, the hindgut (PI) showed lower oxidation in blood-fed flies, indicating a possible protective mechanism. The Fat Body maintained its constant redox state, reflecting its function in energy homeostasis and oxidative stress control. These data highlight the complexity of the redox response in *S. calcitrans* and its interactions between nutrition and redox physiology. It was observed that fasting and blood-fed flies exhibited higher oxidative activity and ROS production, suggesting a response to oxidative stress. In contrast, flies fed sucrose showed a less pronounced oxidant response. These findings indicate that nutritional status modulates redox activity in *S. calcitrans*, influencing both ROS production and activation of antioxidant responses. Understanding the variations in redox activity under different nutritional states offers valuable insights into the biology of *S. calcitrans*. The results of this study highlight the importance of NOX in the regulation of redox metabolism, providing new perspectives for the development of stable fly control strategies.

Keywords: Diet, redox homeostasis, adaptive stress.

7. INTRODUÇÃO

As NADPH oxidases (NOX), enzimas localizadas na membrana plasmática de uma ampla gama de organismos, incluindo a mosca-dos-estábulo *S. calcitrans*, desempenham um papel crucial na regulação do estresse oxidativo e na atividade redox. Essas enzimas promovem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), afetando diretamente o metabolismo lipídico, incluindo os níveis de triacilglicerol (TAG). Tal impacto é decisivo para o estado nutricional do inseto, influenciando sua biologia e capacidade de transmitir doenças.

A atividade das NOX e a consequente produção de EROs são moldadas por diferentes estados nutricionais. Dietas carentes em nutrientes essenciais podem provocar uma ativação exagerada dessas enzimas, elevando os níveis de EROs e desencadeando estresse oxidativo. Tal condição pode levar à desregulação das funções celulares, peroxidação lipídica, deterioração das membranas celulares e disfunção mitocondrial, afetando negativamente o metabolismo energético e a viabilidade das células.

Por outro lado, o metabolismo lipídico é significativamente afetado pela atividade redox. As EROs regulam a expressão de genes relacionados à síntese e degradação de lipídios, influenciando a síntese e o acúmulo dessas moléculas. Variações no metabolismo lipídico, como o aumento de ácidos graxos saturados (SFA) e a redução de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), podem intensificar o estresse oxidativo. Essa interação cria um ciclo vicioso que compromete o inseto.

A complexidade dessas interações em *S. calcitrans* tem amplas implicações fisiológicas e epidemiológicas. O estresse oxidativo descontrolado pode acelerar o declínio da condição física, comprometer a reprodução, aumentar a vulnerabilidade a patógenos e encurtar o ciclo de vida desses insetos. Compreender as atividades de NOX em relação ao metabolismo redox por meio da dieta representam uma estratégia promissora para controlar as populações de moscas-dos-estábulo.

Entender os mecanismos moleculares e as conexões entre as NOX, condições nutricionais, metabolismo lipídico, estresse oxidativo e atividade redox em *S. calcitrans* é crucial para o desenvolvimento de novas abordagens de controle e gestão dessa praga, trazendo benefícios para a saúde pública e a agricultura.

Nesse capítulo, tivemos com objetivo de compreender se diferentes estados nutricionais podem modular o metabolismo redox de *S. calcitrans*.

8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

8.1. Estresse Oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O estresse oxidativo pode ser descrito como um desequilíbrio na proporção entre substâncias oxidantes e antioxidantes devido ao excesso de oxidantes, e a capacidade do organismo de neutralizá-los com antioxidantes, ou também definidas como uma interrupção da sinalização e controle redox (BETTERIDGE, 2000; JONES, 2006). Esse desequilíbrio pode ocorrer por uma multiplicidade de compostos químicos, que atuam nesse processo, dentre os quais, as espécies reativas de oxigênio (EROs) têm sido um dos grupos de moléculas mais estudadas afim de compreender o papel da sua geração nesses mecanismos de regulação (SIES E JONES, 2020).

As EROs compreendem um grupo de moléculas derivadas do oxigênio molecular, são instáveis e altamente reativas que contém um ou mais elétrons desemparelhados, geralmente formadas por reações redox, podendo ser divididos em espécies não radicais e radicais livres (com pelo menos um elétron livre). Essas moléculas são de extrema importância, pois desempenham um papel crucial na fisiologia de diversos organismos, se envolvendo em vários processos biológicos, como defesa celular, cascatas de sinalização, metabolismo, senescência celular, apoptose e vias reguladoras do crescimento celular (EVANS E HALLIWELL, 1999; BETTERIDGE, 2000; SIES E JONES, 2020).

A oxidação constitui um elemento essencial da existência aeróbica, o que resulta na produção natural desses compostos. Cabe ressaltar que ERO não é uma molécula, nem um composto químico definido, mas sim um termo coletivo para um número de moléculas relacionadas com reatividade amplamente divergente, que quando sofrem um aumento excessivo na sua produção ocasiona o estresse oxidativo (CROSS E TEMPLETON, 2006; HALLIWELL et al., 2015; HAWKINS E DAVIES, 2019).

O excesso de EROs no organismo é combatido por defesas antioxidantes obtidos de formas endógenas ou exógenas que levam a homeostase oxidativa. De acordo com Halliwell et al. (2000), um antioxidante é toda substância que, em concentração menor do que o substrato suscetível à oxidação, é capaz de regenerar o substrato ou prevenir efetivamente sua

oxidação. Dentre alguns antioxidantes produzidos pelo organismo que atuam de maneira enzimática temos, a Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD), ou de maneira não enzimática, como ocorre com a Glutathione (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (como transferrina e ferritina), ácido dihidrolipóico e ubiquinol reduzido (CoQH2) (FINKEL E HOLBROOK, 2000; BARREIROS et al., 2006).

A capacidade de reagir quimicamente das diferentes moléculas de EROs é bastante variável, englobando até 11 níveis distintos em suas respectivas taxas de reação de segunda ordem com alvos particulares (HALLIWELL et al., 2015; HAWKINS E DAVIES, 2019). Os grupos principais de EROs dividem-se em duas categorias: as de natureza radicalar, que incluem o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a hidroxila ($HO\cdot$), o peróxil ($ROO\cdot$) e o alcóxila ($RO\cdot$); e as não radicalares: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), Ozônio (O_3), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), ácido hipocloroso (HClO) e ácido hipobromoso (HOBr) (BARREIROS et al., 2006; SIES E JONES, 2020).

As EROs são produzidas naturalmente em todas as células e organismos, visando manter seus níveis em concentrações fisiológicas, vários mecanismos para controlar a produção e disponibilidade dessas moléculas, incluindo a geração localizada e compartimentada, fontes expossômicas (ambientais), sistemas redox simples, bem como fatores desintoxicantes (Figura 11) (KNOCK, 2019; PARASCANDOLO E LAUKKANEN, 2019). Tendo como sítio primário de produção enzimática endógena as mitocôndrias, mas podendo ser geradas por diversas fontes importantes nesse processo, como a xantina oxidases, citocromo P450, lipoxigenases, mieloperoxidases, além da família Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidases (NADPH Oxidases) (GROEGER et al., 2009; ÖSTMAN et al., 2011, SIES E JONES, 2020).

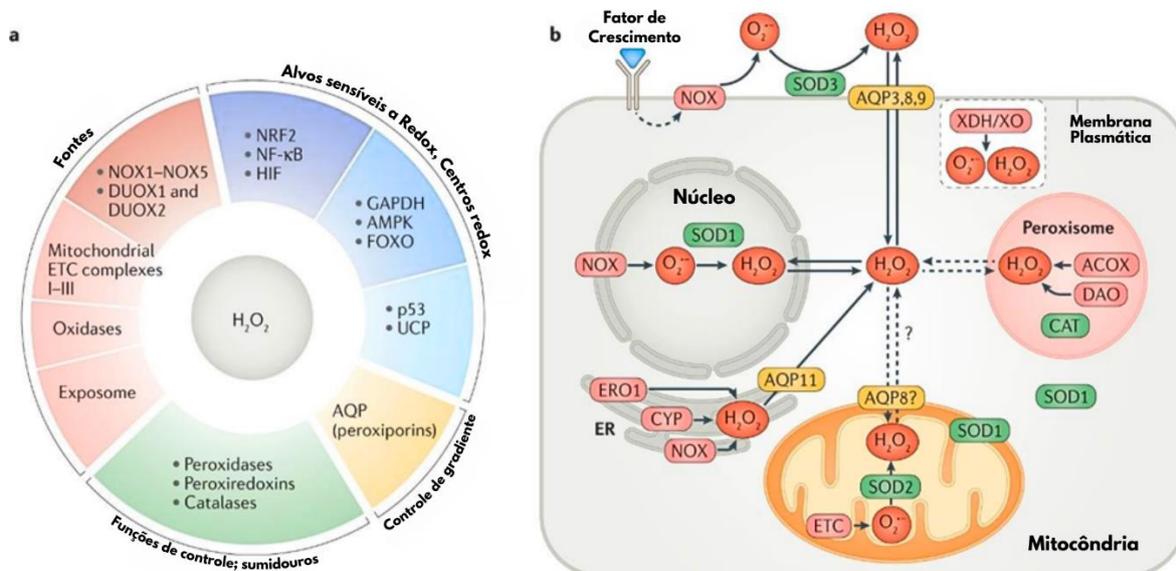


Figura 11. Principais moduladores de EROs e alvos de H₂O₂. (A) Apresentados estão as fontes de H₂O₂ (vermelho), alvos e pontos centrais sensíveis ao redox (azul), aquaporinas (AQPs) “peroxiporinas” (amarelo) e sistemas redox simples (verde). As fontes de H₂O₂ podem incluir oxidases (Tabela 1) e fontes do expossômicas (ambientais), além das NADPH oxidases (NOXs) e mitocôndrias. Alvos sensíveis ao redox servem como pontos centrais para sustentar funções biológicas. Sistemas mais simples podem incluir reações de transferência de elétrons (relé redox) na transferência de oxidante de sinalização. As superóxidos dismutases (SODs; não mostradas) também servem tanto como fonte de H₂O₂ quanto como sumidouro para o radical aniônico superóxido (O₂^{•-}). (B) As principais espécies reativas de oxigênio, O₂^{•-} e H₂O₂, e seus locais subcelulares de geração. Fonte; Adaptado de Sies e Jones (2020).

A comunidade microbiana intestinal também pode ser uma fonte geradora de EROs, pois o combate a patógenos é um desafio constante para o sistema imunológico intestinal, e enzimas como a NOX que produzem as EROs tem um papel importante nesse contexto (GRUENEWALD et al, 2009). Além das fontes intracelulares, outros oxidantes também são gerados como consequência da exposição ambiental cumulativa denominado de expossoma, como hábitos alimentares de alguns organismos, por exemplo, alguns insetos hematófagos (alimentação sanguínea) enfrentam alto estresse oxidativo devido à liberação do ferro pela hemoglobina que pode ocasionar um possível dano oxidativo (SIES E JONES, 2020). Outros fatores não biológicos podem ocasionar estresse oxidativo em invertebrados, como poluentes, fitoquímicos, herbicidas e inseticidas (CHAITANYA et al., 2015; NIEDZWIECKI et al., 2019; WONG et al., 2019).

Dentre as EROS, dois compostos, radical ânion superóxido O₂^{•-} o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), desempenham um papel crucial como mediadores de sinalização redox. São produzidos sob a modulação de fatores de crescimento e citocinas por mais de 40

enzimas, com destaque especial para as NADPH oxidases e a cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias (SIES E JONES, 2020).

O radical $O_2^{\cdot-}$ é uma das EROs mais produzidas em todos os organismos expostos ao ar, por meio da redução do oxigênio por um elétron. De acordo com o contexto biológico, ela pode atuar como uma molécula sinalizadora, exercer o papel tóxico para o organismo ou se decompor naturalmente. O $O_2^{\cdot-}$ tem capacidade de oxidar grupos tiol ($-SH$) por meio de ligações dissulfeto, porém devido à alta atração eletrostática, o $O_2^{\cdot-}$ oxida os cofatores ferroenxofre [Fe-S] a uma taxa alta, liberando ferro, mas sua carga negativa o torna menos apto para sinalização redox via tióis (BARREIROS e DAVID, 2006; WINTERBOURN, 2018). É um radical pouco reativo, porém tem um papel importante na linha de defesas primária de um organismo, pois ao reagir com óxido nítrico, atuando na produção do peroxinitrito, importante agente oxidante e nitrozilante gerado por macrófagos, além disso, quando dismutado naturalmente ou catalisado por SOD gera H_2O_2 e O_2 , servindo como a principal fonte de H_2O_2 (TURRENS, 2004; DAGNELL et al., 2019).

O H_2O_2 é identificado como sendo uma das principais EROs envolvida nas modulações redox celulares, e assim como o cálcio (Ca^{2+}), o H_2O_2 é um agente de sinalização fisiológica pleiotrópica versátil, além de ser produzido como um subproduto da respiração e um produto de numerosas reações metabólicas, podendo ser originado *in vivo* a partir de $O_2^{\cdot-}$ predominantemente por meio da atuação das NADPH oxidases em colaboração com SOD, bem como através da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias e por várias outras enzimas ou por vários estressores, como fatores de crescimento, quimiocinas ou estressores físicos. É uma molécula relativamente estável e possui uma vida média superior à do $O_2^{\cdot-}$ e tem a capacidade de atravessar as membranas celulares por meio de canais transmembranares de aquaporina, transmitindo o sinal redox do local de sua geração até o ponto de destino. (RECZEK E CHANDEL, 2015; BAGUR E HAJNOCZKY, 2017; DI MARZO, 2018).

Essa molécula é um forte oxidante de dois elétrons, mas sua alta energia de ativação limita sua reatividade a poucos alvos biológicos. Ele reage muito lentamente com glutatona, cisteína e metionina, mas sua reatividade em relação à cisteína em proteínas específicas pode aumentar, dependendo da estrutura e ambiente específicos da proteína, além de disso, o H_2O_2 também pode reagir com óxido nítrico ($NO\bullet$), HClO e peroxinitrito, gerando 1O_2 , um forte oxidante (DIAZ-ALBITER et al, 2012).

O principal mecanismo pelo qual a molécula de H_2O_2 exerce sua função como mediadora da sinalização celular envolve a oxidação reversível de resíduos particulares de cisteína, nesse contexto, as principais moléculas afetadas na modulação redox são as proteínas tirosina fosfatases, que trabalham em conjunto com as proteínas tirosina quinases. Elas desempenham um papel crucial na manutenção do estado de fosforilação da tirosina e controlam 38 processos de sinalização, reagindo a estímulos mediados por citocinas e fatores de crescimento (MENG et al., 2002; DI MARZO et al., 2018). Além disso, o H_2O_2 pode atingir sua especificidade para mediar os efeitos de sinalização biológica por meio da oxidação do enxofre (grupos tiol) em proteínas-alvo, que mostram taxas de reação com H_2O_2 várias ordens de grandeza superiores às de outros tióis proteicos. A sinalização redox também pode ocorrer pela oxidação reversível da metionina, pelas selenoproteínas, pela oxidação dos centros metálicos das proteínas e pelos lipídios oxidados (SANTOS et al., 2016; BRIGELIUS-FLOHÉ E FLOHÉ, 2017; ZEIDA et al. 2019)

Diferentes estudos indicam a importância do papel das EROs em relação as células defesas imunes de insetos, propriedades antimicrobianas, controle de carga parasitária, sinalização redox, modulação de enzimas antioxidantes, entre outros processos (SIES E JONES, 2020; GANDARA et al., 2021) porém em alguns artrópodes como *S. calcitrans*, as pesquisas sobre o tema ainda são limitadas.

8.2. Metabolismo Lipídico em Insetos Hematófagos

Os insetos hematófagos, ao longo de sua evolução, desenvolveram estratégias únicas para extrair e metabolizar nutrientes do sangue, um recurso alimentar que impõe significativos desafios bioquímicos. A digestão da hemoglobina libera grandes quantidades de heme, uma molécula com potencial oxidante elevado, o que poderia ser prejudicial se não fossem as adaptações de mecanismos de detoxificação do heme, que se manifestam em processos metabólicos especializados para o manejo dessa substância (GRAÇA-SOUZA et al., 2006). Essa capacidade reflete um exemplo notável de como pressões dietéticas específicas podem moldar vias metabólicas.

A saliva destes insetos contém substâncias anticoagulantes e vasodilatadoras, garantindo o fluxo sanguíneo necessário para a alimentação, além de ter um papel no metabolismo do heme, mitigando sua toxicidade (RIBEIRO e FRANCISCHETTI, 2003).

O desafio de um metabolismo lipídico eficiente em insetos hematófagos é acentuado pela natureza intermitente e volumosa de sua alimentação. Em contraste com a ingestão contínua de alimentos por espécies como *Drosophila melanogaster*, os insetos hematófagos têm refeições episódicas, mas extremamente ricas em nutrientes, chegando a ingerir até dez vezes o próprio peso em uma única refeição (FRIEND, 1965). Apesar do sangue ser pobre em lipídios, seu alto conteúdo proteico fornece um meio para a síntese endógena de ácidos graxos, utilizando os esqueletos de carbono derivados do catabolismo de aminoácidos. Essa habilidade de converter aminoácidos em lipídios é fundamental para a reserva de energia, para a estrutura celular e para o ciclo reprodutivo desses insetos.

No âmbito do metabolismo dos insetos hematófagos, os lipídios ocupam um lugar de destaque, atuando não só como uma fonte primária de energia, mas também como elementos chave em processos fisiológicos diversos, que incluem a metamorfose, a diapausa e a comunicação intraespecífica por meio de feromônios (GONDIM et al., 2018; TOPRAK et al., 2020). Dada a intermitência na disponibilidade de alimento, a capacidade de armazenar lipídios e mobilizá-los de maneira eficiente é crucial para a sobrevivência desses insetos. A mobilização de lipídios de reserva ocorre principalmente através da ação de lipases específicas que hidrolisam triglicerídeos acumulados, liberando ácidos graxos e glicerol. Este processo não só supre a demanda energética durante os períodos de jejum, mas também assegura a disponibilidade de precursores para outras funções biológicas vitais. A regulação da lipólise é finamente controlada por mecanismos de sinalização em cascata, que atuam para garantir o equilíbrio entre armazenamento e uso de energia.

Em insetos, assim como em vertebrados, a mobilização de lipídios segue um caminho metabólico bem caracterizado, envolvendo enzimas críticas para o processamento de triglicerídeos. A triacilglicerol lipase dos adipócitos (ATGL) inicia o processo de lipólise, hidrolisando triacilgliceróis (TAG) em diacilgliceróis (DAG), seguido pela ação de uma lipase hormônio-sensível (HSL), que hidrolisa o DAG a monoacilglicerol (MAG). Por fim, a monoacilglicerol lipase (MAGL) converte MAG em glicerol e ácidos graxos livres, que serão utilizados na produção de energia ou incorporados em novas moléculas para funções biológicas essenciais (FREDRIKSON et al., 1986; ZECHNER et al., 2009). Essas etapas são vitais para os insetos hematófagos, pois a eficiência dessa conversão lipídica impacta diretamente na capacidade de responder a desafios como a necessidade de voo, reprodução e resistência a períodos sem acesso ao sangue, seu único alimento.

As refeições sanguíneas promovem a liberação de uma série de sinais que ativam o metabolismo através de sua ação em diferentes alvos, incluindo o corpo gorduroso, semelhante ao fígado e tecidos adiposos em vertebrados (ROY et al., 2007). A Figura 12 ilustra o processo de metabolismo lipídico em um inseto hematófago pós-ingestão de sangue, abordando as fases de digestão, armazenamento de lipídios e seu uso subsequente nos processos reprodutivos.

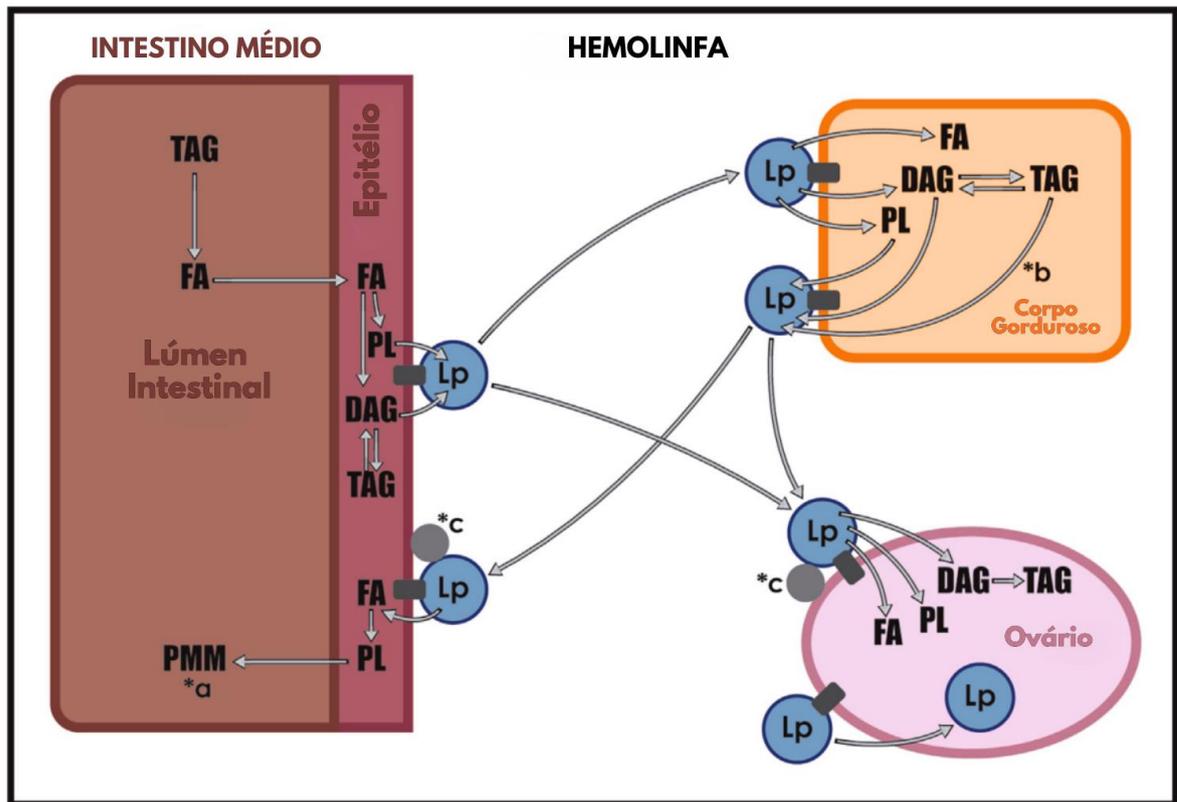


Figura 12. Fluxo lipídico em insetos hematófagos após a ingestão de sangue, retratando a jornada metabólica dos lipídios desde a digestão até o apoio à reprodução. Após a digestão do sangue no intestino médio, os ácidos graxos são absorvidos e convertidos em diacilglicerol (DAG), fosfolipídios (PL) e triacilglicerol (TAG) pelos enterócitos. Estes lipídios são então exportados para a hemolinfática lipoforina (Lp) via um receptor especializado, para serem transportados para o corpo gorduroso e os ovários. No corpo gorduroso, os lipídios se acumulam como TAG dentro das gotículas lipídicas. A lipoforina entrega lipídios para o ovário vitelogênico, processo que varia entre espécies no que diz respeito à internalização da partícula Lp. Dependendo das necessidades fisiológicas do inseto, o corpo gorduroso pode liberar lipídios armazenados de volta para a Lp circulante, destinando-os ao ovário ou ao intestino médio. No *Rhodnius prolixus*, os lipídios destinados ao intestino médio são utilizados para formar membranas perimicrovilares (PMM). Em contraste, no *Aedes aegypti* e outros dípteros, a Lp se enriquece com TAG. Em *Panstrongylus megistus*, a cadeia β da ATP sintase interage com a Lp no intestino médio e no oócito. Esta figura sintetiza observações em insetos vetores estudados. Adaptado de Godim et al., 2018.

No metabolismo de insetos hematófagos, a energia é um recurso vital obtido através da dieta, que é predominantemente composta por sangue. Este fluido é uma fonte rica em proteínas e, até certo ponto, em lipídios e carboidratos, além de micronutrientes como vitaminas e minerais, essenciais para atender às demandas metabólicas dos insetos (HAHN; DENLINGER,

2011). Estes insetos desenvolveram um sistema altamente especializado para o processamento desses nutrientes, com ênfase no armazenamento eficiente de energia, principalmente sob a forma de lipídios no corpo gorduroso. Tal armazenamento é crucial, pois fornece a energia necessária para processos fisiológicos críticos, como a metamorfose, maturação sexual e a produção de gametas, assim como garante a sobrevivência durante períodos de escassez alimentar. As rotas lipogênicas, especificamente as vias do MAG e da Glicerol 3-Fosfato, são responsáveis pelo direcionamento dos lipídios para essas reservas (GONDIM et al., 2018).

Essa energia é armazenada sob a forma de TAG, uma molécula complexa sintetizada a partir de uma molécula de glicerol 3-fosfato e três moléculas de acil-CoA, que são derivados de ácidos graxos. A manipulação dessas reservas é uma função vital, regulada com precisão para assegurar que os estoques de TAG estejam disponíveis para serem mobilizados quando necessário. A proteína Lsd1 desempenha um papel importante na regulação desse processo, prevenindo a ligação de lipases com as gotículas lipídicas e, portanto, controlando a mobilização dos lipídios armazenados (TOPRAK et al., 2020). Esse mecanismo permite que os insetos hematófagos respondam dinamicamente às variações de demanda energética, que podem surgir de alterações fisiológicas, como a metamorfose, ou de desafios ambientais, como a falta de recursos alimentares (CANAVOSO et al., 2001; ARRESE & SOULAGES, 2010; ASSIS et al., 2014; ROMA et al., 2010).

9. MATERIAIS E METÓDOS

9.1. Colônia de *Stomoxys calcitrans*

Os insetos utilizados nos experimentos foram as moscas adultas F1 recém-emergidas na colônia de *S. calcitrans* mantidas no Laboratório de Parasitos e Vetores do ICBS/UFRRJ como descrito em Florencio et al (2020). O sangue bovino utilizado foi obtido de um abatedouro em Barra Mansa, RJ. Os animais são contidos para coleta de moscas do campo de acordo com protocolo aprovado pelo CEUA-IV, nº 7280210922. Sendo utilizados adultos machos e fêmeas na mesma proporção. Os adultos assim que emergidos foram separados em gaiolas distintas, variando em quantidade e condições de acordo com os experimentos a serem realizados. As moscas foram anestesiadas a -20°C por 3 minutos e foram dissecadas em microscópio estereoscópico em lâmina escavada contendo PBS (solução salina tamponada), com o auxílio de pinças (Jewelers forceps, Dumont nº 5, Sigma-Aldrich). Sendo dissecados, intestinos (médio e posterior) e a carcaça (contendo corpo gorduroso).

9.2. Desenho de primers

Após identificar a sequência de aminoácidos de NOX, optamos por desenhar os primers para qPCR com o auxílio do software PRIMER3 (Almeida-Oliveira et al., 2017). Os primers foram planejados para amplificar produtos de PCR com tamanhos entre 120 e 215 pares de bases, e as temperaturas de Melting estabelecidas variaram de 59 a 61°C. Desenvolvemos primers específicos para os genes DUOX1, NOX5, EF1 alfa (Elongation Factor-1 alpha) e Rpl32 (Ribosomal Protein L32), conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Primers específicos para os genes DUOX1, NOX5, EF1 e Rpl32. A tabela mostra os *primers* desenhados para realização dos ensaios de biologia molecular. NOX5 -NADPH Oxidase 5; DUOX1 – Dual Oxidase; EF1 alfa - Elongation Factor-1 alpha; Rpl32 - Ribosomal Protein L32.

GENE	FOWARD	REVERSE	EFICIÊNCIA %	SLOP	R ²
NOX5	CAG GCC CGT GGG ATT TTA GA	GCG AAA GAG CTG CTC CAA AC	98,92	-3,35	0,99704
DUOX1	GGC ATT CTC ACT CAA AGC GTG	CGC ACC AAG TGG CTA TCT ACA	100,45	-3,31	0,99235
EF1 ALF	TGG ATT CCA CCG AAC CACC	GGT CCA TCC CTT GAA CCAG	96,43	-3,41	0,99932
RPI32	CAA CAG AGT ACG TCG TCG CT	ATG GGC GAT TTC ACC ACA GT	104,75	-3,21	0,99731

Os genes NOX e DUOX foram desenhados a partir das sequências encontradas no NCBI e que possuem similaridade com os genes de interesse, cujos produtos gênicos possuem os números de acesso - XP_013108905.1, XP_013108908.1, XP_013100740.1, XP_013100748.1, XP_013100749.1 no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

9.3. Extração de RNA

Para a extração, utilizamos 20 moscas adultas vivas expostas a diferentes estados nutricionais: jejum, alimentação com sacarose a 10% e alimentação com sangue bovino fresco, cada grupo por um período de 24 horas após a emergência. As moscas foram anestesiadas a -20 °C por 4 minutos. A dissecação foi realizada sob microscópio estereoscópico, utilizando pinças de dissecação (Jewelers forceps, Dumont nº 5, Sigma-Aldrich), em lâminas escavadas contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 para evitar a dessecação dos órgãos isolados. Os homogenatos obtidos de 20 intestinos e de 20 corpos gordurosos foram transferidos individualmente para microtubos, cada um contendo 1000 µL de reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

O RNA total foi extraído dessas amostras com TRIzol reagent, seguindo protocolo do fabricante, contendo pequenas adaptações. A quantificação do RNA foi determinada em NanoDrop (ND-1000) (Thermo Scientific) e todas as amostras tiveram taxas de A260/A280 de 2,0±0,1.

9.4. Síntese de cDNA

Após a extração, 1 µg de RNA total foi tratado com 1 U de DNase I (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C, em um volume final de 10 µL. A reação foi interrompida por incubação a 65°C por 10 minutos após a adição de 1 µL de EDTA (50mM). O RNA tratado foi empregado na síntese de cDNA, utilizando random primers e 50 U de reverse transcriptase MultiScribe™ MuLV do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), totalizando um volume final de 20 µL.

9.5. Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

As ampliações por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram conduzidas utilizando o kit Taq PCR Master Mix (Qiagen) sob dois protocolos distintos. O primeiro protocolo consistiu em um ciclo inicial de 2 minutos a 96°C, seguido de 40 ciclos, cada um com 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Esta série de ciclos foi aplicada para análises que empregavam um primer controle. Os genes de referência utilizados foram EF1 alfa e Rpl32, já descritos na tabela 1. O segundo protocolo adotado seguiu o mesmo ciclo inicial de 2 minutos a 96°C, mas com 40 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C, finalizando também com uma extensão de 5 minutos a 72°C, sendo este utilizado para ampliações com primers do gene DUOX e NOX. Estes primers, projetados com o auxílio do software Primer3, possuíam temperaturas de anelamento de 59°C e 61°C. Os produtos resultantes das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,8% e visualizados sob luz ultravioleta (UV).

9.6. PCR Quantitativa (qPCR)

Os ensaios qPCR foram realizados em equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Cada volume final de 12 µL para cada amostra continha 3 µL de cDNA, 6 µL SYBR-Green, 0,48 µL de cada primer e 2,04 µL de H₂O ultrapura. Os poços do controle negativo não continham cDNA. Os genes de referência utilizados foram EF1 alfa e Rpl32, já descritos na tabela 1. A reação foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 2min e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 30s. Uma curva de dissociação de 60-95 °C foi incluída no final de cada execução de RT-qPCR para verificar a especificidade dos amplicons para cada par de primers. Duas réplicas técnicas foram executadas para cada amostra biológica. Além disso, para determinar a eficiência do processo de amplificação, foi realizado a execução de uma curva padrão, utilizando diluições seriadas de 5x (1:1; 1:5; 1:25; 1:625) da amostra.

9.7. Detecção de EROs em intestino de *S. calcitrans*

Para esse experimento foram utilizadas 30 moscas recém-emergidas divididas por igual em gaiolas individuais, sendo alimentadas com sacarose (sugar), com sangue bovino (blood) ou deixadas em jejum (unfed) por um período 24h para todas as condições. Intestinos foram

dissecados e marcados com 50 μM de sonda fluorescente “oxidant-sensitive fluorophore dihydroethidium” (hidroetidina; DHE; Invitrogen), marcadora de EROs. Os intestinos foram lavados com NaCl 0,15 M e imediatamente transferidos para uma lâmina de vidro para análise e intestino médio (IM) e intestino médio posterior (IMP) observados ao microscópio de fluorescência. Os tecidos foram analisados por Microscopia de Fluorescência (Zeiss Axio Observer Microscope) utilizando lente de 20 \times com tempo de exposição de 80 ms para todas as condições. As imagens foram adquiridas em um Zeiss Observer.Z1 com uma Zeiss Axio Cam MrM Zeiss e os dados foram analisados no software AxioVision versão 4.8. O conjunto filtrante (excitação BP 546/12 nm; divisor de feixe FT 580 nm; emissão LP 590 nm) foi utilizado para marcação de DHE.

9.8. Quantificação de Superóxido

A produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi avaliada por meio da redução do citocromo c. Em uma cubeta de quartzo em um volume final de 800 μl , contendo 772 μl PBS 1x, 8 μl de superóxido dismutase (SOD) 300 U/ML, 8 μl de citocromo C 100 μM . A reação foi realizada na presença e na ausência de SOD. Iniciou-se a reação com a adição de 15 μl da amostra de homogenatos contendo intestinos (médio e posterior) e corpos gordurosos de 15 moscas em três diferentes condições: alimentadas com sacarose, com sangue bovino ou deixadas em jejum, por 24h para cada condição após recém-emergirem. E se acompanhou a redução do citocromo c em espectrofotômetro a 550 nm (time scan) por 10 minutos, sendo dividido com os 5 minutos iniciais sem SOD e os 5 minutos finais com a adição de SOD. Para calcular a geração de superóxido, foi feito o seguinte cálculo: mudança na absorbância tempo inicial ($\Delta t_0-t_5 \div 5\text{min}$ das amostras sem SOD - $\Delta t_0-t_5 \div 5\text{min}$ das amostras com SOD), dividido pelo coeficiente de extinção molar do citocromo C de 19,5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ multiplicado pela quantidade de proteínas da amostra. Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes.

9.9. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após diferentes dietas

Para avaliar a produção de H_2O_2 , homogenatos do intestino médio (IM), intestino posterior (IP) e corpo gorduroso (CG) de 8 moscas recém-emergidas foram preparados. As moscas foram submetidas a três diferentes condições nutricionais: alimentação com sacarose,

com sangue bovino fresco ou em jejum, durante 24 horas para cada estado. Aos homogenatos, adicionou-se 180µl de PBS e 6µl de inibidor de protease, seguidos pela maceração das amostras, mantidas em gelo. Posteriormente, 20µl dos homogenatos foram incubados com 60µl de PBS (pH 7,4), 10 µl de peroxidase de rábano (HRP) a 1 U/ml, 5µl de Amplex Red a 1,7 e 5µl de difenileniodônio (DPI) ou DMSO para controles, totalizando 100µl de reação (Consentino et al., 2014). A presença de H₂O₂ foi detectada pela formação do resorufina, um fluoróforo catalisado pelo HRP, e sua leitura foi realizada em fluorímetro nas presenças e ausências de DPI, um inibidor da NADPH oxidase (Riganti et al., 2004). A detecção fluorimétrica ocorreu em 534nm de excitação e 590nm de emissão. As amostras também foram submetidas a uma segunda leitura após uma hora e a quantificação de proteínas foi realizada utilizando 40µl das amostras. Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes

9.10. Quantificação de Grupamentos Tióis Oxidados

O método baseado na oxidação de RSH pelo ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico), conhecido como reagente de Ellman (DTNB), foi utilizado para a medição dos grupamentos tióis oxidados (RSSR) e reduzidos (RSH) (Dubovskiy et al., 2008; Consentino et al., 2014). Uma amostra de 50 µL dos homogenatos IM, IP e PM foi incubada com ácido clorídrico 1 mM por 20 minutos para formar RSH. O pH da reação foi neutralizado com NaOH (pH 7,0), e 50 µL da amostra original e 50 µL da amostra decomposta foram incubados com 500 µL de DTNB 0,1% em PBS por 10 minutos a 37 °C. A absorbância de RSH e RSH + RSSR foi medida em um comprimento de onda de 412 nm usando um leitor de microplacas Plate Chameleon V (Hydrex Solutions, EUA). Uma solução de cisteína foi usada para a preparação de uma curva padrão. A concentração de RSSR foi calculada pela diferença entre a concentração final de grupamentos tióis reduzidos pelo ácido clorídrico (RSH + RSSR) e a concentração inicial da amostra de RSH. Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes

9.11. Ensaio de Superóxido Dismutase (SOD)

Para a medição da atividade da SOD, um alíquota de 20 μL da amostra foi adicionada a um meio reacional contendo PBS, 0,02 U/ml de xantina oxidase, 20 μM de citocromo c, 0,1 mM de EDTA, 5 mM de KCN; 100 μM de xantina foi usado como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 20 μL de xantina ao meio reacional em cubeta de quartzo com volume total de 1000 μL . As leituras foram obtidas seguindo a redução do citocromo c em espectrofotômetro a 550 nm (time scan) a cada 30 segundos. Este método utiliza o sistema xantina-xantina oxidase como gerador de radicais superóxido, que são utilizados para a oxidação do citocromo c. A atividade da superóxido dismutase é determinada pela capacidade desta enzima de competir com o citocromo c pelo superóxido. Assim, uma unidade de atividade da SOD corresponde a uma inibição de 50% da reação entre superóxido e citocromo c (Mccord e Fridovich, 1969; Consentino et al., 2014). Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes

9.12. Ensaio de Catalase

Para medir a atividade da catalase, 15 μL das amostras foram adicionadas a um meio reacional contendo 100 mM de Tris-HCl (pH 7.4). A reação foi iniciada pela adição do substrato, 8 mM de H_2O_2 . A dismutação do H_2O_2 foi monitorada em uma cubeta de quartzo em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 240 nm por 5 minutos com leituras a cada 60s, adaptando o descrito por Consentino et al. (2014). A atividade da catalase foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 , $36 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, e é expressa em mmol de H_2O_2 por mg de proteína por minuto. Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes

9.13. Ensaio de Glutathione Peroxidase (GPx)

Para medir a atividade da GPx, 15 μL das amostras foram adicionadas a um meio reacional contendo PBS (pH 7.4), 100 mM de azida de sódio, 1 mM de EDTA, 1 mM de GSH, 0,1 mM de NADPH, 2 U/ml de glutathione redutase; 0,25 mM de H_2O_2 foi usado como substrato. A amostra (15 μL) foi pré-incubada no meio, e a reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio. A oxidação de NADPH foi monitorada em uma cubeta de quartzo usando um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm por 300 s; leituras foram

obtidas a cada 60 s, conforme descrito por Consentino et al. (2014). A atividade da GPx foi calculada subtraindo a absorbância do branco (na ausência da amostra) e usando o coeficiente de extinção molar do NADPH, $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; a atividade é expressa em nmol de NADPH por mg de proteína por minuto. Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes

9.14. Determinação de Triacilglicerol (TAG)

Os níveis de Triacilglicerol foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico (reação de Trinder). Para este ensaio, foi utilizado o kit Triglicérides Liquiform (Labtest, ref. 87-2/100). A concentração mínima detectável é de 3 mg/dl, com coeficiente de variação interensaio $< 2,0\%$. Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes

9.15. Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade inicialmente, média e desvio padrão. Se os dados passarem no teste de normalidade, os grupos serão submetidos ao teste de One-way ANOVA ou Two-way ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Valor de significância será considerado como $P < 0,05$. O software de estatística usado foi o GraphPad PRISM 6.0 (San Diego, CA, Estados Unidos).

10. RESULTADOS

10.1. Expressão Relativa de genes NOX em *S. calcitrans*

Para determinar os padrões de expressão das NOX, especificamente das isoformas NOX5 e DUOX1, em diferentes órgãos de *S. calcitrans* e seu potencial papel na produção de EROs, na fisiologia, no desenvolvimento e na infecção do inseto, foram projetados iniciadores baseados em sequências obtidas através de análises *in silico*. Realizamos ensaios de qPCR em nossos experimentos para detectar a presença desses genes no intestino e no corpo gorduroso de *S. calcitrans* submetidos a diferentes estados nutricionais durante um período de 24 horas após a emergência. As condições incluíram moscas alimentadas com sacarose, em jejum e alimentadas com sangue. Adicionalmente, avaliamos a eficiência dos iniciadores projetados. Os resultados demonstraram que o número de moléculas dobrava em consonância com as diluições realizadas, evidenciando uma eficiência de expressão de 98,92% para NOX e 100,45% para DUOX.

Nossos resultados indicaram a expressão relativa dos genes NOX5 e DUOX em moscas-dos-estábulo submetidas a diferentes estados nutricionais 24 horas após a emergência, especificamente no intestino médio (IM) (Fig. 13). Ao analisarmos a expressão dessas enzimas, notamos uma expressão diminuída de DUOX em comparação à de NOX5.

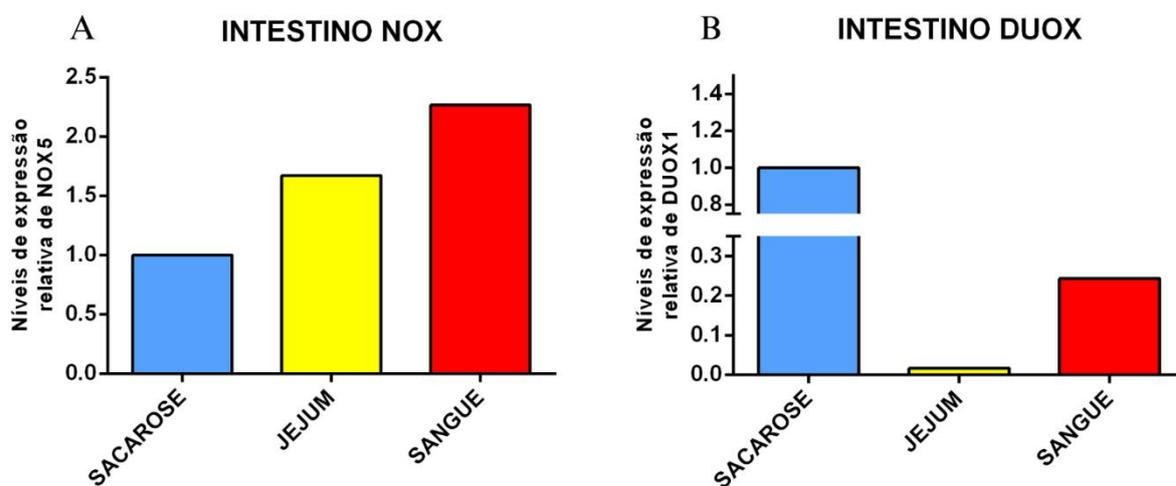


Figura 13. Expressão relativa dos genes de NADPH oxidase no intestino de *Stomoxys calcitrans* sob diferentes estados nutricionais. No Gráfico A (Intestino NOX), as barras azuis mostram a expressão do gene NOX5 em moscas alimentadas com sacarose, as amarelas em jejum e as vermelhas após alimentação com sangue, todas 24 horas após emergência. Gráfico B (Intestino DUOX) apresenta a expressão do gene DUOX1 seguindo a mesma representação de estados nutricionais de A. As alterações nas barras refletem as diferenças na expressão gênica de NOX5 e DUOX1 associadas a cada condição nutricional testada.

A expressão de NOX5 é aumentada em resposta ao jejum e ainda mais ao alimentar-se de sangue. Isso pode indicar que NOX5 está envolvido na resposta ao estresse nutricional ou na digestão do sangue. Já em DUOX1 tem sua expressão drasticamente reduzida no jejum, sugerindo que pode ser menos importante ou inibido neste estado nutricional. A normalização da expressão após a alimentação de sangue sugere que sua expressão é mantida em níveis basais quando as moscas estão alimentadas, independentemente do tipo de alimentação.

Ao analisarmos os níveis de expressão no corpo gorduroso (CG) (Fig. 14), observamos que a tendência anterior se mantém, com a expressão do gene NOX5 superando a de DUOX. Os genes NOX5 apresentaram níveis de expressão semelhantes, tanto nas moscas em jejum quanto naquelas alimentadas com sangue. Em DUOX 1 os níveis são aparentemente semelhantes.

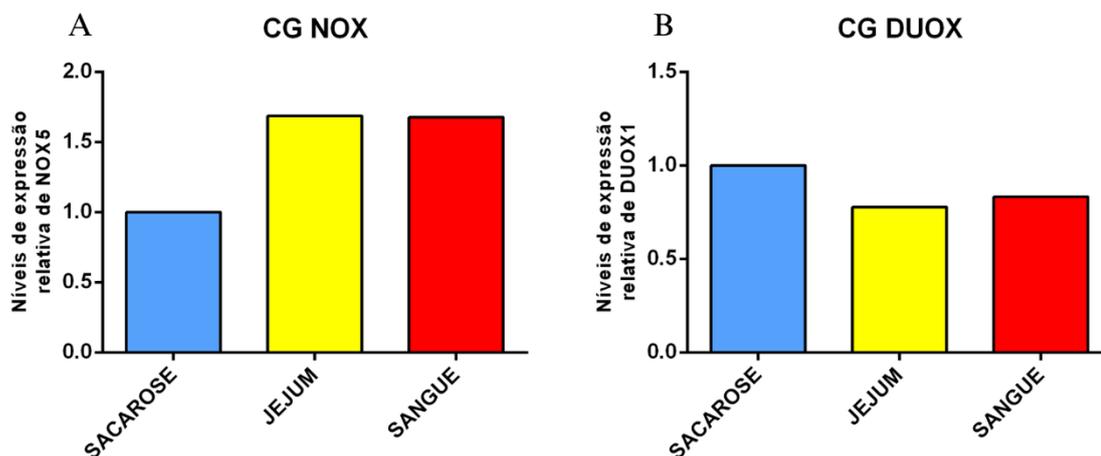


Figura 14. Expressão relativa dos genes de NADPH oxidase no Corpo Gorduroso (CG) de *Stomoxys calcitrans* em resposta a diferentes estados nutricionais. No Gráfico A (CG NOX), as barras azuis representam moscas alimentadas com sacarose, as barras amarelas indicam moscas em jejum e as barras vermelhas moscas alimentadas com sangue, todas 24 horas após a emergência. Gráfico B (CG DUOX) segue a mesma representação

de cores para os estados nutricionais, exibindo a expressão do gene DUOX1. As alterações nas barras refletem as diferenças na expressão gênica de NOX5 e DUOX1 associadas a cada condição nutricional testada.

No Corpo Gorduroso de *S. calcitrans*, os níveis de expressão do gene NOX5 apresentaram aumento tanto em condições de jejum quanto após alimentação com sangue, porém com pouca diferença com as alimentadas com sacarose. Mantendo níveis semelhantes de expressão. Por outro lado, a expressão do gene DUOX1 foi menor. Registrou-se uma diminuição leve nas moscas em jejum, com subsequente retorno aos níveis comparáveis aos do grupo controle nas moscas que se alimentaram de sangue.

10.2. Geração de Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em diferentes condições alimentares

Compreendendo a importância do intestino médio (IM) e do intestino posterior (IP) como locais de entrada primários para nutrientes e uma variedade de microrganismos, procedeu-se à análise da geração do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) nesses tecidos. Adicionalmente, examinou-se o corpo gorduroso, dada sua relevância em múltiplos processos fisiológicos em insetos. Este tecido é crucial para o metabolismo intermediário e a produção de componentes da hemolinfa. Também está envolvido no estresse oxidativo, geração de EROs, regulação redox, e na síntese de peptídeos antimicrobianos. Conecta-se igualmente com a detoxificação e com funções vitais do sistema imunológico (SCANDALIOS, 2005; HU et al., 2016; BAYLIAK et al., 2019)

Para avaliar a produção de $O_2^{\cdot-}$ em tecidos de *S. calcitrans* submetidos a distintos estados nutricionais e dietas, conduziram-se testes para quantificar essa ERO por meio de ensaios que envolvem a oxidação do citocromo c pelo $O_2^{\cdot-}$ presente nas amostras. Homogenatos contendo diferentes segmentos do intestino, tanto médio (IM) quanto posterior (IP), bem como do corpo gorduroso (CG), foram preparados. Cada conjunto de moscas foi categorizado em três diferentes condições por um período de 24 horas após a emergência das pupas, dividindo-as em grupos em jejum, alimentados com sacarose e alimentados com sangue.

Nossos resultados iniciais demonstraram uma alta produção de $O_2^{\cdot-}$ no IM de moscas em jejum e alimentadas com sangue que tiveram resultados praticamente iguais, contudo o resultado foi em baixo ao analisarmos as moscas alimentadas apenas com sacarose (Figura 15). O resultado demonstra avaliação por tempo, pois quanto maior a velocidade da redução

do citocromo c maior será a produção de $O_2^{\cdot-}$ na amostra. Em outros tecidos ocorreu uma menor quantificação da enzima nessas condições, porém foi observado maiores níveis produção de $O_2^{\cdot-}$ no IP e CG das moscas alimentadas apenas com açúcar, apresentando uma diferença de aproximadamente 28% quando comparamos o IP dessas moscas com o IM das moscas em jejum e 11% em relação ao IM das alimentadas com sangue.

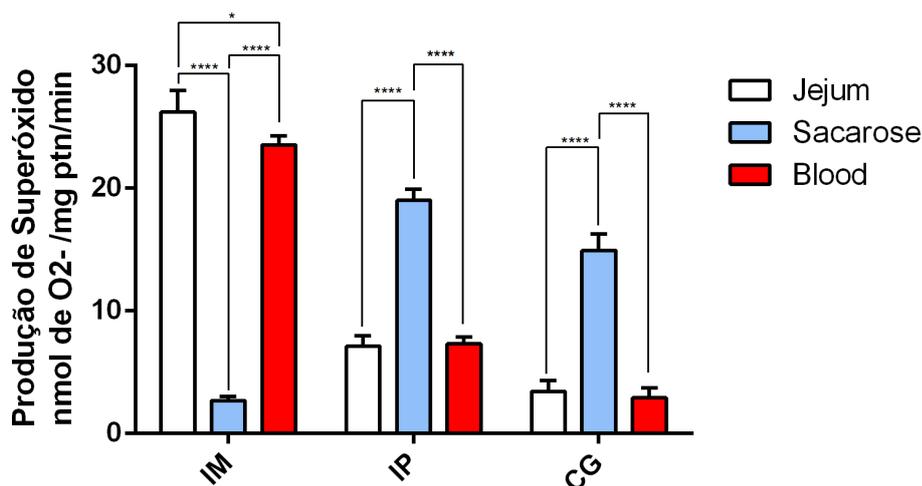


Figura 15. Geração de Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em diferentes tecidos de *S. calcitrans* expostos a condições de dietas específicas. A atividade de $O_2^{\cdot-}$ foi medida em homogenatos do intestino médio (IM), intestino posterior (IP) e corpo gorduroso (CG, expostas por um período de 24h logo após emergirem a diferentes condições: em jejum (barras brancas), alimentadas com sacarose (barras azuis) e alimentadas com sangue (barras vermelhas). Amostras (15 μ l) foram incubadas em uma cubeta de quartzo contendo 772 μ l PBS 1x, 8 μ l de superóxido dismutase (SOD) 300 U/ml, 8 μ l de citocromoc 100 μ M. Avaliando o tempo de redução do citocromo c. As diferenças estatísticas foram determinadas através de One-way ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os valores representam a média \pm SEM de pelo menos três experimentos independentes. (* $p < 0.05$. ** $p < 0.001$. *** $p < 0.0001$ **** $p < 0.0001$)

As análises comparativas entre os tecidos das moscas de um mesmo grupo evidenciaram a produção de $O_2^{\cdot-}$ por cada amostra de homogenato. Os resultados indicam que o intestino médio (IM) e o intestino posterior (IP) apresentam uma produção mais elevada de $O_2^{\cdot-}$ nas distintas condições alimentares em comparação ao corpo gorduroso (CG). A única exceção foi observada no IM das moscas alimentadas com sacarose, onde a geração dessa ERO ocorreu em níveis inferiores, porém nos outros tecidos os níveis de $O_2^{\cdot-}$ em dietas compostas de sacarose foram maiores.

10.3. Produção de Peróxido de hidrogênio

Para quantificarmos a geração de H_2O_2 , um tipo de espécie reativa de oxigênio (ERO), utilizamos moscas adultas recém emergidas alimentadas com sacarose, com sangue bovino

ou deixadas em jejum, submetidas a essas condições por 24h. Foram dissecadas um grupo de 8 moscas adultas, para cada condição, e homogenatos de tecidos do intestino médio (IM), intestino posterior (IP) e corpo gorduroso (CG) foram utilizados para quantificação da produção de H_2O_2 , sendo analisada utilizando um marcador fluorescente (Amplex Red) e medida em fluorímetro na ausência ou presença de difenilenoiodônio (DPI), um potente inibidor de flavoenzimas, como a DUOX, por um período de 1h (Figura 16).

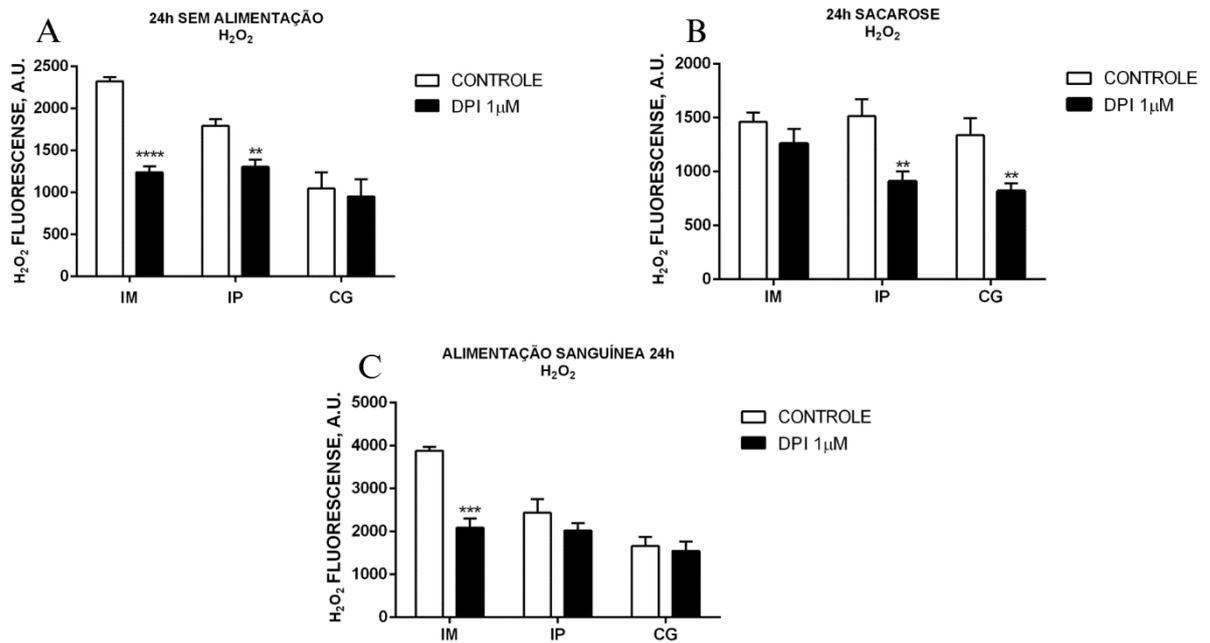


Figura 16. Quantificação de H_2O_2 em diferentes grupos de homogenatos de tecidos de *S. calcitrans* expostos a diferentes condições alimentares. (A) Análise de diferentes homogenatos de órgãos *S. calcitrans* em jejum por 24h após recém-emergirem, tratados (barras pretas) ou não tratados (barras brancas) com difenilenoiodônio (DPI). (B) Análise de diferentes homogenatos de órgãos *S. calcitrans* alimentadas com sacarose por 24h após recémemergirem, tratados (barras pretas) ou não tratados (barras brancas) com DPI. (C) Análise de diferentes homogenatos de órgãos *S. calcitrans* alimentadas com sangue por 24h após recém-emergirem, tratados (barras pretas) ou não tratados (barras brancas) com DPI. Os valores representam a média \pm SEM de pelo menos três experimentos independentes. (* $p < 0.05$. ** $p < 0.001$. *** $p < 0.0001$ **** $p < 0.0001$)

Esses resultados revelam padrões de produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos três grupos estudados. No intestino médio (IM) de moscas em jejum (A) e daquelas alimentadas com sangue (C), observou-se uma diminuição acentuada nos níveis de H_2O_2 em comparação com os tecidos tratados com DPI. Entretanto, no IM das moscas que consumiram

sacarose, não houve diferença. Já no caso das moscas alimentadas com sacarose a 10% por 24 horas (B), os resultados diferiram em relação aos demais grupos. Os níveis de H₂O₂ mostraram diferenças significativas entre o controle e o tratamento no intestino posterior (IP) e no corpo gorduroso (CG). Uma variação também foi notada no IP das moscas em jejum. Não se detectaram diferenças significativas nos níveis de H₂O₂ no corpo gorduroso das moscas alimentadas com sangue ou em jejum.

Na avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) entre os diferentes tecidos lado a lado (Figura 17), observou-se que os níveis são significativamente mais elevados no intestino médio (IM) das moscas alimentadas com sangue, apresentando grande disparidade em comparação com os outros grupos, especialmente em relação às moscas que foram alimentadas exclusivamente com sacarose. A diferença entre esses grupos chega a quase 50%.

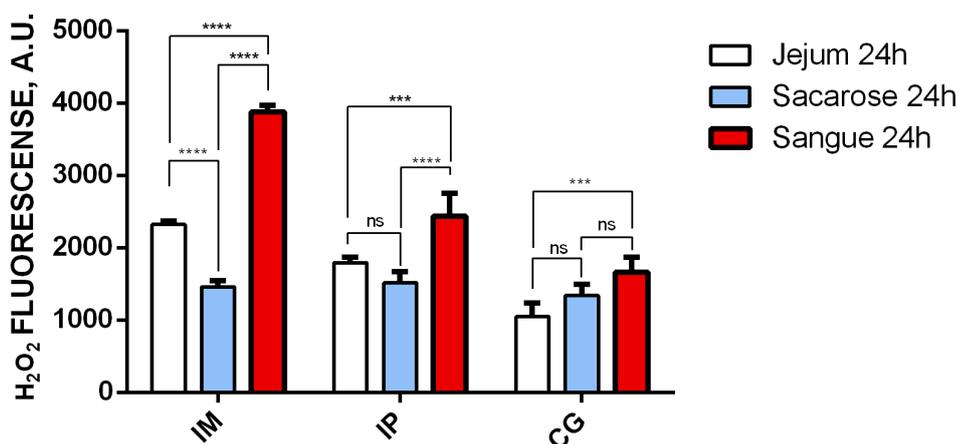


Figura 17. Comparação da produção de H₂O₂ entre diferentes órgãos divididos em grupos de homogenatos de *S. calcitra* expostos a diferentes condições alimentares. O gráfico demonstra a comparação da produção H₂O₂ entre homogenatos de intestino médio (IM), intestino posterior (IP) e corpo gorduroso (CG) de *S. calcitrans* expostos a três diferentes condições: em jejum (barras brancas), alimentadas com sacarose (barras azuis) e alimentadas com sangue (barras vermelhas) após 24h de emergirem como indivíduos adultos. As diferenças estatísticas foram determinadas através de Two-way ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os valores representam a média ± SEM de pelo menos três experimentos independentes. (* $p < 0.05$. ** $p < 0.001$. *** $p < 0.0001$ **** $p < 0.0001$)

A variação nos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) entre os grupos tratados, observada após 1 hora, também é evidenciada em gráficos específicos para cada tecido. Notavelmente, o intestino médio (IM) das moscas alimentadas com sangue exibe uma produção substancialmente maior dessas espécies reativas de oxigênio (EROs) em comparação ao IM das moscas alimentadas com sacarose e àquelas em jejum, com a produção sendo até duas vezes maior do que nestes últimos grupos. Além disso, ao examinar individualmente os órgãos,

percebe-se que o IM das moscas em jejum apresenta diferenças estatísticas significativas em relação aos intestinos das moscas alimentadas com sacarose. No intestino posterior (IP), há um declínio mais acentuado entre os grupos em jejum quando comparados ao grupo alimentado com sangue.

Quando os resultados são normalizados pelo corpo gorduroso, constata-se que os níveis de produção de H_2O_2 são semelhantes entre as condições analisadas, com a exceção da comparação entre jejum e alimentação sanguínea. Essa produção de H_2O_2 pode estar associada tanto à ação das NADPH oxidases (NOX) em conjunto com superóxido dismutases (SOD), que convertem o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 , quanto à atividade de diversas outras enzimas.

10.4. Oxidação dos Grupos Tióis em *Stomoxys calcitrans* em Resposta a Diferentes Estados Nutricionais

A análise dos níveis de oxidação dos grupos tióis nos tecidos de *S. calcitrans* revelou uma influência significativa do estado nutricional, conforme demonstrado na Figura 18. Observou-se que, no Intestino Médio (IM), as moscas que se alimentaram de sangue apresentaram um aumento notável na oxidação dos tióis (barra vermelha) em comparação com aquelas alimentadas com sacarose (barra azul) e as em jejum (barra amarela), com valores de RSH/RSSR significativamente elevados.

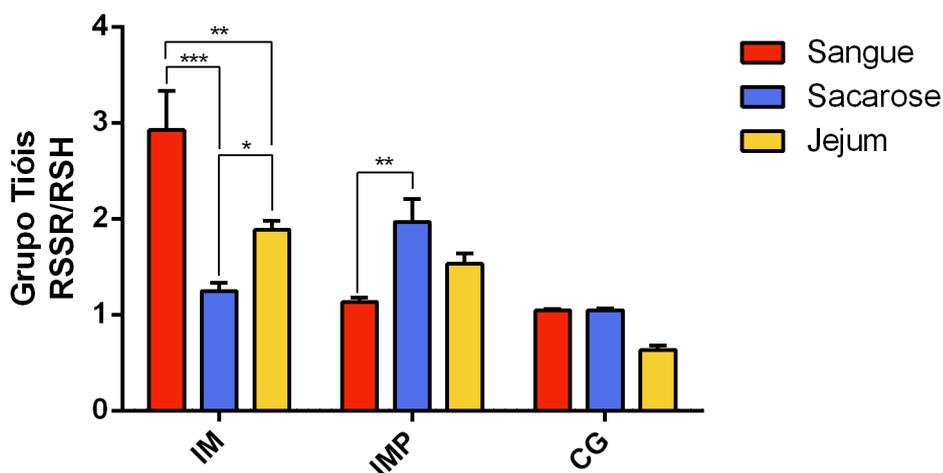


Figura 18. Variação na oxidação dos grupos tióis em *Stomoxys calcitrans* submetidas a diferentes estados nutricionais. O gráfico representa a quantidade de grupos tióis oxidados nos tecidos de Intestino Médio (IM), Intestino Posterior (IMP) e Corpo Gorduroso (CG) após 24 horas de alimentação com sangue (barras vermelhas), sacarose (barras azuis) e em jejum (barras amarelas). As alturas das barras indicam os níveis de RSH/RSSR medidos. Os dados sugerem uma maior oxidação dos tióis no IM em moscas alimentadas com sangue, enquanto

no IMP, a alimentação com sangue resulta em uma oxidação reduzida quando comparada com a sacarose. (* $p < 0.05$. ** $p < 0.001$. *** $p < 0.0001$ **** $p < 0.0001$)

Contudo, no Intestino Posterior (IMP), as moscas alimentadas com sangue mostraram um nível de oxidação dos tióis significativamente reduzido quando comparado com as alimentadas com sacarose. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre moscas alimentadas com sangue e aquelas em jejum no IMP.

No tecido do Corpo Gorduroso (CG), os níveis de oxidação dos grupos tióis mantiveram-se baixos e não apresentaram variação significativa entre os diferentes estados nutricionais.

10.5. Atividade de SOD em *S. calcitrans*

Prosseguindo com a nossa investigação sobre as respostas bioquímicas de *S. calcitrans* ao estresse oxidativo, focamos na atividade da superóxido dismutase (SOD), uma enzima crucial que atua na primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo.

A atividade da SOD foi quantificada em três tecidos distintos, Intestino Médio (IM), Intestino Posterior (IP) e Corpo Gorduroso (CG), após 24 horas em que as moscas foram mantidas em jejum, alimentadas com sacarose ou alimentadas com sangue (Figura 19). Os níveis de atividade são expressos em unidades por micrograma de proteína.

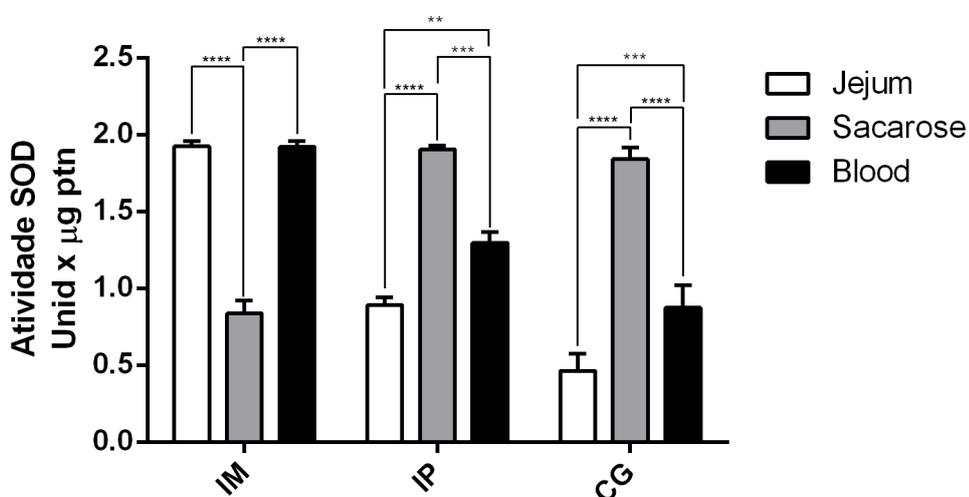


Figura 19. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em *Stomoxys calcitrans* em resposta a diferentes regimes nutricionais. A atividade da SOD, expressa em unidades por micrograma de proteína, é apresentada nos tecidos Intestino Médio (IM), Intestino Posterior (IP) e Corpo Gorduroso (CG). Grupos de moscas foram submetidos a jejum (barras brancas), alimentadas com sacarose (barras cinzas) e com sangue (barras pretas) durante 24 horas. Os símbolos de asterisco indicam significância estatística nos níveis de atividade da SOD entre os diferentes estados nutricionais: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.0001$.

Observamos que, no IM, moscas em jejum e alimentadas com sangue mostraram uma atividade de SOD significativamente superior comparativamente às alimentadas com sacarose, sugerindo uma resposta antioxidante mais pronunciada nestas condições nutricionais. Isso pode estar relacionado com os elevados níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio anteriormente detectados, o que implica uma maior necessidade de atividade da SOD para a detoxificação de radicais livres.

No IP, a atividade da SOD nas moscas alimentadas com sacarose foi maior que a observada no grupo em jejum, mas inferior àquela das moscas alimentadas com sangue. Esta diferença pode refletir um ajuste metabólico específico aos diferentes substratos energéticos e ao consequente estresse oxidativo.

No CG, as moscas em jejum e sangue apresentaram a menor atividade de SOD, em contraste acentuado com as moscas alimentadas com sacarose. Estes resultados indicam que o Corpo Gorduroso pode ser um tecido chave na modulação da resposta antioxidante frente a diferentes condições nutricionais, particularmente em resposta ao metabolismo ativo após a alimentação.

10.6. Avaliação da Atividade Antioxidante em *S. calcitrans*: Catalase e Glutathione Peroxidase

Em complemento aos estudos de moléculas pró-oxidantes anteriormente discutidos, a presente seção expõe uma análise detalhada das defesas antioxidantes em *S. calcitrans*, com ênfase na atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase. Estas enzimas desempenham funções vitais na proteção celular contra danos oxidativos, catalisando a decomposição de peróxidos e impedindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Portanto, a medição de suas atividades é crucial para entender como esses insetos enfrentam o estresse oxidativo decorrente de diferentes condições nutricionais.

A atividade da catalase em três tecidos distintos de *Stomoxys calcitrans*: Intestino Médio (IM), Intestino Posterior (IP) e Corpo Gorduroso (CG) (Figura 20). Os insetos foram

submetidos a três regimes alimentares por um período de 24 horas após emergirem: jejum, alimentação com sacarose e alimentação com sangue.

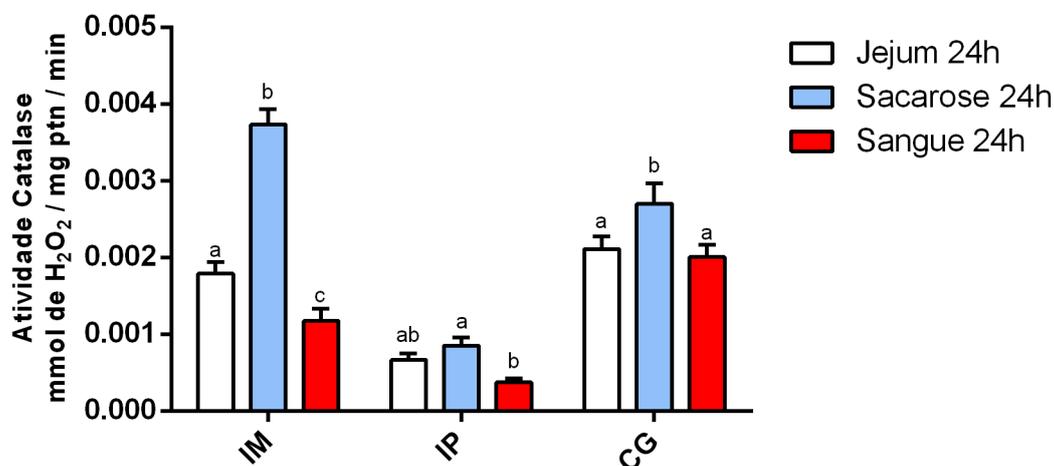


Figura 20. Atividade da catalase em *Stomoxys calcitrans* submetidas a diferentes estados nutricionais. O gráfico apresenta a atividade enzimática nos tecidos Intestino Médio (IM), Intestino Posterior (IP) e Corpo Gorduroso (CG) medida como milimoles de peróxido de hidrogênio degradados por minuto por miligrama de proteína (mmol H₂O₂/min/mg proteína). Os insetos foram divididos em grupos que passaram por jejum (barras brancas), foram alimentados com sacarose (barras azuis) e alimentados com sangue (barras vermelhas), todos por um período de 24 horas após a emergência. As letras acima das barras (a, b, c) indicam diferenças significativas entre os tratamentos, com grupos distintos não compartilhando a mesma letra conforme análise estatística apropriada.

Os resultados mostraram que, no IM, a atividade da catalase foi significativamente maior nas moscas alimentadas com sacarose, comparativamente aos grupos em jejum e alimentados com sangue. Contrastando com isso, no IP, a atividade da catalase foi consideravelmente reduzida em todos os grupos, principalmente nas alimentadas com sangue, quando comparado com os outros grupos nutricionais, que mantiveram níveis similares entre si. No CG, a atividade da catalase nas moscas alimentadas com sacarose os níveis de catalase foram mais altos em relação aos outros grupos. Já alimentação com sangue não apresentou diferenças significativas frente às moscas em jejum, mas se distinguiu do grupo alimentado com sacarose.

Após a análise da atividade catalítica da catalase, voltamos nossa atenção para a atividade da glutathione peroxidase (GPx), uma enzima essencial na redução de peróxidos lipídicos e hidroperóxidos, funcionando como um biomarcador da resposta antioxidante intracelular. Este estudo foi conduzido paralelamente para avaliar como os mesmos estados

nutricionais afetam outro componente vital do sistema de defesa antioxidante em *S. calcitrans*.

Os dados demonstram a atividade de GPx nos tecidos Intestino Médio (IM), Intestino Posterior (IP) e Corpo Gorduroso (CG), após 24 horas de exposição a três diferentes regimes alimentares: jejum, sacarose e sangue (Figura 21). As atividades enzimáticas foram quantificadas em termos de nanomoles de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteína (nm de NADPH/min/mg proteína).

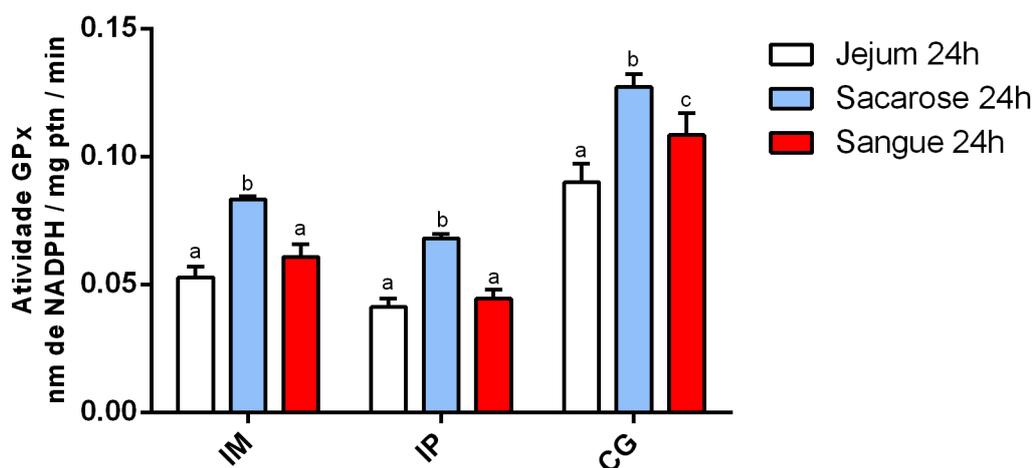


Figura 21. Atividade da glutatona peroxidase (GPx) em tecidos de *Stomoxys calcitrans* submetidas a diferentes condições nutricionais. A atividade da GPx é medida em nanomoles de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteína (nm de NADPH/min/mg proteína) nos tecidos do Intestino Médio (IM), Intestino Posterior (IP) e Corpo Gorduroso (CG). Os grupos de moscas foram submetidos a jejum (barras brancas), alimentação com sacarose (barras azuis) e alimentação com sangue (barras vermelhas) por um período de 24 horas após emergirem. As letras 'a', 'b' e 'c' indicam diferenças estatísticas significativas entre as condições nutricionais dentro de cada tecido, onde grupos que não compartilham a mesma letra diferem significativamente entre si.

No Intestino Médio, as moscas alimentadas com sacarose exibiram uma atividade de GPx significativamente superior em comparação com os outros grupos, implicando que a ingestão de sacarose pode manter níveis antioxidantes nesse tecido. No Intestino Posterior, a mesma tendência foi observada, com a sacarose induzindo a maior atividade enzimática.

No Corpo Gorduroso, a alimentação tanto com sacarose quanto com sangue aumentou de forma marcante a atividade de GPx em comparação com o grupo em jejum (letra 'a'). Este aumento pode ser um reflexo da demanda aumentada por mecanismos antioxidantes para neutralizar o estresse oxidativo proveniente do metabolismo ativo dos nutrientes absorvidos ou pela falta deles.

10.7. Produção de EROs em intestinos de *S. calcitrans*

Considerando os resultados anteriores e observando a produção de EROs em partes dos intestinos de *S. calcitrans* e sua variação de acordo com as condições os quais as moscas utilizadas foram expostas, buscando complementar as análises iniciais, decidimos avaliar a produção EROs no epitélio do intestino médio de moscas recém-emergidas colocadas em período de 24h nas seguintes condições: em jejum, alimentadas com sacarose e com sangue bovino. A produção de EROs foi observado pelo aumento da fluorescência da sonda DHE sensível a EROs (Figura 17, 18 e 19).

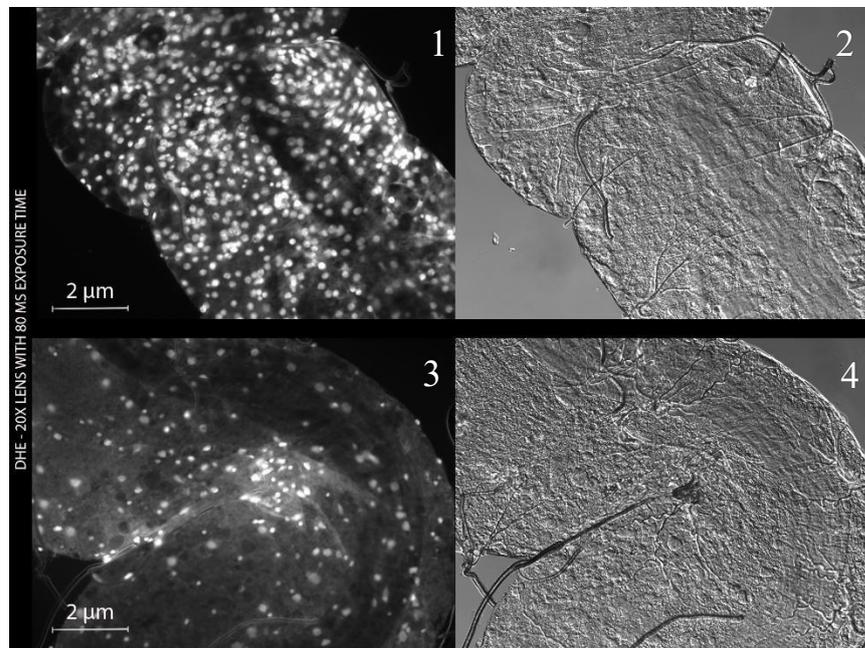


Figura 22. Geração de EROs em intestino de moscas *S. calcitrans* em jejum por 24h após emergirem. O intestino dissecado foi incubado a 28°C por 30 min em solução contendo 100 µM de DHE. 1 – IM, 2 – IM alto contraste, 3 – IP, 4 – IP alto contraste. Os pontos brancos indicam a produção de EROs, quanto maior a fluorescência maior a produção. Os tecidos foram analisados por Microscopia de Fluorescência (Zeiss Axio Observer Microscope) utilizando lente de 20× com tempo de exposição de 80 ms para todas as condições. As imagens são representativas de um total de 10 intestinos analisados. Quantificação de fluorescência utilizando o software Zeiss Axio Observer Quantification. barra de escala 2 µm.

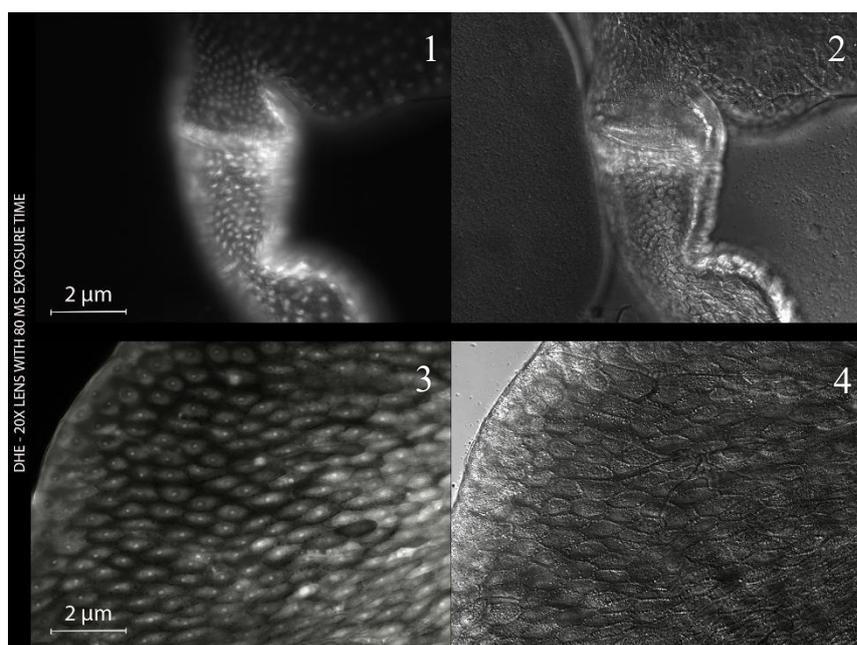


Figura 23. Geração de EROs em intestino de moscas *S. calcitrans* alimentadas com sangue por 24h após emergirem. O intestino dissecado foi incubado a 28°C por 30 min em solução contendo 100 μ M de DHE. 1 – IM, 2 – IM alto contraste, 3 – IMP, 4 – IMP alto contraste. Os pontos brancos indicam a produção de EROs, quanto maior a fluorescência maior a produção. Os tecidos foram analisados por Microscopia de Fluorescência (Zeiss Axio Observer Microscope) utilizando lente de 20 \times com tempo de exposição de 80 ms para todas as condições. As imagens são representativas de um total de 10 intestinos analisados. Quantificação de fluorescência utilizando o software Zeiss Axio Observer Quantification. barra de escala 2 μ m.

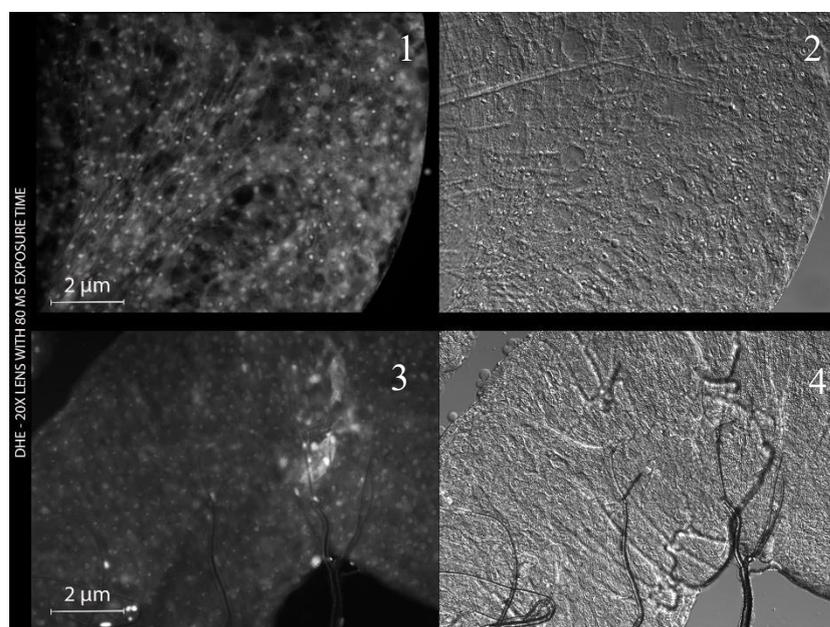


Figura 24. Geração de EROs em intestino de moscas *S. calcitrans* alimentadas com sacarose por 24h após emergirem. O intestino dissecado foi incubado a 28°C por 30 min em solução contendo 100 μ M de DHE. 1 – IM, 2 – IM alto contraste, 3 – IP, 4 – IMP alto contraste. Os pontos brancos indicam a produção de EROs, quanto maior a fluorescência maior a produção. Os tecidos foram analisados por Microscopia de Fluorescência (Zeiss Axio Observer Microscope) utilizando lente de 20 \times com tempo de exposição de 80 ms para todas as condições. As imagens são representativas de um total de 10 intestinos analisados. Quantificação de fluorescência utilizando o software Zeiss Axio Observer Quantification. barra de escala 2 μ m.

Na avaliação da produção de EROs observou-se o aumento dramático na geração dessas moléculas em intestinos de moscas em jejum (Figura 17) e alimentadas com sangue (Figura 18), observado pelo aumento da fluorescência da sonda DHE sensível a EROs. Esse aumento foi observado na zona opaca localizado na parte final do intestino médio se ligando com início do intestino posterior, que é composta por diversas vesículas secretoras que sintetizam e secretam diversas proteases digestivas, enzimas podem contribuir para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como um subproduto de suas atividades metabólicas. Além disso, devemos levar em consideração a alimentação sanguínea e a inanição das moscas.

No intestino de moscas alimentadas com sacarose (Figura 19), apesar de uma pequena fluorescência que indica produção de EROs, os níveis foram bem menores quando comparamos as imagens, corroborando com os resultados anteriores de produção de EROs.

10.8. Metabolismo de TAG em *S. calcitrans*

Nossas análises buscaram, por meio da quantificação de triacilglicerol (TAG) em diferentes tecidos compreender a relação entre a atividade redox e a metabolização de lipídios em *S. calcitrans*. Esta análise é particularmente relevante em virtude dos resultados anteriores que indicaram níveis elevados de peróxido de hidrogênio e superóxido, assim como alterações na atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx), que podem influenciar o metabolismo lipídico. Estes fatores podem desempenhar um papel crucial nas rotas de síntese e degradação de lipídios (Figura 25).

No Intestino Médio (IM), as moscas alimentadas com sacarose apresentaram um aumento na concentração de TAG comparativamente às moscas em jejum, com significância estatística. Este aumento, embora relevante, é eclipsado pelos níveis ainda mais elevados de TAG nas moscas alimentadas com sangue, marcados por uma diferença extremamente significativa. A marcante acumulação de TAG em moscas alimentadas com sangue pode refletir um mecanismo de adaptação metabólica onde, perante o estresse oxidativo mais intenso gerado pela alimentação rica em proteínas do sangue, a síntese de TAG é potencialmente amplificada como forma de sequestrar ácidos graxos livres, reduzindo assim o risco de peroxidação lipídica.

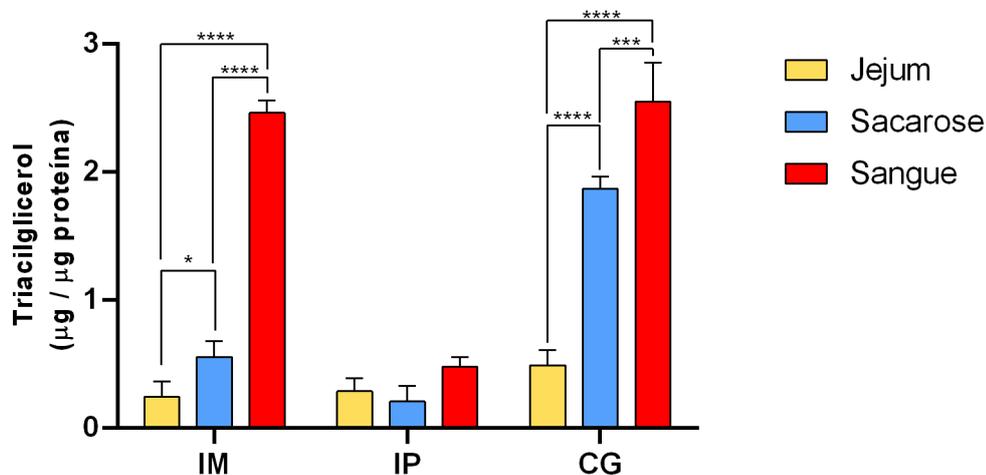


Figura 25. Concentrações de Triacilglicerol (TAG) em *Stomoxys calcitrans* submetidas a diferentes estados nutricionais. O gráfico exibe as quantidades de TAG por micrograma de proteína nos tecidos de Intestino Médio (IM), Intestino Posterior (IP) e Corpo Gorduroso (CG). As moscas foram categorizadas em três grupos: em jejum por 24h após a emergência (barras amarelas), alimentadas com sacarose por 24h após a emergência (barras azuis) e alimentadas com sangue por 24h após a emergência (barras vermelhas). A significância estatística é indicada por asteriscos, representando * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ e **** $p < 0.0001$.

No Intestino Posterior (IP), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Já no Corpo Gorduroso (CG), o perfil de concentração de TAG reforça a tendência observada no IM, com as moscas alimentadas com sangue exibindo a maior quantidade de TAG, sugerindo uma forte correlação entre a ingestão de sangue, o estresse oxidativo e o acúmulo de lipídios. As moscas alimentadas com sacarose também mostraram níveis elevados de TAG em comparação às em jejum, mas menos pronunciados do que nas moscas alimentadas com sangue.

Os níveis baixos de triacilglicerol (TAG) podem estar ligados a fatores metabólicos e fisiológicos, como o uso de reservas energéticas, metabolismo mais acelerado pós-emergência, ou como jejum pode induzir estresse oxidativo, o que, por sua vez, pode ativar vias de sinalização que levam à degradação de componentes celulares, incluindo lipídios, por meio de processos como a autofagia.

11. DISCUSSÃO

A mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) representa um vetor mecânico de patógenos de relevância veterinária, acarretando significativas perdas econômicas na pecuária (KHAFILA et al., 2022). Logo, identificar métodos eficazes para controlar a proliferação dessa mosca é crucial. Estudos recentes destacam o papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) em uma série de processos fisiológicos em artrópodes. As NADPH oxidases (NOX) são apontadas como algumas das enzimas primordiais na geração de EROs em diversos organismos (SIES e JONES, 2020). Assim, focar em estudos sobre moléculas envolvidas na fisiologia, no metabolismo vetorial e na imunologia de artrópodes, como as enzimas NOX, emerge como uma estratégia promissora para o controle de dípteros, a exemplo de *S. calcitrans*.

Em vários modelos animais, inclusive em insetos que são vetores cruciais de doenças humanas, tanto as EROs quanto as NADPH Oxidases (NOX) têm sido reconhecidas por seu papel fundamental na imunidade intestinal e na atividade redox. Neste estudo, analisamos duas enzimas cruciais para o equilíbrio redox: NOX5 e DUOX1, produtoras de EROs.

Nosso objetivo foi investigar se *S. calcitrans* expressa essas distintas isoformas da família NADPH oxidases, associadas à produção de EROs. Utilizando sequências identificadas por nosso grupo no banco de dados do NCBI, descritas como proteínas hipotéticas em *S. calcitrans* e semelhantes a isoformas de NOX, construímos uma árvore filogenética para examinar a relação entre artrópodes com genes análogos a essas moléculas. Além disso, desenvolvemos *primers* para analisar pela primeira vez expressão dessas NOX em *S. calcitrans*. A similaridade entre os grupos é predominantemente alta (maioria acima de 50%), com uma alta taxa de replicação em muitos dos ramos, repetindo-se em mais de 50% das 1000 replicatas. Isso sugere que estamos diante de uma molécula altamente conservada ao longo da evolução, mantendo suas conexões ancestrais. As sequências dessas NOX apresentam identidade de 86-82% com NOX5 de *M. domestica* e 70-75% com NOX5 de *D. melanogaster*. As outras duas sequências apresentam similaridades com DUOX1/2 de *D. melanogaster*.

A realização da qPCR utilizando os *primers* desenhados nos possibilitou observar pela primeira vez a expressão dessas isoformas de NOX em diferentes órgãos de *S. calcitrans*, ligando nossos resultados com pesquisas que indicam a presença de subfamílias NOX5 e DUOX em vários grupos de artrópodes. Vários estudos sobre DUOX em dípteros relacionam

seu papel na defesa microbiana e no controle da homeostase do microbioma intestinal (GANDARA E OLIVEIRA, 2023).

Na análise da expressão gênica, observou-se que o gene NOX5 apresentou um aumento na expressão em condições de jejum, que foi ainda mais acentuado quando as moscas foram alimentadas com sangue. Este perfil sugere uma possível participação da NOX5 em mecanismos de adaptação ao estresse nutricional e pode ter um papel significativo no processo de digestão do sangue. Gandara et al. (2021) demonstraram que o silenciamento de NOX5 em *R. prolixus* inibe o peristaltismo, resultando em um comprometimento geral da digestão e letalidade do inseto. Em contraste, a expressão do gene DUOX1 foi consideravelmente suprimida durante o jejum, o que pode refletir uma função reduzida ou uma regulação inibitória sob esta condição específica. No entanto, a expressão de DUOX1 foi restabelecida para níveis próximos aos do controle quando as moscas foram alimentadas com sangue, indicando que a expressão deste gene é preservada em condições nutricionais satisfatórias. Tais achados apontam para funções divergentes desses genes em moscas dos estábulos, com implicações potenciais tanto na gestão do estresse quanto na eficiência digestiva.

Nossos resultados estão consonantes com outros trabalhos envolvendo NOX, pois mostram que células epiteliais do intestino médio de artrópodes como *D. melanogaster*, *A. gambiae* tem a capacidade de ativar respostas patogênicas envolvendo EROs ativadas pelo aumento da expressão de DUOX (Ha et al., 2009; KUMAR et al., 2010; GANDARA et al. 2017), e que também auxiliam na digestão sanguínea de insetos hematófagos (MONTEZANO et al., 2018), corroborando com nossos resultados que mostram uma maior expressão de NOX5 no intestino dos insetos alimentados com sangue. Além disso, muitos trabalhos relacionados à microbiota intestinal dos insetos, consideram tanto a NOX5 quanto a DUOX como um importante mecanismo de controle de microrganismos sendo uma proteína presente nas células intestinais atuando na produção de peróxido de hidrogênio, auxiliando no controle da proliferação desses microrganismos (GANDARA et al., 2017).

Observou-se um padrão distinto na expressão do gene NOX5 no corpo gorduroso de *S. calcitrans*, o qual demonstrou um incremento tanto sob a condição de jejum quanto no estado pós-ingestão de sangue. Em contrapartida, o gene DUOX1 não exibiu mudanças expressivas; houve uma modesta redução na sua expressão em moscas que passaram pelo jejum, seguida de uma retomada aos níveis observados no grupo controle nas que foram alimentadas com sangue. Tais padrões apontam para uma maior reatividade do NOX5 ante as variações nutricionais em comparação ao DUOX1. Esta diferença pode desempenhar um papel significativo no

entendimento das vias metabólicas e na resposta ao estresse nutricional em *S. calcitrans*, sugerindo um mecanismo pelo qual o corpo gorduroso ajusta sua função bioquímica em resposta à disponibilidade de nutrientes. Níveis elevados de NOX5 também foram observados em corpos gordurosos de cigarras da espécie *Nilaparvata lugens* logo após sua emergência.

A expressão de NOX5 no corpo gorduroso, observado em nossas análises, estão de acordo com as funções desse órgão, que em insetos está envolvido em funções fisiológicas diversas, atuando como sítio de reserva e síntese de proteínas, carboidratos e lipídios, também tem participação da produção de substâncias com ação no sistema imune, detoxificação, produção dos óvulos, espermatozoides e de feromônios (ENG *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2016).

A produção de EROs por meio da via de NOX/DUOX já foi descrita em *D. melanogaster* e *A. gambiae* após o desafio com *T. brucei* e *Plasmodium* spp. (Kumar *et al.*, 2004; Ha *et al.*, 2005). Também já foi demonstrado que *A. gambiae* foi mais resistente à infecção por *Plasmodium* spp. em situações de estresse oxidativo (KUMAR *et al.*, 2003; MOLINA-CRUZ *et al.*, 2008). Mostrando também um papel parecido em mamíferos roedores no controle parasitário de *Leshmania amazonensis* (ROMA *et al.*, 2016). A NOX5, expressa em *S. calcitrans* durante nossas análises, também possui um papel importante no controle parasitário em intestino de artrópodes dificultando sua invasão (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Essa molécula também tem sua expressão aumentada em insetos hematófagos após o repasto sanguíneo (GANDARA *et al.*, 2017), informação refletida em nossa análise, pois todas as moscas analisadas em nosso experimento tinham sido alimentadas com sangue bovino.

Nossas pesquisas revelaram produção de dois principais tipos de EROs relacionados a regulação redox, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo observados em diferentes tecidos de *S. calcitrans*, corroborando com nossos resultados de expressão gênica, pois as principais fontes enzimáticas endógenas dessas EROs são as NOXs transmembranares (PARASCANDOLO E LAUKKANEN, 2019). Estudos verificaram que H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ em *A. aegypt* são produzidos por células epiteliais e secretados no lúmen do intestino médio (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Por meio da microscopia utilizando a sonda DHE, observamos uma maior produção dessas moléculas oxidativas no intestino desses insetos, principalmente nos grupos de moscas em jejum e alimentadas com sangue, que podem estar relacionados com a alimentação e a inanição a qual os insetos foram expostos.

A alta produção de $O_2^{\cdot-}$ no intestino dos insetos pode estar ligado à presença de enzimas NOX, que são responsáveis pela geração controlada de $O_2^{\cdot-}$ como parte das respostas imunes e processos fisiológicos. Em nossos resultados observamos que no intestino médio de

S. calcitrans temos tanto a expressão de NOX5, como uma elevada produção de $O_2^{\cdot-}$ que pode ocasionar produção de SOD que catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio como forma de controle antioxidante. Esses dados provavelmente estão correlacionados com a geração de H_2O_2 , nesse órgão, alguns estudos que indicam que conjunto DUOX/SOD está associado a produção dessas EROs (YAO et al., 2016; XIAO et al., 2017). Porém, como a NOX5 utiliza o NADPH como substrato para gerar $O_2^{\cdot-}$, e mesmo não estando diretamente envolvida na produção de SOD, o equilíbrio redox influenciado pela NOX5 pode afetar indiretamente a atividade da SOD (GARCIA et al., 2023).

No intestino dos insetos, as NOX estão ativas e desempenham papéis importantes na defesa contra patógenos, na regulação de reações redox, na comunicação celular e em outras funções biológicas. Transferindo elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando $O_2^{\cdot-}$ como um subproduto. No caso das moscas alimentadas com sangue a própria liberação de ferro da hemoglobina pode potencialmente induzir danos oxidativos, e no caso das moscas em jejum podem estar com as atividades metabólicas desreguladas devido ao estado de inanição ou até um início de processo de apoptose, levando à produção aumentada dessa molécula no intestino desses organismos (GARCIA et al., 2023).

Estudos revelam que a produção de determinadas EROs está ligada a alimentação sanguínea de insetos hematófagos, como *S. calcitrans* por exemplo, que enfrentam um alto estresse oxidativo quando ocorre à liberação do ferro da hemoglobina que são processadas por enzimas proteolíticas digestivas, todos esses processos, podem potencialmente induzir danos oxidativos e inclusive levar a um processo de apoptose celular. Em mosquitos *A. aegypti* e flebotomíneos o contato direto do epitélio intestinal com intermediários da digestão da hemoglobina são responsáveis pela indução de um elevado estresse oxidativo (KIRKNEZOS E MORAES, 2001; ARAUJO et al., 2012). Levando ao entendimento que a alimentação sanguínea foi um dos prováveis fatores que levaram ao aumento de EROs no intestino das moscas analisadas em nossa pesquisa. Porém, um estudo com *A. aegypti* relatou a diminuição de EROs após a alimentação sanguínea por meio de um mecanismo que envolve a ativação da proteína quinase C por heme, propondo que essa redução nos níveis de EROS é uma adaptação para compensar a ingestão de sangue, que é uma refeição altamente oxidante (OLIVEIRA et al., 2011).

Além da alimentação sanguínea, a produção de EROs em insetos pode ser influenciada por outros fatores. Metabólitos gerados durante a digestão e o metabolismo no intestino posterior podem reagir e gerar EROs como subprodutos. A sinalização redox mediada por

proteínas também pode estar relacionada a distúrbios oxidativos. Por exemplo, a reação da cisteína com H_2O_2 forma sulfonato (SO_3^-), o qual participa de processos oxidativos, conforme descrito por Castro et al. (2019).

A desregulação oxidativa no trato intestinal do inseto pode atuar como uma estratégia de defesa imunológica contra a invasão de parasitas. Diversos estudos, incluindo os de Hao et al. (2003) e MacLeod et al. (2007), sugerem que o aumento na geração de radicais livres é uma tática comum para inibir o crescimento de parasitas em hospedeiros invertebrados.

Em nossas análises, os grupos alimentados com sacarose demonstraram menor produção de H_2O_2 no intestino em comparação aos demais. Contudo, observou-se um aumento nos níveis de $O_2^{\cdot -}$ nos homogenatos do intestino posterior e do corpo gorduroso dessas moscas. Esse fenômeno pode ser resultado da ativação do metabolismo energético, alterações na microbiota intestinal ou do próprio processo de quebra da sacarose em glicose e frutose. Durante o metabolismo desses açúcares, a geração de $O_2^{\cdot -}$ pode ocorrer como um subproduto.

Embora alguns estudos revelem que moscas submetidas pontualmente a uma dieta rica em glicose não exibam mudanças redox significativas, outros apontam que uma dieta prolongada com esse carboidrato pode elevar os níveis de peroxidação lipídica e reduzir a atividade da catalase. Dietas com 10% de frutose, por exemplo, podem induzir alterações redox, como o aumento de peroxidação lipídica e da atividade catalásica, bem como a diminuição da superóxido dismutase (SOD), indicando o potencial para indução de estresse oxidativo (LUSHCHAK et al., 2016; LECHUGA-SANCHO et al., 2018).

Os estudos que realizamos indicam que o estado nutricional afeta de maneira diferenciada o estado redox dos grupos tióis em tecidos digestivos de *S. calcitrans*. Observou-se uma oxidação aumentada no Intestino Médio (IM), o que pode refletir uma maior vulnerabilidade ou uma adaptação metabólica a uma dieta rica em proteínas, típica do sangue. Em contraste, a oxidação reduzida no Intestino Posterior (IP) em moscas alimentadas com sangue sugere um possível mecanismo de proteção ou uma resposta adaptativa peculiar a esse segmento do intestino. Por sua vez, o Corpo Gorduroso demonstrou uma capacidade de manter seu estado redox relativamente constante, independentemente do tipo de alimentação recebida, o que reflete sua função na homeostase energética e no controle do estresse oxidativo. Esses dados enfatizam a complexidade da resposta redox em *S. calcitrans*, fornecendo *insights* valiosos para a compreensão das interações entre nutrição e fisiologia redox nesse inseto hematófago.

Pesquisas realizadas em *D. melanogaster* mostraram que a inibição das defesas antioxidantes, desencadeada pelos nutrientes, pode estar relacionada ao desenvolvimento do estresse oxidativo em moscas-das-frutas que se alimentam de dietas ricas em carboidratos ou gorduras. A ingestão desses macronutrientes ativa as vias de sinalização de insulina/IGF e TOR, as quais inibem a atividade de dFOXO, o homólogo dos fatores de transcrição forkhead (FOXO) em *Drosophila*. Esse processo leva à redução na expressão de genes-alvo regulados por dFOXO, que são responsáveis pela produção de proteínas antioxidantes. Além disso, uma dieta rica em gordura eleva o suprimento de triacilgliceróis, aumentando a oxidação de ácidos graxos, como foi destacado por Hwangbo et al. (2004), Grönke et al. (2010) e Dobson et al. (2017). Um estudo de Oliveira et al. (2011) também demonstrou que as EROs estão presentes no epitélio intestinal de mosquitos alimentados com açúcar.

Considerando os resultados apresentados, verifica-se uma intensificação do estresse oxidativo subsequente à alimentação sanguínea, evidenciada por um desequilíbrio oxidativo no intestino das moscas deste grupo específico. Com efeito, conforme demonstrado nas Figuras 16 a 17, há um aumento nos níveis de H_2O_2 em ambos os compartimentos intestinais pós-alimentação, bem como um incremento na expressão dos genes NOX em moscas alimentadas com sangue, que são essenciais no processo endógeno de geração dessas EROs. As alterações observadas nos grupos em jejum podem estar associadas a uma variedade de mudanças fisiológicas ou até mesmo à morte prematura desses insetos devido à ausência de nutrição.

Além disso, nossos resultados demonstraram que o difenilenoiodônio (DPI), que é um inibidor da DUOX, reduziu a geração de H_2O_2 , demonstrando uma possível ligação entre essa ERO e essa isoforma de NOX. Testes utilizando o DPI para inibir a geração de $O_2^{\cdot-}$ não demonstraram a mesma eficiência (resultados não apresentados), reafirmando o papel do DPI em relação à DUOX. Isso ocorre porque, provavelmente a NOX5, que está envolvida na produção de $O_2^{\cdot-}$, não foi afetada da mesma maneira, corroborando estudos que comprovaram a inibição da ação da DUOX pelo DPI (PETTIGREW et al., 2012; LIMA et al., 2020).

Diante deste contexto de elevado estresse oxidativo, torna-se fundamental avaliar as respostas antioxidantes do organismo. Assim, procedeu-se à análise das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx). Estas enzimas representam a principal linha de defesa celular contra os danos induzidos por EROs, atuando na detoxificação de superóxido e peróxido de hidrogênio e prevenindo a peroxidação lipídica. A atividade dessas enzimas antioxidantes é, portanto, um indicador

crucial do equilíbrio redox e da capacidade do organismo em mitigar o impacto do estresse oxidativo induzido por diferentes estados nutricionais.

É importante destacar as contribuições de estudos anteriores sobre as enzimas antioxidantes, como SOD, catalase e GPx. Estas enzimas foram detalhadamente descritas em vários tecidos de *R. prolixus* por PAES & OLIVEIRA (1999) e PAES et al. (2001). De acordo com esses estudos, as atividades da catalase e da SOD destacaram-se especialmente no intestino médio desse inseto, indicando uma função crítica dessas enzimas na proteção contra o dano oxidativo induzido por EROs nesse tecido específico.

O aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), apresentado na Figura 19, e a redução das atividades da catalase e da glutathione peroxidase (GPx), ilustradas nas Figuras 20 e 21, respectivamente, nas moscas alimentadas com sangue, estão em consonância com o acréscimo nos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido detectado nas amostras do Intestino Médio (IM), conforme demonstrado na Figura 4. Um estudo realizado por COSENTINO-GOMES et al. (2014) em *R. prolixus* observou uma resposta semelhante à que obtivemos nesses tecidos e nessa condição, reforçando a consistência de nossas observações com a literatura existente.

Por outro lado, as moscas alimentadas com sacarose exibiram um padrão distinto na atividade antioxidante. Nos tecidos do IM, os níveis de SOD foram baixos, o que pode indicar uma menor produção de superóxido nesse ambiente nutricional específico. Entretanto, no Intestino Posterior (IP) e no Corpo Gorduroso (CG), a atividade da SOD foi elevada, sugerindo uma possível compensação para o aumento de superóxido nestas regiões ou uma adaptação ao metabolismo da sacarose que gera espécies reativas de oxigênio como subprodutos. De acordo com estudo feito por ASSIS-ECKER et al. (2017), em *D. melanogaster*, os níveis de SOD também se apresentaram baixos frente a alimentação por sacarose.

Quanto às atividades da catalase e da GPx, foi observado um aumento nos níveis destas enzimas no IM e no CG em moscas alimentadas com sacarose. Isso pode ser interpretado como uma resposta protetiva contra o aumento de H_2O_2 , que é consequência da atividade metabólica aumentada devido à digestão da sacarose.

A elevação dessas enzimas antioxidantes no IM sugere que, embora o metabolismo da sacarose possa induzir a produção de EROs, o sistema antioxidante das moscas é capaz de se adaptar e responder adequadamente para mitigar possíveis danos oxidativos. No CG, a alta atividade destas enzimas pode refletir a importância desse tecido na manutenção do equilíbrio

redox do inseto, especialmente quando exposto a dietas que potencialmente aumentam o estresse oxidativo.

A comparação direta entre a atividade da catalase e da GPx nos oferece uma visão mais completa da resposta antioxidante celular. Enquanto a catalase desempenha um papel primário na decomposição do peróxido de hidrogênio, a GPx é mais específica na eliminação de hidroperóxidos, sendo ambos os sistemas essenciais para a manutenção da homeostase redox (SIES e JONES, 2020). A avaliação combinada destas enzimas em diferentes tecidos e estados nutricionais fornece *insights* sobre a complexidade da regulação antioxidante em *S. calcitrans* e destaca a adaptação dinâmica do inseto às variações na dieta.

Esses resultados destacam a complexidade da resposta antioxidante em *S. calcitrans*, que varia significativamente entre diferentes tecidos e em resposta a distintas condições nutricionais. A capacidade desses insetos de ajustar a atividade de enzimas antioxidantes chave, como a SOD, catalase e GPx, enfatiza a importância desses mecanismos na proteção contra o estresse oxidativo induzido pela dieta.

Entendendo as variações na atividade de enzimas antioxidantes em diferentes tecidos e sob diversas condições nutricionais, surge a questão de como essas adaptações ao estresse oxidativo impactam o metabolismo de lipídios, em particular a metabolização de triacilgliceróis (TAG). A relação entre a defesa antioxidante e o armazenamento e processamento de TAG é fundamental, visto que o equilíbrio redox pode influenciar diretamente as vias metabólicas lipídicas. Portanto, o próximo passo deste estudo foi analisar como as diferenças no manejo do estresse oxidativo, decorrentes de variações na dieta, afetam a síntese e degradação de TAG em *S. calcitrans*.

O corpo gorduroso atua como um órgão vital para o armazenamento de energia e funções secretoras, desempenhando papéis essenciais no metabolismo dos lipídios. Ele é crucial para fornecer a energia necessária para o desenvolvimento, locomoção e reprodução do inseto, além de manter a homeostase (CANAVOSO *et al.*, 2001; ROMA *et al.*, 2010; ARRESE & SOULAGES, 2010; ASSIS *et al.*, 2014). O acúmulo de TAG no CG em *S. calcitrans* após a alimentação com sangue, destacando a capacidade deste tecido de armazenar energia. Em estudo realizado por SANTOS *et al.* (2024) em fêmeas adultas de *A. aegypti* alimentadas com solução contendo 10% de sacarose, mantiveram uma quantidade constante de TAG no corpo gorduroso nos períodos que foram alimentados, mas morreram após seis dias. Provavelmente, essa alimentação com sacarose pode ter alterado a atividade redox no órgão, pois nos nossos

resultados indicam um aumento nos níveis de $O_2^{\cdot -}$ e uma alta expressão do gene NOX5 nessa região de moscas alimentadas com sacarose.

Além disso, a alimentação com sacarose no IM resulta em um aumento moderado dos níveis de TAG comparado ao jejum. No entanto, o IP não mostra variações significativas nas concentrações de TAG entre os diferentes estados nutricionais. Estes dados podem oferecer *insights* importantes sobre as respostas metabólicas dos tecidos de *S. calcitrans* a diferentes fontes de alimentação.

As NOXs são enzimas cruciais no metabolismo lipídico, particularmente na regulação da oxidação de triacilglicerídeos (TAGs). Ela desempenha um papel fundamental na produção de EROs, que são moléculas sinalizadoras que modulam diversas funções celulares, incluindo o metabolismo energético. As EROs modulam a atividade de enzimas lipolíticas, como a hormônio-sensível lipase (HSL), que catalisa a hidrólise de TAGs em ácidos graxos e glicerol. Em um estudo realizado por LEE & LEE (2018), em *D. melanogaster*, foi destacado a importância de DUOX na transição da lipogênese para a lipólise no epitélio intestinal.

Nossos resultados estabelecem uma conexão direta com as discussões anteriores, ressaltando o papel crucial das enzimas NOX, especialmente NOX5 e DUOX1, na modulação do estresse oxidativo e no metabolismo lipídico em *S. calcitrans* sob variadas condições nutricionais. A expressão diferencial dessas enzimas, seja em resposta à alimentação com sangue ou ao jejum, destaca uma adaptação evolutiva sofisticada para enfrentar desafios metabólicos e imunológicos específicos do seu habitat. Esta capacidade de ajustar a resposta redox, alinhada com as necessidades energéticas e a digestão, sublinha a significância das EROs e das NOX na fisiologia e defesa do inseto.

CAPÍTULO III:
Efeitos da Infecção por *Herpetomonas muscarum* na Expressão de NADPH
Oxidases

RESUMO

MAGALHÃES, Francisco Rômulo Oliveira. **Influência de Diferentes Estados Nutricionais e infecção por *Herpetomonas muscarum* no Metabolismo Redox de *Stomoxys calcitrans*, a mosca-dos-estábulo**. 2024. 123p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Neste capítulo, investiga-se como a infecção por *Herpetomonas muscarum* influencia a expressão de NADPH oxidases (NOX) em *Stomoxys calcitrans*. *H. muscarum*, um tripanossomatídeo, foi recentemente identificado infectando naturalmente *S. calcitrans*, levantando questões sobre a interação parasita-hospedeiro. Este estudo visa compreender como a infecção modula a expressão das enzimas NOX, essenciais na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na regulação do estresse oxidativo. Foram utilizadas técnicas de qPCR para analisar a expressão dos genes NOX5 e DUOX1 em intestinos e corpo gorduroso de moscas infectadas e não infectadas. Nossos resultados revelaram que a expressão do gene NOX5 no intestino de *S. calcitrans* apresentou uma diminuição nos níveis 2 horas após a infecção, permanecendo abaixo do controle 6 horas pós-infecção. Esse padrão sugere uma resposta supressora inicial diante da presença do parasita. Analogamente, a expressão do gene DUOX1 demonstrou uma tendência similar de supressão 2 horas após a infecção, com um leve incremento observado às 6 horas. No corpo gorduroso, a expressão de NOX5 aumentou significativamente, enquanto o gene DUOX1 teve uma expressão menor quando comparado com NOX5, sugerindo diferentes respostas adaptativas ao estresse oxidativo induzido pela infecção. Esses achados indicam que *H. muscarum* pode modular a expressão de NOX e possivelmente a produção de EROs. Este estudo contribui para a compreensão dos mecanismos de defesa de *S. calcitrans*, oferecendo novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de controle da mosca-dos-estábulo que explorem a vulnerabilidade do inseto ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Infecção, interação parasita-hospedeiro, expressão gênica.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Francisco Rômulo Oliveira. **Influence of Different Nutritional States and Infection by *Herpetomonas muscarum* on the Redox Metabolism of *Stomoxys calcitrans*, the Stable Fly**. 2024. 123p. Thesis (PhD in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

This chapter investigates how *Herpetomonas muscarum* infection influences the expression of NADPH oxidases (NOX) in *Stomoxys calcitrans*. *H. muscarum*, a trypanosomatid, was recently identified naturally infecting *S. calcitrans*, raising questions about parasite-host interactions. This study aims to understand how infection modulates the expression of NOX enzymes, which are essential for the production of reactive oxygen species (ROS) and regulation of oxidative stress. qPCR techniques were used to analyze the expression of NOX5 and DUOX1 genes in the intestines and fat bodies of infected and non-infected flies. Our results revealed that the expression of the NOX5 gene in the intestine of *S. calcitrans* showed a decrease in levels 2 hours after infection, remaining below control levels 6 hours post-infection. This pattern suggests an initial suppressive response to the presence of the parasite. Similarly, DUOX1 gene expression showed a similar suppression trend 2 hours after infection, with a slight increase observed at 6 hours. In the fat body, NOX5 expression increased significantly, while DUOX1 expression was lower compared to NOX5, suggesting different adaptive responses to infection-induced oxidative stress. These findings indicate that *H. muscarum* modulates the expression of NOX and possibly ROS production. This study enhances the understanding of *S. calcitrans*' defense mechanisms, offering new perspectives for developing control strategies for the stable fly that exploit the insect's vulnerability to oxidative stress.

Keywords: Infection, parasite-host interaction, oxidative stress, gene expression.

12. INTRODUÇÃO

A mosca-dos-estábulo é um transmissor mecânico conhecido por sua ampla distribuição mundial e hábito predominantemente hematófago, afetando principalmente animais de produção como equinos, bovinos e suínos. Sua presença em ambientes pecuários, especialmente em sistemas de confinamento, não apenas causa desconforto aos animais devido às suas picadas dolorosas, mas também resulta em significativas perdas econômicas ao setor. Além do impacto direto na produção animal, a capacidade desta mosca de servir como vetor mecânico para diversos agentes patogênicos destaca a urgência em desenvolver estratégias efetivas de controle. Em um avanço recente, uma pesquisa identificou a presença do parasito *Herpetomonas muscarum* em espécimes de *S. calcitrans* coletadas no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sugerindo uma nova dimensão na biologia desta mosca e sua relação com diferentes microrganismos.

Dentro do espectro de patógenos que afetam a saúde humana, a família *Trypanosomatidae* é notória por causar doenças graves, como a doença do sono africana, a doença de Chagas e diversas formas de leishmaniose, que juntas, são responsáveis pela morte de milhares de pessoas a cada ano. Os tripanossomatídeos, um grupo evolutivamente bem-sucedido, apresentam um amplo espectro de hospedeiros, incluindo invertebrados, vertebrados, plantas e até outros protozoários. Destaca-se que 60% dos gêneros dentro deste grupo são parasitas exclusivos de insetos (monoxênicos), enquanto os 40% restantes são heteroxênicos, parasitando principalmente vertebrados e transmitidos por insetos. Diversos grupos de pesquisa vem estudando sua importância epidemiológica e biológica, além do seu potencial como possível controle biológico, procurando compreender mais sobre o ciclo de vida dos tripanossomatídeos monoxênicos e sua interação com os hospedeiros invertebrados.

As enzimas NOX são fundamentais na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), essenciais tanto para processos fisiológicos quanto para a resposta imune. A análise da expressão dessas moléculas em moscas infectadas por *Herpetomonas muscarum* pode fornecer informações valiosas sobre os mecanismos adaptativos usados por *S. calcitrans* para controlar a infecção, potencialmente revelando interações complexas entre o inseto e o patógeno. Este estudo não apenas contribui para um entendimento aprofundado da dinâmica de infecção em vetores de importância pecuária, mas também abre novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de controle baseadas na modulação da resposta redox, ressaltando a importância

de uma abordagem integrada no estudo das interações parasita-vetor-hospedeiro. Apesar da importância dentro desse contexto ainda não há mecanismos de controles efetivos, dessa forma o uso tripanossomatídeos pode ser uma alternativa para esse controle.

Dessa forma, nesse capítulo, objetivamos verificar se a presença de *H. muscarum* modula a expressão de genes NOX em *S. calcitrans*.

13. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

13.1. *Stomoxys calcitrans* como hospedeiro de microrganismos

Os prejuízos causados ao setor agropecuário por *S. calcitrans* não se limitam apenas às perdas econômicas diretas. Essas moscas também desempenham um papel crítico na transmissão mecânica de diversos microrganismos, influenciando a epidemiologia de doenças animais, e possivelmente alterando a fisiologia do inseto. Estudos têm demonstrado que *S. calcitrans* pode abrigar e disseminar patógenos significativos como o vírus da anemia infecciosa equina, peste suína africana, vírus da febre do Nilo, febre do Vale Rift, *Trypanosoma* spp., *Besnoitia* spp., além de *Bacillus anthracis*, *Anaplasma marginale* e *Habronema microstoma* (BALDACCHINO et al., 2013; DOYLE et al., 2011; SCOLES et al., 2005).

Em um estudo recente conduzido pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), foi identificado material genético de *Anaplasma marginale* em exemplares de *S. calcitrans*, marcando a primeira vez que tal descoberta ocorre no Brasil (ARAUJO et al., 2021). Este achado sublinha a relevância dessas moscas na manutenção e transmissão de patógenos em ambientes agropecuários.

A transmissão de agentes patogênicos por *S. calcitrans* ocorre através de diversos mecanismos: durante sua alimentação sanguínea, regurgitação de agentes temporariamente armazenados, e dispersão através do contato de suas patas e asas com alimentos e outras superfícies (DOMINGUES, 2017). Essa capacidade é influenciada tanto pelos seus hábitos alimentares, frequentemente se alimentando de sangue várias vezes ao dia, quanto pelo seu padrão de movimentação, com deslocamentos que podem chegar a 500 metros diários (BAILEY et al., 1975; ROMERO et al., 2006).

Além disso, essas moscas podem ser hospedeiros de alguns microrganismos, como *H. muscarum*, tripanossomatídeo identificado há pouco tempo, parasitando o intestino desses insetos (ROSA, 2022). A interação desse protozoário com essas moscas, pode influenciar significativamente sua fisiologia. Nesse contexto, estudos sobre a coexistência de *S. calcitrans* com *H. muscarum* são importantes não apenas para entender o ciclo de vida do protozoário, mas também para explorar potenciais estratégias de controle biológico, uma vez que essa interação pode alterar a fisiologia do inseto, abrindo caminho para novas abordagens de manejo.

As principais estratégias de controle biológico e medidas existentes para o manejo da população de *S. calcitrans* incluem práticas de controle populacional tradicionais. Atualmente, tais medidas envolvem manejo sanitário, como a redução de substratos para o desenvolvimento das fases imaturas da mosca, que é realizada através da rotina de remoção da matéria orgânica acumulada tanto em ambientes de criação quanto na indústria sucroalcooleira (MARCONDES, 2001; BOWMAN, 2006). Adicionalmente, o controle químico é implementado por meio do uso de inseticidas e larvicidas (DOMINGHETTI et al., 2017; BARROS et al., 2019). No entanto, tem sido observada uma crescente resistência aos inseticidas piretróides em *S. calcitrans*, atribuída a uma mutação pontual nos genes dos canais de sódio. Esta mutação, envolve a substituição de uma leucina por uma histidina, similar às mutações de resistência *kdr* observadas em outros dípteros (OLAFSON et al., 2019).

Além dessas abordagens tradicionais, a investigação sobre o uso de agentes biológicos no controle da mosca-dos-estábulo tem trazido novas perspectivas. Por exemplo, o fungo *Beauveria bassiana*, apesar de não afetar significativamente o desenvolvimento da mosca, e o fungo *Metarhizium anisopliae*, que demonstrou inibir a eclosão dos ovos mas não afetou as larvas nem as pupas, são exemplos de tentativas de controle biológico (WATSON et al., 1995; MORAES et al., 2008). Outro agente biológico promissor é o ácaro *Macrocheles emersoni*, um predador natural das fases imaturas de *S. calcitrans*, que tem mostrado eficácia considerável (AZEVEDO et al., 2018).

Este contexto reforça a importância de explorar a interação entre *S. calcitrans* e *H. muscarum*, pois, além de fornecer informações sobre o comportamento e ciclo de vida do protozoário, pode revelar métodos de controle que alteram a fisiologia do inseto. Tais métodos podem oferecer abordagens inovadoras para o manejo dessas moscas, integrando conhecimento biológico com estratégias de controle tradicionais e emergentes.

13.1. Tripanossomatídeos e o Gênero *Herpetomonas*

Os tripanossomatídeos compõem uma classificação abrangente referente a uma diversidade de organismos flagelados e parasitas obrigatórios, integrantes da família Trypanosomatidae. Este grupo é notável pela sua adaptabilidade parasitária em uma ampla gama de hospedeiros (MASLOV et al., 2019). Embora muitos de seus membros sejam parasitas de animais, existem notáveis exceções que demonstram a adaptabilidade e diversidade evolutiva do grupo. Por exemplo, o gênero *Phytomonas* evoluiu para parasitar plantas

vasculares e é transmitido por percevejos fitófagos, destacando um nicho ecológico único dentro da família (CAMARGO, 1999; JASKOWSKA et al., 2015). Adicionalmente, certas espécies são conhecidas por parasitar os macronúcleos de ciliados, evidenciando a vasta gama de adaptações parasitárias dos tripanossomatídeos (FOKIN et al., 2014).

A distinção entre os membros da família Trypanosomatidae se dá, em grande parte, pelo seu estilo de vida parasitário, que serve como critério primordial para sua classificação em dois grupos não taxonômicos fundamentais. Os flagelados monoxênicos completam seu ciclo de vida em um único hospedeiro, geralmente um inseto, enquanto os dixênicos requerem dois hospedeiros distintos para o desenvolvimento completo, envolvendo normalmente um vetor (frequentemente um inseto) e um hospedeiro vertebrado ou planta (MASLOV et al., 2013). A estrutura taxonômica dentro desta família é complexa e sujeita a debates, com a existência de grupos não monofiléticos, gêneros representados por uma única espécie e espécies que necessitam de reisolamento para classificação mais precisa. Atualmente, a família Trypanosomatidae é constituída por 24 gêneros, dos quais 19 são considerados monoxênicos refletindo a riqueza e a complexidade deste grupo parasitário (KOSTYGOV, 2021).

Os flagelados da família Trypanosomatidae, ao parasitarem insetos, geralmente estabelecem-se no trato digestivo do hospedeiro (Figura 26). O sistema digestivo destes insetos é dividido em três partes principais: o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior, cada um desempenhando funções distintas no processo digestivo. As células e estruturas específicas destas seções intestinais têm um papel crucial na modulação das interações parasitárias. As cutículas que revestem os epitélios dos intestinos anterior e posterior, juntamente com as microvilosidades presentes na superfície apical das células do intestino médio, são elementos chave na dinâmica de infecção e na capacidade do parasita de se estabelecer e proliferar dentro do hospedeiro (MERZENDORFER et al., 2016; ROSA, 2022). Essas características estruturais não apenas facilitam a absorção de nutrientes, mas também podem influenciar a suscetibilidade a infecções e a interação hospedeiro-parasita.

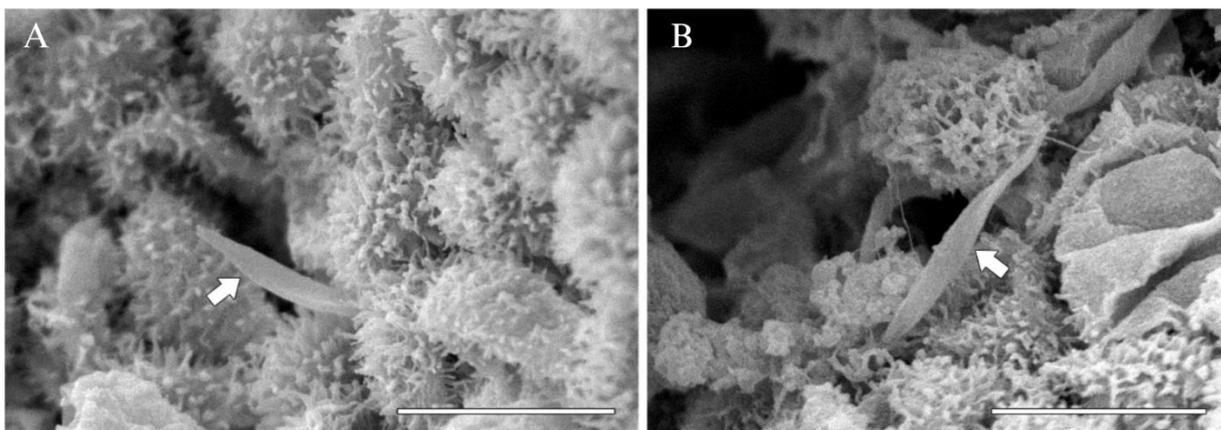


Figura 26. *Herpetomonas muscarum* parasitando intestino de *Stomoxys calcitrans*, em microscopia eletrônica de varredura. A-B – Parasitos isolados, com flagelos inseridos entre as células epiteliais (setas brancas). Fonte: Rosa, 2022.

O gênero *Herpetomonas* é amplamente reconhecido por sua disseminação entre os insetos, ocorrendo em diversas ordens e destacando-se por sua natureza monofilética que abrange 13 espécies, majoritariamente encontradas em dípteros. Esses protozoários têm uma distribuição geográfica extensa, marcando presença na Europa, Américas, Ásia e África (TYC et al., 2013). Curiosamente, apesar de serem classicamente associados a insetos, espécimes de *Herpetomonas* também foram isolados de plantas, indicando uma maior complexidade e diversidade de habitats do que previamente compreendido (FIORINI et al., 2001; BARCLAY, MCGHEE E POSTELL, 2007; MARÍN et al., 2007). Além disso, um grupo de estudos identificou uma lata semelhança entre *Leishmania* sp. e *H. muscarum* (D'AVILA-LEVY et al., 2020).

O uso potencial desses tripanossomatídeos monoxênicos como controle biológico de insetos vetores é também uma abordagem interessante. Segundo Schaub (1994), os tripanossomatídeos podem ser classificados em apatogênicos, quando não afetam a sobrevivência no hospedeiro, subpatogênicos, quando interferem na vida do hospedeiro apenas em situações adversas e patogênicos quando levam à morte do hospedeiro em qualquer situação. Além disso, eles compartilham enzimas e metabólitos não só com eucariotos superiores, mas também com outros membros patogênicos da Família Trypanosomatidae, tais como *Leishmania* sp, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Entamoeba histolytica* (SOUTO-PADRÓN, 2002; FERREIRA et al., 2003; D'AVILA-LEVY et al., 2020).

Importantes informações podem ser obtidas ao estudar a interação entre insetos e flagelados monoxênicos como *Herpetomonas*, os quais podem refletir aspectos da relação parasito-vetor observada em patógenos dixênicos. Essa compreensão é vital, dado que os grupos

dixênicos são responsáveis por doenças significativas em seres humanos, animais domésticos e plantas de importância econômica (SIMPSON, STEVENS e LUKEŠ, 2006).

A análise do transcriptoma e genoma de *Herpetomonas* em seu hospedeiro inseto revelou fortes paralelos com as respostas dos promastigotas de *Leishmania* no intestino dos flebotomíneos. Ambos os organismos mostram um aumento significativo na expressão de proteínas associadas à virulência de *Leishmania*, o que é crucial para o estabelecimento da infecção no intestino médio do vetor e, por conseguinte, para a transmissão do parasito (INBAR et al., 2017; SLOAN et al., 2019). Essas semelhanças podem ser chave para decifrar as complexas interações entre insetos e tripanossomatídeos e, potencialmente, para o desenvolvimento de estratégias de controle biológico de artrópodes, como *S. calcitrans*.

14. MATERIAIS E METÓDOS

14.1. Ensaio de infecção de *Stomoxys calcitrans* por *Herpetomonas muscarum*

Em estudos *in vivo*, utilizaram-se 40 moscas de uma colônia, com idades entre 1 a 3 dias após a emergência, divididas por condição experimental: 20 infectadas por 2h e 20 infectadas por 6h. As moscas foram submetidas a um período de jejum de 12 horas, após o qual tiveram acesso durante 2 horas a um algodão embebido em solução de sacarose a 10%, enriquecida com o parasito *Herpetomonas muscarum* na densidade de 1×10^7 parasitos/mL. Finalizado o período de alimentação, a fonte de alimentação infectada foi removida, iniciando-se a contagem dos intervalos de tempo para os ensaios subsequentes. As disseções dos intestinos foram realizadas em momentos específicos pós-infecção: 2 e 6 horas. A disseção ocorreu em solução salina tamponada com fosfato (PBS), utilizando pinças de precisão (Jewelers forceps, Dumont n° 5, Sigma-Aldrich). Os tecidos coletados foram agrupados por condição, 20 órgãos cada (Intestino e Corpo Gorduroso), e inseridos em microtubos contendo inicialmente 300 μ L de Trizol. Após homogeneização, adicionou-se 700 μ L adicionais de Trizol, totalizando 1000 μ L por amostra. As amostras foram então armazenadas a -80°C até o momento de seu processamento posterior.

14.2. Extração de RNA

Para a extração, foram utilizados os homogenatos obtidos de 20 intestinos e de 20 corpos gordurosos das moscas infectadas por 2h, infectadas por 6h e não infectadas, armazenados em microtubos contendo 1000 μ L de reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

O RNA total foi extraído dessas amostras com TRIzol reagent, seguindo protocolo do fabricante, contendo pequenas adaptações. A quantificação do RNA foi determinada em NanoDrop (ND-1000) (Thermo Scientific) e todas as amostras tiveram taxas de A260/A280 de $2,0 \pm 0,1$.

14.3. Síntese de cDNA

Após a extração, 1 µg de RNA total foi tratado com 1 U de DNase I (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C, em um volume final de 10 µL. A reação foi interrompida por incubação a 65°C por 10 minutos após a adição de 1 µL de EDTA (50mM). O RNA tratado foi empregado na síntese de cDNA, utilizando random primers e 50 U de reverse transcriptase MultiScribe™ MuLV do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), totalizando um volume final de 20 µL.

14.4. Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

As ampliações por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram conduzidas utilizando o kit Taq PCR Master Mix (Qiagen) sob dois protocolos distintos. O primeiro protocolo consistiu em um ciclo inicial de 2 minutos a 96°C, seguido de 40 ciclos, cada um com 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Esta série de ciclos foi aplicada para análises que empregavam um primer controle. Os genes de referência utilizados foram EF1 alfa e Rpl32, já descritos na tabela 1. O segundo protocolo adotado seguiu o mesmo ciclo inicial de 2 minutos a 96°C, mas com 40 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C, finalizando também com uma extensão de 5 minutos a 72°C, sendo este utilizado para ampliações com primers do gene DUOX e NOX. Estes primers, projetados com o auxílio do software Primer3, possuíam temperaturas de anelamento de 59°C e 61°C. Os produtos resultantes das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,8% e visualizados sob luz ultravioleta (UV).

14.5. PCR Quantitativa (qPCR)

Os ensaios qPCR foram realizados em equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Cada volume final de 12 µL para cada amostra continha 3 µL de cDNA, 6 µL SYBR-Green, 0,48 µL de cada primer e 2,04 µL de H₂O ultrapura. Os poços do controle negativo não continham cDNA. Os genes de referência utilizados foram EF1 alfa e Rpl32, já descritos na tabela 1. A reação foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 2min e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 30s. Uma curva de dissociação de 60-95 °C foi incluída no final de cada execução de RT-qPCR para verificar a especificidade dos amplicons para cada par de primers. Foram utilizados os mesmos

primers descritos no capítulo II, tanto para os genes das enzimas NOX quanto para os controles. Duas réplicas técnicas foram executadas para cada amostra biológica. Além disso, para determinar a eficiência do processo de amplificação, foi realizado a execução de uma curva padrão, utilizando diluições seriadas de 5x (1:1; 1:5; 1:25; 1:625) da amostra.

15. RESULTADOS

Na presente seção de resultados, investigamos o impacto da infecção por *H. muscarum* no perfil de expressão gênica de NOX no intestino e corpo gorduroso de *S. calcitrans*. Esse protozoário que foi recentemente observado parasitando moscas-dos-estábulo coletadas no campus da UFRRJ, levantando questões significativas sobre as interações patógeno-hospedeiro nesse inseto. Dada a relevância destes vetores na transmissão mecânica de patógenos e os efeitos da infecção na fisiologia do vetor, o estudo da expressão de genes envolvidos em atividades metabólicas e imunológicas torna-se essencial para compreender os mecanismos de resistência ou suscetibilidade a tais infecções. E esse parasito será usado como modelo de infecção no presente trabalho e em outros do grupo.

Nosso estudo focou na expressão de dois genes chave, NOX5 e DUOX1, conhecidos por sua função na produção de EROs, moléculas envolvidas tanto na resposta imunológica quanto no estresse oxidativo. As amostras foram coletadas em dois pontos temporais após a infecção: 2 e 6 horas. Utilizamos a qPCR para quantificar a expressão relativa desses genes, comparando-a com a expressão basal observada em moscas não infectadas (controle).

Nossos resultados revelaram que a expressão do gene NOX5 no intestino de *S. calcitrans* (Figura 27) apresentou uma diminuição nos níveis 2 horas após a infecção, permanecendo abaixo do controle 6 horas pós-infecção, conforme evidenciado pelas barras laranjas e vermelhas no Gráfico A. Esse padrão sugere uma resposta supressora inicial diante da presença do parasita. Analogamente, a expressão do gene DUOX1 demonstrou uma tendência similar de supressão 2 horas após a infecção, com um leve incremento observado às 6 horas, mas ainda não retornando aos níveis de controle, como mostrado no Gráfico B.

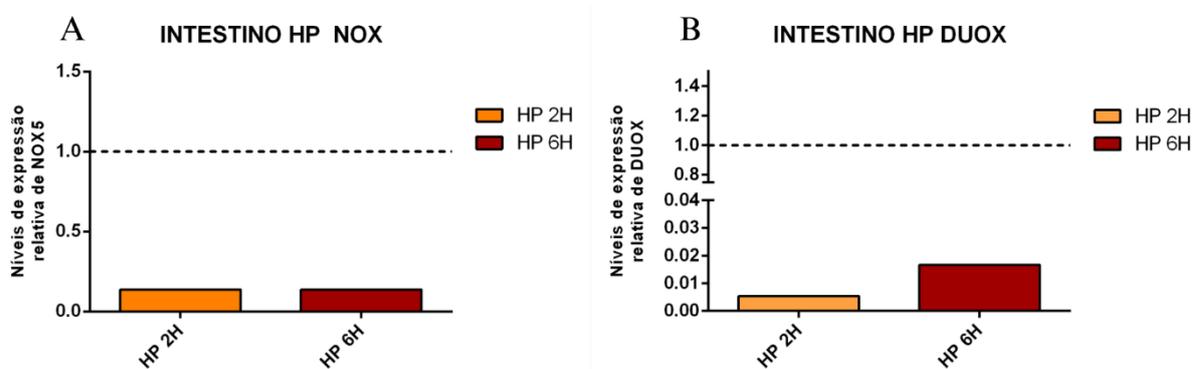


Figura 27. Análise da expressão gênica de NADPH oxidases no intestino de *Stomoxys calcitrans* após infecção por *Herpetomonas muscarum*. Gráfico A apresenta a expressão relativa do gene NOX5 com amostras coletadas 2 horas (HP 2H, barra laranja) e 6 horas (HP 6H, barra vermelha) após infecção, enquanto Gráfico B mostra a expressão relativa do gene DUOX1 nas mesmas condições temporais. A linha tracejada indica o nível de expressão do gene de controle, correspondente às moscas não infectadas. As barras representam a expressão gênica relativa, indicando uma supressão na expressão dos genes NOX5 e DUOX1 durante as primeiras horas de infecção quando comparadas ao controle.

Na sequência dos resultados obtidos para os intestinos de *S. calcitrans*, focamos agora na expressão gênica do corpo gorduroso diante da infecção por *H. muscarum* (Figura 28). As análises revelaram uma dinâmica de resposta que difere significativamente entre os dois tecidos investigados.

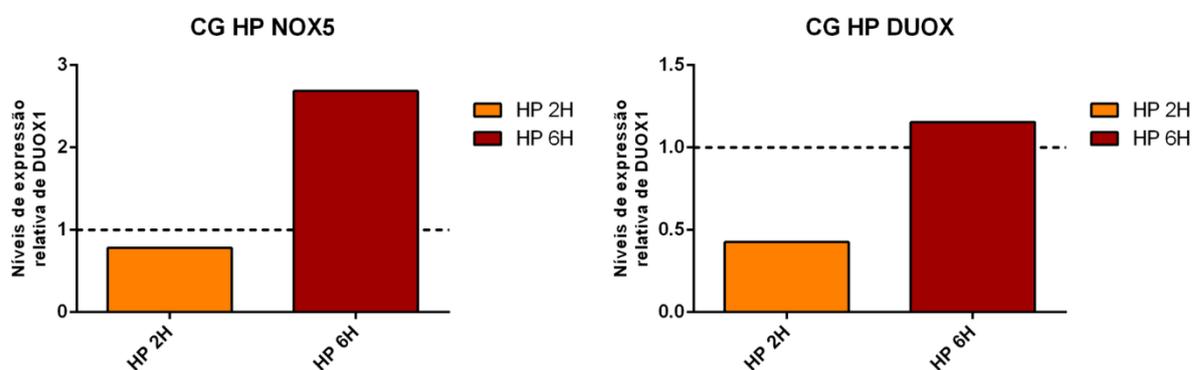


Figura 28. Expressão gênica diferencial de NADPH oxidases no corpo gorduroso de *Stomoxys calcitrans* em resposta à infecção por *Herpetomonas muscarum*. Gráfico A ilustra a expressão relativa do gene NOX5 em amostras coletadas 2 horas (HP 2H, barra laranja) e 6 horas (HP 6H, barra vermelha) após a infecção. Gráfico B exibe a expressão relativa do gene DUOX1 sob as mesmas condições temporais. A linha tracejada representa o nível de expressão do controle, isto é, moscas não infectadas. As barras indicam a resposta temporal na expressão dos genes, revelando inicialmente uma supressão e posteriormente uma indução na expressão de NOX5 e DUOX1 em comparação com o controle.

Em relação ao corpo gorduroso, a expressão do gene NOX5 (Figura28.A), inicialmente apresentou uma diminuição nos níveis 2 horas pós-infecção, seguida por um marcante aumento 6 horas após a infecção, superando a linha de base estabelecida pelo grupo controle. Este aumento pode indicar uma ativação das vias de defesa ou um mecanismo compensatório de resposta ao estresse oxidativo induzido pela infecção.

O segundo gráfico revela um padrão semelhante para o gene DUOX1, que exibiu uma expressão reduzida 2 horas após a infecção, mas ao contrário do observado para o intestino, houve um aumento expressivo após 6 horas, ultrapassando ligeiramente os níveis de controle (Figura28.B). Essa elevação sugere uma resposta temporal distinta do corpo gorduroso à

infecção, potencialmente relacionada com suas funções metabólicas e imunológicas multifacetadas.

Comparando os resultados entre o intestino e o corpo gorduroso, é evidente que o corpo gorduroso exibe uma resposta induzida mais acentuada, sugerindo que este tecido pode desempenhar um papel chave na resposta imune sistêmica e na regulação do estresse oxidativo em face de uma infecção parasitária. Essas descobertas ressaltam o corpo gorduroso como um ponto focal não apenas para a compreensão dos mecanismos de defesa de *S. calcitrans*, mas também como um possível alvo para estratégias de controle baseadas na perturbação da resposta do vetor a infecções.

16. DISCUSSÃO

O gênero *Herpetomonas* é reconhecido por sua natureza monofilética e sua ampla distribuição geográfica, com integrantes encontrados em quase todos os continentes, conforme relatado por Tyc et al. (2013). Este gênero tem uma associação com uma diversidade notável de hospedeiros insetos de diferentes ordens, incluindo Dípteros, Hemípteros, Hymenópteros e Siphonapteros, evidenciando sua capacidade de se adaptar a uma variedade de ecossistemas. Além disso, a espécie *Herpetomonas* spp. foi isolada de *Blattodea*, ampliando ainda mais o espectro conhecido de hospedeiros, como foi observado por Frolov et al. (2021). Uma pesquisa demonstrou Tripanossomatídeos portadores de endossimbiontes foram capazes de colonizar intestinos de *Aedes aegypti* após alimentação de protozoários (FAMPA et al., 2003).

Pesquisas detectaram pela primeira vez *Herpetomonas muscarum* parasitando *S. calcitrans* (ROSA, 2022). Esse achado coloca essas moscas como hospedeiras desse protozoário. *H. muscarum* havia sido previamente descrita em *D. melanogaster* e *Musca domestica* (ROGERS & WALLACE, 1971; NAYDUCH, 2009; LOAN & LIGOXYGAKIS, 2020), mas em *S. calcitrans*, esse estudo foi o primeiro a isolar (ROSA, 2022). Então para entendermos se essa infecção modula enzimas envolvidas em processos imunológicos, sinalizadores e de metabolismo redox, verificamos a expressão relativas de ScNOX5 e ScDUOX1, genes da família NADPH Oxidases expressos em *S. calcitrans*.

As NOX se destacam como uma das fontes predominantes de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células, atraindo significativo interesse científico pela sua capacidade única de gerar EROs em um contexto fisiológico regular. No reino dos artrópodes, são reconhecidos três tipos distintos de NOX, conforme apontado por Gandara et al. (2017): NOX4-art, uma isoforma de NOX4 que opera independentemente do cofator p22-phox e é exclusiva de artrópodes; além de duas enzimas que necessitam de cálcio para sua atividade: a DUOX, responsável pela produção de peróxido de hidrogênio, conforme descrito por De Deken et al. (2002) e Dias et al. (2013), e a NOX5, que se especializa na produção de superóxido, como elucidado por Bánfi et al. (2001) e Montezano et al. (2018).

Em nossos resultados, a comparação entre os níveis de expressão gênica nos intestinos e no corpo gorduroso de *S. calcitrans* revela uma disparidade intrigante. Enquanto o intestino apresentou níveis reduzidos de expressão das enzimas NOX após a infecção por *H. muscarum*, o corpo gorduroso demonstrou uma supressão inicial seguida de um aumento significativo na

expressão. Esta diferença sugere que o corpo gorduroso pode desempenhar um papel mais proeminente em relação a presença de *H. muscarum* em comparação com o intestino.

A menor expressão de enzimas relacionadas à produção de EROs no intestino pode indicar uma adaptação eficaz por parte do patógeno ou uma resposta regulatória finamente ajustada do hospedeiro para minimizar danos teciduais derivados do estresse oxidativo. Em estudos sobre a *Musca domestica*, foi observada a capacidade de *H. muscarum* de se infiltrar entre as duas camadas da membrana peritrófica (NAYDUCH, 2009).

A expressão aumentada no corpo gorduroso sugere uma possível compensação para essa supressão, refletindo uma ativação da resposta imunológica ou uma regulação do estresse oxidativo que pode ser crucial para a sobrevivência do inseto e a limitação da proliferação do patógeno. Os níveis de EROs, que tem como suas fontes primárias as NOX, podem ser modulados pela presença de protozoários. Em *R. prolixus* a infecção por *Trypanosoma rangeli* ocasiona o aumento de H_2O_2 e O_2^- , EROs moduladas por NOX5 e DUOX (CONSENTINO-GOMES et al., 2014)

Uma hipótese é de que o patógeno possa ter se deslocado para a hemolinfa e outros tecidos do inseto. Essa migração poderia explicar um aumento nos níveis de expressão mais intensa observada no corpo gorduroso, sugerindo que este tecido pode estar reagindo à presença do patógeno na circulação sistêmica, desencadeando mecanismos de defesa mais abrangentes. Porém, nas descobertas feitas por Rosa (2022) constatou-se a presença de apenas algumas espécies de tripanossomatídeos na hemolinfa de *S. calcitrans*, isso acaba divergindo da hipótese levantada. Mesmo assim, seria uma situação extremamente plausível visto que tripanossomatídeos, como o *Trypanosoma rangeli* migram para o intestino médio posterior do inseto, atravessam a parede intestinal e caem na hemolinfa antes de chegarem as glândulas salivares de *R. prolixus* (BATISTA & SANT'ANNA, 2010).

Entre os dípteros, é notável o relato de que *Strigomonas culicis* consegue invadir a hemolinfa e as glândulas salivares em experimentos realizados com mosquitos (NASCIMENTO et al., 2010; CORRÊA-DA-SILVA et al., 2006). Tal invasão da hemolinfa está potencialmente vinculada a mecanismos de transmissão transfásica, ou mesmo à persistência durante a diapausa do hospedeiro, como é o caso de *H. swainei* em vespas do gênero *Neodiprion* (SMIRNOFF e LIPA, 1970).

Se *H. muscarum* de fato se espalhasse do sítio de infecção inicial, tal disseminação implicaria em alterações significativas na resposta imune do vetor, com uma potencial concentração da atividade imunológica no corpo gorduroso, responsável por uma resposta mais

completa e sistêmica. Considerando a função crítica do corpo gorduroso na intermediação entre a resposta metabólica e imune, tal padrão de expressão reforçaria a função deste órgão como um importante modulador da resistência à infecção. Porém, essa situação acaba não se assemelhando com o que acontece em outros insetos como *M. domestica*, no qual o protozoário leva de 4-6 horas para se fixar ao epitélio intestinal, após sua ingestão (NAYDUCH, 2009).

Em *Drosophila melanogaster*, observou-se que, após a infecção por *H. muscarum*, vários genes da via IMD, que são AMP expressos diferencialmente, e genes que codificam componentes da resposta ao estresse oxidativo, incluindo o próprio receptor Toll, foram afetados. Além disso, demonstrou-se que níveis baixos de DUOX elevaram o número de protozoários (WANG, 2009). Isso pode explicar os picos de expressão de NOX observados no corpo gorduroso de *S. calcitrans* em nossa pesquisa.

Diferentes pesquisas demonstram que *H. muscarum* tem um papel relevante na fisiologia de seu hospedeiro, modulando genes, como a NOX, alteram a fecundidade, eclosão de ovos, entre outros aspectos (WANG, SLOAN e LIGOXYGAKIS, 2019; ROSA, 2022)

Nossos achados sublinham a necessidade de uma compreensão mais aprofundada das interações dinâmicas entre patógenos e seus hospedeiros vetores. Futuras investigações deverão incluir o mapeamento da localização desse parasitas em diferentes tecidos ao longo do tempo para esclarecer a sequência de eventos modulados em *S. calcitrans* frente à infecção por *H. muscarum*, elucidando assim os mecanismos através dos quais este díptero enfrenta desafios microbianos.

Essas diferenças no padrão de expressão podem também refletir as funções distintas destes tecidos. Enquanto o intestino é a primeira linha de interação direta com o patógeno, o corpo gorduroso é um importante centro metabólico e imunológico que pode ser responsável por desencadear respostas imunes sistêmicas e por regular o estresse oxidativo em uma escala mais ampla.

A expressão diferenciada das enzimas NOX pode fornecer informações valiosas sobre os mecanismos específicos de resposta ao estresse e de defesa em distintos tecidos de *S. calcitrans* frente à infecção por *H. muscarum*. Essas informações são cruciais para entender as modulações fisiológicas causadas por esse protozoário na mosca, o que pode representar uma futura alternativa para o controle biológico do inseto.

17. CONCLUSÕES

As NADPH oxidases (NOX) desempenham um papel central no metabolismo redox de *S. calcitrans*, influenciando diretamente sua fisiologia, capacidade de resposta imune e interações com patógenos. Esta tese revelou aspectos fundamentais da função das enzimas NOX no contexto de diferentes estados nutricionais e na dinâmica da infecção por *Herpetomonas muscarum* em *S. calcitrans*, um vetor mecânico significativo de patógenos de importância veterinária.

A análise bioinformática e funcional das isoformas de NOX em *S. calcitrans* evidenciou a complexidade e a especificidade do sistema redox deste inseto, destacando as variantes NOX como componentes cruciais na geração de EROs. Estas enzimas não apenas participam de processos fisiológicos essenciais, mas também medeiam respostas adaptativas a variações no ambiente nutricional, afetando potencialmente a sobrevivência, reprodução e eficiência vetorial do inseto.

Investigações sobre a expressão e regulação das enzimas NOX diante de diferentes desafios nutricionais apontaram para um mecanismo altamente adaptativo, onde as EROs atuam como reguladores finos da homeostase energética e da resposta imunológica. Em particular, a resposta ao patógeno *H. muscarum* destacou a relevância das NOX na mediação da interação hospedeiro-patógeno, com um aumento notável na expressão de NOX5 no corpo gorduroso, sugerindo um papel proeminente deste tecido na defesa contra infecções.

As descobertas compiladas nesta tese não apenas aprofundam nosso entendimento sobre o papel das enzimas NOX na biologia de *S. calcitrans*, mas também abrem caminho para a exploração de estratégias de controle desses vetores. A capacidade de influenciar a resposta redox de *S. calcitrans* pode oferecer uma abordagem inovadora para mitigar sua eficácia como vetor de patógenos, com implicações promissoras para a saúde animal e estratégias relacionadas ao manejo desses insetos em setores pecuários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, J., LAMBETH, J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. **Free Radical Biology and medicine**, v. 49, n. 9, p. 1342–1353, 2010. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.027

ALMEIDA-OLIVEIRA, F. et al. Reference genes for quantitative PCR in the adipose tissue of mice with metabolic disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 948–955, 2017.

ALVES-BEZERRA, M., COSENTINO-GOMES, D., VIEIRA, L.P., ROCCO-MACHADO, N., GONDIM, K.C., MEYER-FERNANDES, J.R. Identification of uncoupling protein 4 from the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* and its possible role on protection against oxidative stress. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 50, p. 24-33, 2014.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 207–225, 2010.

ASSIS, W. A. DE et al. The characterization of the fat bodies and oenocytes in the adult females of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. **Arthropod Structure and Development**, v. 43, n. 5, p. 501–509, set. 2014.

ARAÚJO, A. P. et al. Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in *Lutzomyia longipalpis* females. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 107, n. 4, p. 543–45, 2012.

BARROS, A. T. M. *et al.* **Surtos da mosca-dos-estábulo no Brasil: retrospectiva 50 anos (1971/2020)**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2023. 58 p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte; n. 308). ISSN 1983-974X.

BATISTA, K. K.S; SANT'ANNA, N. F. **Estudo da interação do *Trypanosoma rangeli* com o intestino de *Rhodnius prolixus***. In: 2010: II CONFLICT - Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica. Editora Fluminense, Rio de Janeiro, 2011.

BABIOR, B. M., KIPNES, R. S., CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms. The production by leucocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J Clin Invest**. v. 52, p. 741–744, 1973.

BAGUR, R., HAJNOCZKY, G. Intracellular Ca²⁺ sensing: its role in calcium homeostasis and signaling. **Mol. Cell**. v. 66, p. 780–788, 2017.

Bahia AC, Oliveira JHM, Kubota MS, Araujo HRC, Lima JBP, et al. (2013) The Role of Reactive Oxygen Species in *Anopheles aquasalis* Response to *Plasmodium vivax* Infection. **PLoS ONE** 8(2): e57014. doi:10.1371/journal.pone.0057014

BALDACCHINO, F.; MUENWORN, V.; DESQUESNES, M.; DESOLI, F.; CHAROENVIRIYAPHAP, T.; DUVALLET, G. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. **Parasite**. v. 20, p. 26-39, 2013.

BARBERIAN, D. A. Successful Transmission of Cutaneous Leishmaniasis by the Bites of *Stomoxys calcitrans*, 1938.

BARCLAY MCGHEE, R. AND POSTELL, F. J. Axenic Cultivation of *Phytomonas davidi* Lafont (Trypanosomatidae), a Symbiote of Laticiferous Plants (Euphorbiaceae). *The Journal of Protozoology*, 23(2); 2007. p. 238–241.

BARROS, A. T. M.; RODRIGUES, V. D.; CANCADO, P. H. D.; DOMINGUES, L. N. Resistência da mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), à cipermetrina em áreas de surtos no Centro-Oeste brasileiro. **Rev. Bras. Parasitol. Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 802-806, 2019.

BAYLEY, D. L.; WHITFIELD, T. L.; LABRECQUE, G. C. Laboratory Biology and Techniques for Mass Producing the Stable Fly, *Stomoxys calcitrans*. **Journal of Medical Entomology**. v.12, p. 189-193, 1975.

BAYLIKA, M. M., ABRATA, O. B., STOREYB, J. M., STOREYB, K. B., LUSHCHAK, V. I. Interplay between diet-induced obesity and oxidative stress: Comparison between *Drosophila* and mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A v. 228, p. 18-2, 2019.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49 (2 Suppl 1), p. 3-8, 2000.

BERRIDGE, M.J. A structural analysis of intestinal absorption, in *Symposia of the Royal Entomological Society of London*. 5. Insect Ultrastructure (ed. A.e. Neville), pp. 135-51, 1970.

BHATNAGAR, R. K. et al. Synthetic propeptide inhibits mosquito midgut chitinase and blocks sporogonic development of malaria parasite. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 304, n. 4, p. 783–7, 2003.

BITTECOURT, A. J.; SANTOS, H. A.; FAMPA, P. First report of the presence of *Anaplasma marginale* in different tissues of the stable-fly *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) in Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. v. 23, p. 100515, 2021.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R., FLOHÉ, L. Selenium and redox signaling. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 617, p. 48–59, 2017.

BRITO, L. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R.; BARBIERI, F. S.; NETTO F. G. S.; CHAGAS, A. C. S.; CELESTINO, O. O. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteros de interesse veterinário em laboratório. **ISSN 0103-9865**, Set, 2008.

BROCE, A. B.; HOGSETTE, J.; PAISLEY, S. Winter feeding sites of hay in round bales as major developmental sites of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in pastures in Spring and Summer. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 6, p. 2307-2312, 2005.

BRUCE, W. N.; DECKER, G. C. The Relationship of Stable Fly Abundance to Milk Production in Dairy Cattle. **Journal of Economic Entomology**. v. 51, p. 269–274, 1958.

CAMARGO, E. P. Phytomonas e outros tripanossomatídeos parasitas de plantas e frutas 71 Av. Parasitol. 1999; 42, p. 29-112.

CAMPBELL, J. B.; SKODA, S. R.; BERKEBILE, D. R.; BOXLER, D. J.; THOMAS, G. D.; ADAMS, D. C.; DAVIS, R. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. **Journal of Economic Entomology**. v. 94, p. 780–783, 2001.

CANAVOSO, L. E. et al. Fat Metabolism in Insects. Annual Review of Nutrition, v. 21, n. 1, p. 23–46, 2001.

CASTRO, L., TORTORA, V., MANSILLA, S., RADI, R. Aconitases: non-redox iron-sulfur proteins sensitive to reactive species. **Acc. Chem. Res.** v. 52, p. 2609–2619, 2019.

CHAITANYA, R. K., SHASHANK, K., SRIDEVI, P. Oxidative Stress in Invertebrate Systems [Internet]. Free Radicals and Diseases. **InTech**. 2016.

CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Valor Bruto da Produção deve alcançar R\$ 700 bi em 2020 [Online]. Disponível em:

<https://www.cnabrazil.org.br/boletins/valor-bruto-da-producao-deve-alcancar-r-700-bi-em2020>. Acessado em 02 de março de 2020.

CORTINAS, R.; JONES, C. J. Ectoparasites of Cattle and Small Ruminants. **Vet Clin Food Anim.** v.22, p.673–693, 2006.

COOK, D. F.; TELFER, D. V.; LINDSEY, J. B.; DEYL, R. A. Substrates across horticultural and livestock industries that support the development of stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Austral Entomology**, v. 57, n. 3, p. 344-348, 2018.

CORRÊA, E. C.; RIBAS, A. C. A.; GAONA, J. C.; BARROS, A. T. M. Abundância de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) em diferentes subprodutos canavieiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 11, p. 1303-1308, 2013.

COSENTINO-GOMES, D., ROCCO-MACHADO, N., MEYER-FERNANDES, J.R. *Rhodnius prolixus*: modulation of antioxidant defenses by *Trypanosoma rangeli*. **Experimental Parasitology**. v. 145, p. 118-124, 2014.

CROSS, J. V., TEMPLETON, D. J. Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation, **Antioxid Redox Signal**. v. 8, p. 1819-1827, 2006.

DAGNELL, M. et al. Bicarbonate is essential for protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) oxidation and cellular signaling through EGF-triggered phosphorylation cascades. **J. Biol. Chem.** n. 294, p. 12330–12338, 2019.

D'AVILA-LEVY, C.M.; BEARZATTO, B.; AMBROISE, J.; HELAERS, R.; BUTENKO, A.; YURCHENKO, V.; A. MORELLI, K.; L. C. SANTOS, H.; BROUILLARD, P.; GRELLIER, P.; et al. First Draft Genome of the Trypanosomatid *Herpetomonas muscarum ingenoplastis* through MinION Oxford Nanopore Technology and Illumina Sequencing. **Trop. Med. Infect. Dis**, v.5, n. 1, p. 1-6, 2020. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5010025>

DE OLIVEIRA, G. A.; LIEBERMAN, J.; BARILLAS-MURY, C. Epithelial Nitration by a Peroxidase/NOX5 System Mediates Mosquito Antiplasmodial Immunity. **Science**, v. 335, n. 6070, p. 856–859, 2012.

DIAS, F. A.; GANDARA, A. C. P.; QUEIROZ-BARROS, F. G.; OLIVEIRA, R. L. L.; SORGINE, M. H. F.; BRAZ, G. R. C.; OLIVEIRA, P. L. Ovarian Dual Oxidase (Duox) Activity Is Essential for Insect Eggshell Hardening and Waterproofing*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 49, p. 35058–35067, 2013.

DIAZ-ALBITER, H., SANT'ANNA, M. R., GENTA, F. A., DILLON, R. J. Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the sand phlebotomine fly *Lutzomyia longipalpis*. **J Biol Chem**. v. 287, n. 28, p. 23995-4003, 2012. Epub 2012 May 29.

DI MARZO N., CHISCI E., GIOVANNONI R. The Role of Hydrogen Peroxide in RedoxDependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. **Cells**. n. 7, v. 10, 2018.

DOBSON, A. J. EZCURRA, M., FLANAGAN, C. E., SUMMERFIELD, A. C., PIPER, M. D. W, GEMS, D., ALIC, N. Nutritional programming of lifespan by FOXO inhibition on sugar-rich diets. **Cell Rep**. v. 18, p. 299-306, 2017.

DOMINGUES, P. F. Grande desafio, como controlar *S. calcitrans*. **Revista Leite Integral**. 2017. Acessado em: <https://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/grande-desafio>

DRÖGE W, Free Radicals in the Physiological Control of cell Function, **Physiol. Rev**. v. 82, p. 47-95, 2002.

DUBOVSKIY, I.M., MARTEMYANOV, V.V., VORONTSOVA, Y.L., RANTALA, M.J., GRYZANOVA, E.V., GLUPOV, V.V. Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology**. v. 148, p. 1-5, 2008.

EVANS, P. and B. Halliwell, Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. **Ann N Y Acad Sci**. V. 884, p. 19–40, 1999.

ECKER, A. et al. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 605-616, 2017.

FAMPA, P.; CORRÊA-DA-SILVA, M. S.; LIMA, D. C.; OLIVEIRA, S. M. P.; MOTTA, M. C. M.; SARAIVA, E. M. B. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. **Int J Parasitol**. 2003; 33:1019–1026

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v. 408, p. 239–247, 2000.

FIORINI, J. E.; TAKATA, C. S.; TEOFILLO, V. M.; NASCIMENTO, L. C.; FARIA-ESILVA, P. M.; SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Caracterização morfológica, bioquímica e molecular de *Herpetomonas samuelpessoai* camargoi n. subsp., um tripanossomatídeo isolado da flor da abóbora *Cucurbita moschata*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48 (1); 2001. 62-69.

FLORENCIO, M., ROSA, D., DE ARAÚJO LIMA, K. R., DA COSTA, G. A., GUEDES, K. V. G., FAMPA, P. Establishment and quantitative measure of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) colony production in Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2020; 21, 100434.

FOIL, L. D., HOGSETTE, J. A. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. 74 *Revue scientifique et technique de l'Office international des epizooties*. 1994; 13, 1125–1158.

FOIL, L. D.; MEEK, C. L.; ADAMS, W. V.; ISSEL, C. J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). **American Journal of Veterinary Research**. v. 44, p.155–156, 1983.

FOKIN, S. I.; SCHRALLHAMMER, M.; CHIELLINI, C.; VERNI, F.; PETRONI, G. Ciliados de vida livre como potenciais reservatórios de parasitas eucarióticos: ocorrência de um tripanossomatídeo no macronúcleo de *Euplotes neycticus*. *Parasitas e vetores*, 7 (1); 2014. 1-8.

FREDRIKSON, G., TORNQVIST, H. & BELFRAGE, P. (1986) Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 876, 288–293. Available from: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90286-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90286-9)

Friend, W.G., 1965. Gorging response in *Rhodnius Prolixus* stahl. *Can. J. Zool.* 43, 125–132.

GANDARA, A. C. P., TORRES, A., BAHIA, A. C., OLIVEIRA, P. L., & SCHAMA, R. Evolutionary origin and function of NOX4-art, an arthropod specific NADPH oxidase. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n.1, p. 1-16, 2017.

Gandara ACP, Dias FA, de Lemos PC et al (2021) Urate and NOX5 control blood digestion in the hematophagous insect *Rhodnius prolixus*. *Front Physiol* 12:1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.633093>

GARCÍA, J.G., ANSORENA, E., IZAL, I. et al. Structure, regulation, and physiological functions of NADPH oxidase 5 (NOX5). **J Physiol Biochem**. v. 79, p. 383–395, 2023.

GARVER, L. S.; DE ALMEIDA OLIVEIRA, G.; BARILLAS-MURY, C. The JNK Pathway Is a Key Mediator of *Anopheles gambiae* Antiplasmodial Immunity. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 1-10, e1003622, 2013.

GERRY, A.C., PETERSON, N. G., MULLENS, B. A. Predicting and controlling stable flies on California dairies. Oakland: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 8258, 2007.

GONDIM, K. C. et al. Lipid metabolism in insect disease vectors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 101, n. August, p. 108–123, 2018.

- GOMES, R. A.; FREDERICO, M. A.; MEIRELES, A. C.; PEREIRA, R. D. L.; PASSOS, V. 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 Biochem. Mol. Biol.* 36, 322–335.
- GREEN, B. E.; FOIL, L. D.; HAGIUS, S. D.; ISSEL, C. J. Stability of equine infectious anemia virus in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), and *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) stored at -70 degrees C. **Journal of the American Mosquito Control Association.** v.12, p. 334-336, 1996.
- GRISI, L., LEITE, R.C., MARTINS, J.R., BARROS, A.T., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P.H., LEÓN, A.A., PEREIRA, J.B., VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v.23, p. 150-156, 2014.
- GRONKE, S., CLARKE, D. F., BROUGHTON, S., ANDREWS, T. D., PARTRIDGE, L. Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. **PLoS Genet.** v. 6, 2010. Article e1000857
- GRUENEWALD, C., et al., Hyperoxia-induced neurodegeneration as a tool to identify neuroprotective genes in *Drosophila melanogaster*. **Free Radic Biol Med.** v. 46, n. 12, p. 1668–76, 2009.
- HA, E. M., OH, C. T., BAE, Y. S., LEE, W. J. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. **Science.** v. 310, v. 5749, p. 847-50, 2005.
- HA, E. M., LEE, K. A., PARK, S. H. et al. Regulation of DUOX by the Gαq-Phospholipase Cβ-Ca²⁺ pathway in *Drosophila* gut immunity. **Dev Cell.** v. 16, p. 386–397, 2009.
- HAO, Z., KASUMBA, I., AKSOY, S. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 33, p. 1155–1164, 2003.
- HALLIWELL, B., CLEMENT, M.V., LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett.** v. 486, p. 10-13, 2000.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE & J. M. C. in *Free radicals in biology and medicine* (Oxford University Press), 2015.
- HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. *Journal of Insect Physiology* Pergamon, v. 55, n. 8, p. 760-773, 2007.
- HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Energetics of insect diapause. *Annual Review of Entomology*, v. 56, p. 103–121, 7 jan. 2011.
- HAWKINS, J. A., ADAMS, W. V., COOK, L., WILSON, B. H., ROTH, E. E. Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus* Hine) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission of equine infectious anemia to ponies in Louisiana. **American Journal of Veterinary Research.** v.34, p.1583-1586, 1973.

- HAWKINS, C. L. & DAVIES, M. J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. **J. Biol. Chem.** v. 294, p. 19683–19708, 2019.
- HELMUT, S., DEAN, P. J. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** v. 21, p. 363, 2020.
- HU, J. S. et al. Mechanisms of TiO₂ NPs-induced phoxim metabolism in silkworm (*Bombyx mori*) fat body. **Pesticide Biochemistry and Physiology.** v. 129, p. 89–94, maio 2016.
- INBAR, E.; HUGHITT, V. K.; DILLON, L. A. L.; GHOSH, K.; EL-SAYED, N. M.; SACKS, D. L. The Transcriptome of *Leishmania major* Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector, *mBio*, 8(2); 2017.
- JASKOWSKA, E.; BUTLER, C.; PRESTON, G.; KELLY, S. Phytomonas: tripanossomatídeos adaptados a ambientes vegetais. *Patógenos PLoS*, 11 (1); 2015. e1004484.
- KATO M, MARUMO M, NAKAYAMA J, MATSUMOTO M, YABE-NISHIMURA C, KAMATA T. 2016. The ROS-generating oxidase NOX1 is required for epithelial restitution following colitis. **Exp Anim.** v. 65, n.3, p.197-205.
- KAWAHARA, T. QUINN, M.T. LAMBETH, J. D. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. **BMC Evol Biol**, v. 7, n. 109, p. 1-21, 2007.
- KHALIFA, A.; NASR, Z.; ERROUISSI, F. First data on the daily and seasonal activity patterns of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) under Mediterranean semiarid climate in a dairy cattle farm in Tunisia. **International Journal of Tropical Insect Science.** v.42, p.1437–1447, 2022.
- KIRKINEZOS, I. G., C.T. Moraes, Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Semin Cell Dev Biol**, v. 12, n. 6, p. 449–57, 2001.
- KLAFKE, G., WEBSTER, A., DALL AGNOL, B., PRADEL, E., SILVA, J., DE LA CANAL, L.H., BECKER, M., OSÓRIO, M.F., MANSSON, M., BARRETO, R., SCHEFFER, R., SOUZA, U.A., CORASSINI, V.B., DOS SANTOS, J., RECK, J., MARTINS, J.R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Disease.** v. 8, p. 73-80, 2017.
- KNOCK, G. NADPH oxidase in the vasculature: expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension. **Free Radic. Biol. Med.** v. 145, p. 385–427 2019.
- KOSTYGOV, Y. Euglenozoa: taxonomia, diversidade e ecologia, simbioses e vírus. *Abra Biol*, 11; 2021. Artigo 200407.
- Kretsinger RH, Nockolds CE: Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *Journal of Biological Chemistry.* 1973, 248 (9): 3313-3326.

KUNZ, S. E., MONTY, J. Biology and ecology of *Stomoxys nigra* Macquart and *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Mauritius. *Bulletin of Entomological Research*. 1976; v. 66, p. 745–755.

LAMBETH, J. D.; NEISH, A. S. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu Rev Pathol*. v. 9, p. 119–45, 2014.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*. v. 4, n. 3, p. 181–189, 2004. doi:10.1038/nri1312

LECHUGA-SANCHO, A. M., GALLEGO-ANDUJAR, D., RUIZ-OCAÑA, P., VISIEDO, F. M., SAEZ-BENITO, A., SCHWARZ, M., MATEOS, R. M. Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. *PLoS One*, v. 13, 2018. Article e0191547

LEE KA, LEE WJ. "Interações imunometabólicas durante infecção sistêmica e entérica em *Drosophila*". *Curr Opin Insect Sci* (2018) 29:21–6. doi: 10.1016/j.cois.2018.05.014

LIMA, K.; LOPES, L.R.; MACHADO-NETO, J.A. DPI, um inibidor de nox/duox, induz apoptose e amplifica os efeitos antineoplásicos de ruxolitinibe em modelos celulares de neoplasia mieloproliferativa. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 42, n. 2, 2020.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact*. v. 224, p. 164-175, 2014.

MACLEOD, E. T., MAUDLIN, I., DARBY, A. C., WELBURN, S. C. Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse. *Parasitology*. v. 134, p. 827–831, 2007.

MARIN, C. et al. *Herpetomonas* spp. isolated from tomato fruits (*Lycopersicon*

MASLOV, D. A.; OPPERDOES, F. R.; KOSTYGOV, A. Y.; HASHIMI, H.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V. Avanços recentes na pesquisa de tripanossomatídeos: organização do genoma, expressão, metabolismo, taxonomia e evolução. *Parasitology*, 146 (1); 2019. 1-27.

MASLOV, D. A.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; LUKEŠ, J. Diversidade e filogenia dos insetos tripanossomatídeos: tudo o que está oculto será revelado. *Tendências em parasitologia*. 2013; 29 (1), 43-52.

MATTHEWS, B. B., DOS SANTOS, G., CROSBY, M. A., EMMERT, D. B., ST PIERRE, S. E., GRAMATES, L. S., ZHOU, P., SCHROEDER, A. J., FALLS, K., STRELETS, V., RUSSO, S. M., GELBART, W. M., FLYBASE CONSORTIUM. Gene Model Annotations for *Drosophila melanogaster*: Impact of High-Throughput Data. *G3 (Bethesda)*. v.5, p. 17211736, 2015.

MCGHEE, R. B.; COSGROVE, W. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol. Rev.*, 44; 1980. p. 140-173.

MERZENDORFER, H.; KELKENBERG, M.; MUTHUKRISHNAN, S. Matrizes peritróficas. Matrizes compostas extracelulares em artrópodes. 255-324.

MULLENS, B. A.; LII, K. S.; MAO, Y.; MEYER, J. A.; PETERSON, N. G.; SZIJJ, C. E. Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. **Med Vet Entomol.** v. 20, p. 122–37, 2006.

NIEDZWIECKI, M. M. et al. The exposome: molecules to populations. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 59, p. 107–127, 2019.

OYARZÚN, M. P., QUIROZ, A., BIRKETT, M. A. Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. **Medical and Veterinary Entomology.** v. 22, p. 188-202, 2008.

OLIVEIRA, J. H. M., GONÇALVES, R. L. S., LARA, F. A., DIAS, F. A., GANDARA A. C.

P, ET AL. Blood Meal-Derived Heme Decreases ROS Levels in the Midgut of *Aedes aegypti* and Allows. Proliferation of Intestinal Microbiota. **PLoS Pathog.** v. 7, n. 3, 2011. e1001320. doi:10.1371/journal.ppat.1001320

PALAVESAM, A., GUERRERO, F. D., HEEKIN, A. M., WANG, J., DOWD, S. E., SUN, Y., FOIL, L. D., PÉREZ DE LEÓN, A. A. Pyrosequencing-based analysis of the microbiome associated with the horn fly, *Haematobia irritans*. **PLoS One.** v. 7, e44390, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0044390.

PAN, X. ZHOU, G. WU, J. BIAN, G. LU, P. RAIKHEL, A.S. et al. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **P Natl Acad Sci USA**, v. 109, n. 1, p. 23–31, 2012.

PARASCANDOLO, A. & LAUKKANEN, M. O. Carcinogenesis and reactive oxygen species signaling: interaction of the NADPH oxidase NOX1-5 and superoxide dismutase 1-3 signal transduction pathways. **Antioxid. Redox Signal.** v. 30, p. 443–486, 2019.

PATEL, P. H. et al. Damage sensing by a Nox-Ask1-MKK3-p38 signaling pathway mediates regeneration in the adult *Drosophila* midgut. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. doi:10.1038/s41467-019-12336-w

PENG, L.-Y.; DAI, Z.-W.; YANG, R.-R.; ZHU, Z.; WANG, W.; ZHOU, X.; BAO, Y.-Y. NADPH Oxidase 5 Is Essential for Molting and Oviposition in a Rice Planthopper *Nilaparvata lugens*. **Insects**, v.11, n.9, p. 2-13, 2020.

PETTIGREW, C. A.; CLERKIN; J. S.; COTTER, T. G. DUOX Enzyme Activity Promotes AKT Signalling in Prostate Cancer Cells. **Anticancer Research**, v. 32, n. 12, p. 5175-5181, 2012.

POTTER, S. C. et al. HMMER web server: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W200–W204, 2018.

POVEDA C, HERREROS-CABELLO A, CALLEJAS-HERNÁNDEZ F, OSUNA-PÉREZ J, MAZA MC, et al. Interaction of Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family 1 (SLAMF1) receptor with *Trypanosoma cruzi* is strain-dependent and affects NADPH oxidase expression and activity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, p. 01-22, 2020.

- RECZEK, C. R. & CHANDEL, N. S. ROS-dependent signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 33, p. 8–13, 2015.
- RIBEIRO, J.M., FRANCISCHETTI, I.M., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 73–88
- RIGANTI, C., GAZZANO, E., POLIMENI, M., COSTAMAGNA, C., BOSIA, A., GHIGO, D. Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry.** v. 279, p. 47726-47731, 2004.
- ROCCO-MACHADO, N., COSENTINO-GOMES, D., NASCIMENTO, M.T., PAESVIEIRA, L., KHAN, Y.A., MITTRA, B., ANDREWS, N.W., MEYER-FERNANDES, J.R. Leishmania amazonensis ferric iron reductase (LFR1) is a bifunctional enzyme: Unveiling a NADPH oxidase activity. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 143, p. 341-353, 2019. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.026. Epub 2019 Aug 22.
- ROMA, G. C.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*, v. 41, n. 5, p. 395–401, jul. 2010.
- ROMERO, A., BROCE, A., ZUREK, L. Role of bacteria in the oviposition behaviour and larval development of stable flies. **Med Vet Entomol.** v. 20, p. 115–21, 2006.
- Rogers, W. E, Wallace, F.G. 1971. Two New Subspecies of *Herpetomonas muscarum* (Leidy, 1856) Kent, 1880. *The Journal of Protozoology.* 18: 645-649.
- ROSA, D. **Stomoxys calcitrans: primeira identificação de infecção natural por Herpetomonas muscarum, aspectos de sua interação e caracterização de hemócitos circulantes.** TESE DE DOUTORADO (Programa de Pós-graduação em Ciências veterinárias, UFRRJ), 108 p, 2022.
- ROY, S.G., HANSEN, I.A. & RAIKHEL, A.S. Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 37, 1317–1326, 2007.
- SANTOS, C. X. et al. Targeted redox inhibition of protein phosphatase 1 by Nox4 regulates eIF2alpha-mediated stress signaling. **EMBO J.** v. 35, p. 319–334, 2016.
- SAEAUE, L. et al. Antioxidative systems defense against oxidative stress induced by blood meal in *Aedes aegypti*. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** v. 42, n. 3, p. 542–9, 2011.
- SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of 521 signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 38, p. 995– 522, 2005.
- SERIGATI, F. A agricultura puxa o PIB? **Mercado e Negócios.** p. 13-14, 2013.
- SCHAUB, G. A. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitology Today*, v.10, p. 463-468, 1994.
- SIES H., BERNDT, C., JONES, D. P. Oxidative stress. **Annu Rev Biochem**, v. 86, p. 715– 748, 2017.

SIES, H., JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 21, n. 7, p. 363–383, 2020. Nature Research.

SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKEŠ, J. A evolução e diversidade de flagelados cinetoplastídeos . *Tendências em Parasitologia* 22; 2006. 168 – 174.

SCOLES, G. A.; BROCE, A. B.; LYSYK, T. J.; PALMER, G. H. Relative Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *DERMACENTOR*, A. (Acari: Ixodidae) Compared with Mechanical Transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **J. Med. Entomol.** v.42, p. 668-675, 2005.

SLOAN, M. A.; BROOKS, K.; OTTO, T. D.; SANDERS, M. J.; COTTON, J. A.; LIGOXYGAKIS, P. Paralelos transcricionais e genômicosentre o parasita monóxeno *Herpetomonas muscarum* e *Leishmania*. **PLoS Genet**, v. 15, n. 11, 2019.

SLOAN, M.A. & LIGOXYGAKIS, P. Tools for the Genetic Manipulation of *Herpetomonas muscarum*. **Genes, Genomes, Genetics**. v. 10: p.1613-1616, 2020.

SUMIMOTO, H. Structure, regulation and evolution of Nox-Family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. **FEBS J**. v. 275, n. 13, p. 3249–77, 2008.

TAYLOR, D. B., MOON, R. D., MARK, D. R. Economic Impact of Stable Flies (Diptera: Muscidae) on Dairy and Beef Cattle Production. **Modeling/gis, risk assessment, economic impact**. v.49, p.198-209, 2012.

TYC, J. et al. Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera:Brachycera): frequent cosmopolitism and moderate host specificity. *Molecular phylogenetics and evolution*. United States, 69(1); 2013. p. 255–264.

TOPRAK, U. et al. A journey into the world of insect lipid metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 104, n. 2, p. 1–67, 2020.

TRAVERSA, D., OTRANTO, D., IORIO, R., CARLUCCIO, A., CONTRI, A., PAOLETTI, B., BARTOLINI, R., GIANGASPERO, A. Identification of the intermediate hosts of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* under field conditions. **Med Vet Entomol**. v. 22, p. 283–7, 2008.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol Aspects**. v. 25, n. 1-2, p. 211-20, 2004.

WEISS, B. L., WANG, J., MALTZ, M. A. et al. Trypanosome infection establishment in the Tsetse fly gut is influenced by microbiomeregulated host immune barriers. **PLoS Pathog**, 2013. 9:e1003318. [https:// doi.org/10.1371/journal.ppat.1003318](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003318)

WIEMAN, G. A., CAMPBELL, J. B., DESHAZER, J. A., BERRY, I. L. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) and heat stress on weight gain and feed efficiency of feeder cattle. **Journal of Economic Entomology**. v.85, p. 1835-1842, 1992.

WINTERBOURN, C. C. Biological production, detection, and fate of hydrogen peroxide. **Antioxid. Redox Signal.** v. 29, p. 541–551, 2018.

WONG, H. S., BENOIT, B. & BRAND, M. D. Mitochondrial and cytosolic sources of hydrogen peroxide in resting C2C12 myoblasts. **Free Radic. Biol. Med.** v. 130, p. 140–150, 2019.

YAO, Z.; WANG, A.; LI1, Y.; CAI1, Z.; LEMAITRE, B.; ZHANG, H. The dual oxidase gene BdDuox regulates the intestinal bacterial community homeostasis of *Bactrocera dorsalis*. **The International Society for Microbial Ecology Journal.** v. 10, p. 1037–1050, 2016.

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y. Skin lesions in dogs, horses and calves caused by the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). **Journal of Tropical Livestock Disease.** v.48, p. 347-349, 1995.

ZHANG, X., KRAUSE, K. H., XENARIOS, I., SOLDATI, T., BOECKMANN, B. Evolution of the ferric reductase domain (FRD) superfamily: modularity, functional diversification, and signature motifs. **PLoS One.** v. 8, n. 3:e58126, 2013.

ZUMPT, F. The Stomoxyine biting flies of the world. **Taxonomy, biology, economic importance and control measures.** 1^a ed. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, p. 175, 1973.

ZEIDA, A. et al. Catalysis of peroxide reduction by fast reacting protein thiols. **Chem. Rev.** v. 119, p. 10829–10855, 2019. Comprehensive review of thiol-based redox chemistry.

XIAO, X., YANG, L., PANG, X. et al. A Mesh–Duox pathway regulates homeostasis in the insect gut. **Nat Microbiol.** v. 2, p. 17020, 2017. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.20> 44.

ZECHNER, R., KIENESBERGER, P.C., HAEMMERLE, G., ZIMMERMANN, R. & LASS, A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research*, v. 50, p. 03–21, 2009. Available from: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800031-JLR200>

ZENG, T., SU, H. A., LIU, Y. L., LI, J. F., JIANG, D. X., LU, Y. Y., QI, Y. X. Serotonin modulates insect gut bacterial community homeostasis. **BMC Biol.** v. 20, n. 1, p. 105, 2022. [10.1186/s12915-022-01319-x](https://doi.org/10.1186/s12915-022-01319-x)

ZHU, F., ZHENG, H., CHEN, S. et al. Malaria oocysts require circumsporozoite protein to evade mosquito immunity. **Nat Commun**, 2022. 13:3208. <https://doi.org/10.1038/s41467-02230988-z>

ANEXOS

FIGURA S1. Alinhamento de seqüências de DUOX1 e 2 de *S. calcitrans* (Sc), com DUOX de *Aedes aegypti* (Aed), *Drosophila melanogaster* (Dm) e *Musca domestica* (Md).

Aed	-----MSVLRR-----PFVAVLVLCVTSLLLAQSNDGG	29
Dm	MSVPSAPHQRAESKNRVRPRGQKNRKLPKLRLHWPATYGGALLL-LLISYGLELGSVHC	59
Md	-----MFFDICSP-RQYHGKAFALKVWL-SLAVVILVLLDVNC	36
Sc1	-----MSFNI FKLRRANHHVKAFSLKACL-SLAVILLVLLDVNC	37
Sc2	-----MFTKKANHHVKAFSLKACL-SLAVILLVLLDVNC	33
	: * : *	
Aed	GERLMShVEKQRYDGWYNNLAHPDWGAVDNHLTRKAPPAYSdGVYVLAGSSRPSPRKLSR	89
Dm	YEKMYsQTEKQRYDGWYNNLAHPDWGSVDSLVRKAPPsYSDGVYAMAGANRPSTRRLSR	119
Md	YEKIYSQIEKQRYDGWYNNLAHPDWGSVDSLVRKAPPsYSDGVYAMAGSNRPSTRRLSR	96
Sc1	YEKIYSQIEKQRYDGWYNNLAHPDWGSVDSLVRKAPPsYSDGVYAMAGSNRPSTRRLSR	97
Sc2	YEKIYSQIEKQRYDGWYNNLAHPDWGSVDSLVRKAPPsYSDGVYAMAGSNRPSTRRLSR	93
	*.: * : * :*****:*. *. *****:***** .:*. * ** * : ** *	
Aed	LfMRGkdGLPSMHNRTAILAFFGQVVTNEIvMASESGCPIEMHRIEIEKcDEMYDRECRG	149
Dm	LfMRGkdGLGSKFNRTALLAFFGQLVANEIvMASESGCPIEMHRIEIEKcDEMYDRECRG	179
Md	LfMRGRdGLGSKYNRtGLLAFFGQVVANEIvMASESGCPIEMHRIEIEKcDEMYDKECRG	156
Sc1	LfMRGRdGLGSKFNRTALLAFFGQVVANEIvMASESGCPIEMHRIEIEKcDEMYDKECRG	157
Sc2	LfMRGRdGLGSKFNRTALLAFFGQVVANEIvMASESGCPIEMHRIEIEKcDEMYDKECRG	153
	*****:*** * .***.:*****:*. *****:*****:***	
Aed	DRYIPfHRAAYDRNTGQSPNAPREqINQMTAWIDGSFIYSTSEAWLNAMRAFQDGLLLTD	209
Dm	DKYIPfHRAAYDRDTGQSPNAPREqINQMTAWIDGSFIYSTSEAWLNAMRSFHNGTLLTE	239
Md	DKYIPfHRAAYDRNTGQSPNAPREqINQMTAWIDGSFIYSTSEAWLNAMRSFHNGTLLTD	216
Sc1	DKYIPfHRAAYDRSTGQSPNAPREqINQMTAWIDGSFIYSTSEAWLNAMRSFHNGTLLTD	217
Sc2	DKYIPfHRAAYDRSTGQSPNAPREqINQMTAWIDGSFIYSTSEAWLNAMRSFHNGTLLTD	213
	* :***** .*****:*****:*****:***	
Aed	KDGTMPVKNtMRVPLFNNPVPHVMRMLSPERLYLLGDPRtNQNPALLtFAILLRWHNVV	269
Dm	KDGKLPVRNtMRVPLFNNPVPSVMKMLSPERLFLLLGDPRtNQNPAILSFAILFWRWHNTL	299
Md	KSGKLPVRNtMRVPLFNNPVPSVMKMLSPERLFLLLGDPRtNQNPAVLAFAILFWRWHNTL	276
Sc1	KSGKLPVRNtMRVPLFNNPVPSVMKMLSPERLFLLLGDPRtNQNPAVLAFAILFVRWHNTL	277
Sc2	KSGKLPVRNtMRVPLFNNPVPSVMKMLSPERLFLLLGDPRtNQNPAVLAFAILFVRWHNTL	273
	* . * . : * :***** * * :*****:*****:*****:*** . :	
Aed	AKRVRKQHRDWTDEEIfQRARRVVASLQNVITyEYLPAFLDAELPPYtGYKADThPGVS	329
Dm	AQRiKRVHPDWSDEEIdYQRARHTVIASLQNVIVyEYLPAFLGTSLPPYEGYKQDIHPGIG	359
Md	AQRiKRAHSDWSDEEIdFQRARRTVIASLQNVILyEYLPAFLGSELrPYQGYNRDMHPGIG	336
Sc1	AQRiKRAHSDWSDEEIdFQRARRTVIASLQNVILyEYLPAFLASELrPYEGYNrDIHPGIG	337
Sc2	AQRiKRAHSDWSDEEIdFQRARRTVIASLQNVILyEYLPAFLASELrPYEGYNrDIHPGIG	333
	* : * : * : * * : * * : * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
Aed	HMFQAAAFrFGHSLIPpGLFRNGRCDFRkTNMDYPALRLCSSWwNSNDVLDdTPIEEFL	389
Dm	HIFQAAAFrFGHTMIppGIYRRDgQCnFKETpMGYPAVRLCSTWwDSSGFFADtSVEEVL	419
Md	HIFQAAAFrFGHTMIppGIYRRDStCNYKkTPMGYPAIRLCSTWwDSSDFLTDtTIEEIL	396
Sc1	HIFQAAAFrFGHTMIppGIYRRDStCNYKkTPMGYPAIRLCSTWwDSSDFFTDtSVEEIL	397
Sc2	HIFQAAAFrFGHTMIppGIYRRDStCNYKkTPMGYPAIRLCSTWwDSSDFFTDtSVEEIL	393
	* :***** .:*****:***. * : * : * * : * * : * * : * * : *	
Aed	MGMASQIAEREDPllcSDVrdKlFGpMEfSRrdLGALNIMRGRDngLPDYNTARVAYKLP	449
Dm	MGLASQISEREDPvLcSDVrdKlFGpMEfTRrdLGALNIMRGRDngLPDYNTARESYGLK	479
Md	MGLSSQISEREDPvLcSDVrdKlFGpMEfTRrdLGALNIMRGRDngLPDYNSAREAFGLP	456
Sc1	MGLSSQISEREDPvLcSDVrdKlFGpMEfTRrdLGALNIMRGRDngLPDYNSAREAFGLP	457
Sc2	MGLSSQISEREDPvLcSDVrdKlFGpMEfTRrdLGALNIMRGRDngLPDYNSAREAFGLP	453
	* * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
Aed	KKKTWRDINPEVFERQPELLNLLIETyENRLDNVDVYVGGMLESDGKPGELFTAVIIdQF	509
Dm	RHKTWTDINPPLFETQPELLDMLKEAYDNKLDDVDVYVGGMLESYGQPGEFFTAVIKeQF	539
Md	RRNSWTEINPELFEKQPELLEMLISAYNDQLDDVDVYVGGMLESYGQPGELFTAVIKeQF	516
Sc1	KRATWTDINPELFAKQPELLEMLISAYNNQLDDVDVYVGGMLESYGQPGELFTAVIKeQF	517

Sc2	KRATWTDINPELFAKQPELLEMLISAYNNQLDDVDVYVGGMLESYGQPGELFTAVIKEQF :: :* :*** :* *****:.* .:.*::**:* ***** *:*:*:* *** :**	513
Aed	TRVRDADRFWFENEDNGIFTKEEIAELRKITMWDIIVNSTDIDPDEIQKDVFWHSEGDPC	569
Dm	QRLRDADRFWFENERNGIFTPEEIAELRKITLWDIIVNSTDVKEEIQKDVFMWRTGDPC	599
Md	ERLRDADRFWFENDQNGIFTREEIEEIRKITMYDIIIVNSTDIGEDDIQRNVFWHWEQGDPC	576
Sc1	ERLRDSDRFWFENDRNGIFTKEEIEEIRKITMYDIIIVNSTDIGVDDIQRDVFTWHEGDPC	577
Sc2	ERLRDSDRFWFENDRNGIFTKEEIEEIRKITMYDIIIVNSTDIGVDDIQRDVFTWHEGDPC *:*:*:* *****: ***** ** *:*:*:*:* *****: ::*:*:* ** * ****	573
Aed	PQPEQLNATLLEPCNYLEGYDYFSGSELAYIYSCVFLGFVPILCAGAGYCVIKLQNSRRR	629
Dm	PQPMQLNATELEPCTYLEGYDYFSGSELMFIYVCVFLGFVPILCAGAGYCVVKLQNSKRR	659
Md	PQPMQLNATELEPCTYLEGFDYFSGSELMFIYVCVFLGFVPILCAGAGYCVVKLQNSKRR	636
Sc1	PQPMQLNATELEPCTYLEGFDYFSGSELMFIYVCVFLGFVPILCAGAGYCVVKLQNSKRR	637
Sc2	PQPMQLNATELEPCTYLEGFDYFSGSELMFIYVCVFLGFVPILCAGAGYCVVKLQNSKRR *** ***** **** .***** :** *****:*****:*****:***	633
Aed	KLKIKQEALKNAGNSKQSVKEMVAREWLHANHKRLVTVKFGPEAAIYTVDRKGEKLRTFS	689
Dm	RLKIRQEALRAP-QHKGSVDKMLAREWLHANHKRLVTVKFGPEAAIYTVDRKGEKLRTFS	718
Md	KLKIRQEALRAP-QHKGSVDKMLAREWLHANHKRLVTVKFGPEAAIYTVDRKGEKLRTFS	695
Sc1	KLKIRQEALRAP-QHKGSVDKMLAREWLHANHKRLVTVKFGPEAAIYTVDRKGEKLRTFS	696
Sc2	KLKIRQEALRAP-QHKGSVDKMLAREWLHANHKRLVTVKFGPEAAIYTVDRKGEKLRTFS :*:*:*:* : * **:*:*:******:*****:*****:*****:*****	692
Aed	LKNVDVVTVEQSQENYKPKKPYILLRVPDHDLDVLELESNSARRKFVKKLEDFLLHKKD	749
Dm	LKHIDVVSVEESATNHKPKKPYILLRVPDHDLDVLELESYGARRKFVKKLEDFLLHKKD	778
Md	LKSVDVNVVEESAHNHKPKKPYILLRVPNDHDLDVLELESYGARRKFVKKLEDFLILHKKD	755
Sc1	LKSVDVVTVEESAHNHKPKKPYILLRVPNDHDLDVLELESYGARRKFVKKLEDFLILHKKD	756
Sc2	LKSVDVVTVEESAHNHKPKKPYILLRVPNDHDLDVLELESYGARRKFVKKLEDFLILHKKD ** :*** .**:* * : *****.***** .*****:*****:	752
Aed	MTFVEVPRDIMLAKAETRERRQKRLEHFFREAYALTFGLRPGERRRRSDASVDGEVMTVM	809
Dm	MTLMEVNRDIMLARAETRERRQKRLEYFFREAYALTFGLRPGERRRRSDASSDGEVMTVM	838
Md	MTLVEVNRDVMLASAETRERRQKRLEYFFREAYALTFGLRPGERRRRSDASSDGEVMTVM	815
Sc1	MTLMEVNRDIMLASAETRERRQKRLEYFFREAYALTFGLRPGERRRRSDASTDGEVMTVM	816
Sc2	MTLMEVNRDIMLASAETRERRQKRLEYFFREAYALTFGLRPGERRRRSDASTDGEVMTVM **:*:* **:*:* *****:*****:*****:***** *****	812
Aed	RTSLSKSEFAAALGMKPNDFVVRKMFNIVDKDQDGRISFQEFLETVVVLFVSRGKTDDKLRI	869
Dm	RTSLSKAEFAAALGMKPNDFVVRKMFNIVDKDQDGRISFQEFLETVVVLFVSRGKTDDKLRI	898
Md	RTSLSKAEFAAALGMKPNDFVVRKMFNIVDKDQDGRISFQEFLETVVVLFVSRGKTDDKLRI	875
Sc1	RTSLSKAEFAAALGMKPNDFVVRKMFNIVDKDQDGRISFQEFLETVVVLFVSRGKTDDKLRI	876
Sc2	RTSLSKAEFAAALGMKPNDFVVRKMFNIVDKDQDGRISFQEFLETVVVLFVSRGKTDDKLRI *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	872
Aed	IFDMCDNDRNGVIDKGELSEMMRSLVEIARTTSLGDDQVTELDGMFQDVGLEHKNHLY	929
Dm	IFDMCDNDRNGVIDKGELSEMMRSLVEIARTTSLGDDQVTELDGMFQDVGLEHKNHLY	958
Md	IFDMCDNDRNGVIDKGELSEMMRSLVEIARTTSLGDDQVTELDGMFQDVGLEHKNHLY	935
Sc1	IFDMCDNDRNGVIDKGELSEMMRSLVEIARTTSLGDDQVTELDGMFQDVGLEHKNHLY	936
Sc2	IFDMCDNDRNGVIDKGELSEMMRSLVEIARTTSLGDDQVTELDGMFQDVGLEHKNHLY *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	932
Aed	QDFKLMKEYKGFDFVAIGLDCKGAKQNFLDTSTNVARMTSFHIEPPSDARRNWMQEKWDS	989
Dm	QDFKLMKEYKGFDFVAIGLDCKGAKQNFLDTSTNVARMTSFNIEPMQDKPRHWLLAKWDA	1018
Md	QDFKLMKEYKGFDFVAIGLDCKGAKQNFLDTSTNVARMTSFNIEPMQERPRHWMQEKWDS	995
Sc1	QDFKLMKEYKGFDFVAIGLDCKGAKQNFLDTSTNVARMTSFNIEPMQERPRHWMQEKWDS	996
Sc2	QDFKLMKEYKGFDFVAIGLDCKGAKQNFLDTSTNVARMTSFNIEPMQERPRHWMQEKWDS *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	992
Aed	YITFLEENRQNI FYLFLFYVITIVLFVERFIHYSFMAEHTDLRHIMGVGIATRGSAA SL	1049
Dm	YITFLEENRQNI FYLFLFYVVTIVLFVERFIHYSFMAEHTDLRHIMGVGIATRGSAA SL	1078
Md	YITFLEENRQNI FYLFLFYVITIVLFVERFIHYSFMAEHTDLRHIMGVGIATRGSAA SL	1055
Sc1	YITFLEENRQNI FYLFLFYVITIVLFVERFIHYSFMAEHTDLRHIMGVGIATRGSAA SL	1056
Sc2	YITFLEENRQNI FYLFLFYVITIVLFVERFIHYSFMAEHTDLRHIMGVGIATRGSAA SL * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	1052
Aed	SFCYSLLLLMSRNLITKLKEFP IQQYIPLDSHIQFHKIAACTALFFSLLHTVGHIVNFY	1109

Dm	SFCYSLLLLTMARNLITKLKEFPQQYIPLDSHIQFHKIAACTALFFSVLHTVGHIVNFY	1138
Md	SFCYSLLLLTMARNLITKLKEFPQQYIPLDSHIQFHKIAACTALFFSVLHTVGHIVNFY	1115
Sc1	SFCYSLLLLTMARNLITKLKEFPQQYIPLDSHIQFHKIAACTALFFSVLHTVGHIVNFY	1116
Sc2	SFCYSLLLLTMARNLITKLKEFPQQYIPLDSHIQFHKIAACTALFFSVLHTVGHIVNFY *****:*****:*****:*****:*****	1112
Aed	HVSTQSIENLKCLTKEVHFTSDYRPDITYWLFQTVTGVTVGMLFVIMCIIFAFAHSTIRK	1169
Dm	HVSTQSHENLRCLTREVHFASDYKPDITFWLWFQTVTGTGTVMLFIIMCIIFVFAHPTIRK	1198
Md	HVSTQSHENLKCLTREVHFASDYKPDITFWLWFQTVTGTGTVMLFIIMCIIFVFAHPTIRK	1175
Sc1	HVSTQSHENLKCLTREVHFASDYKPDITFWLWFQTVTGTGTVMLFIIMCIIFVFAHPTIRK	1176
Sc2	HVSTQSHENLKCLTREVHFASDYKPDITFWLWFQTVTGTGTVMLFIIMCIIFVFAHPTIRK ***** ***:***:***:***:***:***:***** ***:**:*:***** **	1172
Aed	KAYKFFWNAHSLYIVLYALCLIHGLARLTGAPRFLWFFIGPGIVYTLDKIVSLRRTKYMAL	1229
Dm	KAYNFFWNMHTLYIGLYLLSLIHGLARLTGPPRFWMFFLGPVYTLDKIVSLRRTKYMAL	1258
Md	KAYKFFWNMHTLYIGLYLLSLIHGLARLTGPPRFWMFFLGPVYTLDKIVSLRRTKYMAL	1235
Sc1	KAYKFFWNMHTLYIGLYLLSLIHGLARLTGPPRFWMFFLGPVYTLDKIVSLRRTKYMAL	1236
Sc2	KAYKFFWNMHTLYIGLYLLSLIHGLARLTGPPRFWMFFLGPVYTLDKIVSLRRTKYMAL ***:*** *:*** ** *:***** *****:***:***:*****:*****	1232
Aed	DVIETDLLPSDVIKIKFYRPPNLKYLQWVRLSCTEIKPEEMHSFTLTSAPHENFLSCH	1289
Dm	DVIDTDLLPSDVIKIKFYRPPNLKYLQWVRLSCTAFRPHMHSFTLTSAPHENFLSCH	1318
Md	DVIETELLPSDVIKIKFYRPPNLKYLQWVRLSCTAFRPHMHSFTLTSAPHENFLSCH	1295
Sc1	DVIETELLPSDVIKIKFYRPPNLKYLQWVRLSCTAFRPHMHSFTLTSAPHENFLSCH	1296
Sc2	DVIETELLPSDVIKIKFYRPPNLKYLQWVRLSCTAFRPHMHSFTLTSAPHENFLSCH ***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	1292
Aed	IKAQGPWTWKLARNYFDPCNYPDDQPKIRIEGPFGGGNQDWYKFEVAVMVGGGIGVTPYA	1349
Dm	IKAQGPWTWKLARNYFDPCNYPEDQPKIRIEGPFGGGNQDWYKFEVAVMVGGGIGVTPYA	1378
Md	IKAQGPWTWKLARNYFDPCNYPEDQPKIRIEGPFGGGNQDWYKFEVAVMVGGGIGVTPYA	1355
Sc1	IKAQGPWTWKLARNYFDPCNYPEDQPKIRIEGPFGGGNQDWYKFEVAVMVGGGIGVTPYA	1356
Sc2	IKAQGPWTWKLARNYFDPCNYPEDQPKIRIEGPFGGGNQDWYKFEVAVMVGGGIGVTPYA *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	1352
Aed	SILNDLVFGTSTNRYSGVACKKVYFLWICPSHKHFEWFIDVLRDVEKKDVTNVLEIHFIF	1409
Dm	SILNDLVFGTSTNRYSGVACKKVYFLWICPSHKHFEWFIDVLRDVEKKDVTNVLEIHFIF	1438
Md	SILNDLVFGTSTNRYSGVACKKVYFLWICPSHKHFEWFIDVLRDVEKKDVTNVLEIHFIF	1415
Sc1	SILNDLVFGTSTNRYSGVACKKVYFLWICPSHKHFEWFIDVLRDVEKKDVTNVLEIHFIF	1416
Sc2	SILNDLVFGTSTNRYSGVACKKVYFLWICPSHKHFEWFIDVLRDVEKKDVTNVLEIHFIF *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	1412
Aed	TQFFHKFDLRTTMLYICENHFQRLSKTSMFTGLKAVNHFGPRDMSFSLKFVQKKHSYVSK	1469
Dm	TQFFHKFDLRTTMLYICENHFQRLSKTSMFTGLKAVNHFGPRDMSFSLKFVQKKHSYVSK	1498
Md	TQFFHKFDLRTTMLYICENHFQRLSKTSMFTGLKAVNHFGPRDMSFSLKFVQKKHSYVSK	1475
Sc1	TQFFHKFDLRTTMLYICENHFQRLSKTSMFTGLKAVNHFGPRDMSFSLKFVQKKHSYVSK	1476
Sc2	TQFFHKFDLRTTMLYICENHFQRLSKTSMFTGLKAVNHFGPRDMSFSLKFVQKKHSYVSK *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	1472
Aed	IGVFSCGPRPLTKSVMSACDEVNKGKLPYFIHFFENFG	1508
Dm	IGVFSCGPRPLTKSVMSACDEVNKGKLPYFIHFFENFG	1537
Md	IGVFSCGPRPLTKSVMSACDEVNKGKLPYFIHFFENFG	1514
Sc1	IGVFSCGPRPLTKSVMSACDEVNKGKLPYFIHFFENFG	1515
Sc2	IGVFSCGPRPLTKSVMSACDEVNKGKLPYFIHFFENFG *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	1511