



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

***Stomoxys calcitrans*: ESTABELECIMENTO DE COLÔNIA,
CARACTERIZAÇÃO DA GLÂNDULA SALIVAR E
INTERAÇÃO COM PATÓGENOS**

MELISSA CRISTINA MORAES FLORENCIO

Sob a Orientação de
Patrícia Fampa Negreiros Lima

Tese submetida como
requisito parcial para
obtenção do título de
Doutora em Ciências, no
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da
UFRRJ

Seropédica

Março de 2020

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

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

F633s Florencio, Melissa Cristina Moraes, 1991-
Stomoxys calcitrans: Estabelecimento de colônia,
caracterização da glândula salivar e interação com
patógenos / Melissa Cristina Moraes Florencio. -
Seropédica, 2020.
76 f.

Orientadora: Patrícia Fampa Negreiros Lima.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2020.

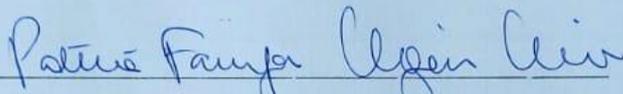
1. Parasitologia. 2. Entomologia. 3. Morfologia.
I. Lima, Patrícia Fampa Negreiros, 1976-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Ciências Veterinárias III. Título.

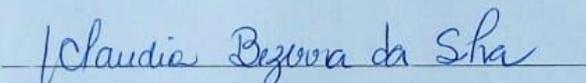
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

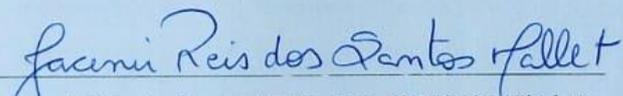
MELISSA CRISTINA MORAES FLORENCIO

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

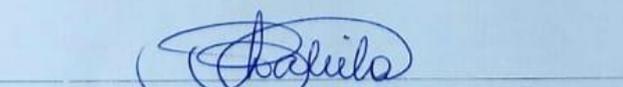
TESE APROVADA EM: 12/03/2020


Patrícia Fampa Negreiros Lima, Dra, UFRRJ (Orientadora)


Claudia Bezerra da Silva, Dra, UFRRJ (Titular)


Jacenir Reis dos Santos Mallet, Dra, FIOCRUZ (Titular)


Leilane Maria Barcellos Nepumoceno, Dra, UFRRJ (Titular)


Lilian Cristina de Sousa Oliveira Batista Cirne, Dra, CESV/FAA (Titular)

Willy Jablonka

Willy Jablonka, Dr. UFRJ (Suplente)

Yara Peluso Cid, Dra. UFRRJ (Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Alexandre e Valéria, que ao longo desses anos me apoiaram e se dedicaram ao máximo para que eu pudesse ter as melhores oportunidades. Amo vocês, muito obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Esse trabalho não seria possível sem a colaboração de muitas pessoas que direta ou indiretamente cooperaram para que o dia de hoje fosse possível.

Agradeço à Professora Dra Vânia Bittencourt pela disponibilidade de uso de seus animais para coleta das moscas e ao funcionário da Estação Zeca que sempre esteve disponível para nos ajudar com os animais e auxiliar no que fosse preciso. Com muito carinho e respeito agradeço aos animais Abacaxi, Caramelo, McGiwer e Xororó, o contato com vocês ao longo desses anos foi muito agradável e gratificante.

Ao Professor Dr Avelino Bittencourt por todo o suporte para o desenvolvimento inicial de nossa colônia, assim como todos os seus alunos.

À Professora Dra Aparecida Alves do Nascimento, à Dra Raquel do Nascimento de Souza e ao técnico Fernando por toda ajuda no processamento histológico das glândulas salivares.

À Professora Dra Geórgia Atella, bem como sua equipe Dr Willy Jablonka, Msc Stephanie Serafim, Karoline Lima e Mileane com todas as etapas da análise lipídica da glândula salivar.

À Professora Dra Maria Cristina Motta Miranda e a técnica Soraia que nos auxiliaram com a microscopia eletrônica.

À toda equipe do Laboratório de Imunologia e Virologia que ao longos dos últimos oito anos oferecem grande apoio para nosso laboratório aqui na Rural, especialmente à Professora Dra Lucia Helena Pinto da Silva.

Ao Dr Philippe Bulet, por ter nos cedido o peptídeo recombinante stomoxina para teste.

À professora Dra Karina Annes Keunecke por ter cedido o espaço onde a nossa colônia de *Stomoxys calcitrans* se encontra atualmente.

À Dra Letícia Vidal, pela disponibilidade e auxílio com o uso do microscópio Olympus BX53 no laboratório multiusuário.

Ao Professor Dr Bruno Berto, vizinho de laboratório, que diversas vezes nos auxiliou.

Agradeço a todos os membros da banca, pela dedicação e disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

À minha orientadora Professora Dra Patrícia Fampa, é difícil ter palavras para agradecer pelos últimos oito anos da minha vida. Nos conhecemos pelo acaso e hoje você se tornou uma das pessoas mais importantes da minha vida, obrigada por todo o carinho e afeto nessa jornada.

Esse trabalho realmente não seria possível sem a equipe do Laboratório de Parasitos e Vetores agradeço imensamente Karina Riguet, Gabriel Araújo, Karine Vieira e

especialmente Dayana Palmeira, deixamos de ser colegas de graduação para nos tornar amigas para a vida, obrigada por tudo.

Agradeço aos meus amigos que estiveram juntos e sempre vibraram com minhas conquistas. Me considero sortuda em ter muitos deles, por esse motivo não citarei nomes aqui, amo vocês.

Ao meu namorado Pedro Filippini que me faz sentir a pessoa mais inteligente do mundo, que se orgulha e apoia minhas escolhas, obrigada por tudo. À família do meu namorado, minha sogra, cunhados e sobrinhos agradeço o apoio, preocupação e carinho comigo em todos os momentos.

Aos meus tios, primos e avó que sempre estiveram presentes ao longo desse processo demonstrando apoio e amor.

Ao meu irmão Maruan, minha cunhada Renata e meu sobrinho Miguel, agradeço a companhia e as conversas divertidas sobre absolutamente qualquer coisa que não fosse esse trabalho.

Aos meus pais Valéria e Alexandre por todo amor, compreensão e generosidade.

RESUMO

FLORENCIO, Melissa Cristina Moraes. *Stomoxys calcitrans*: **estabelecimento de colônia, caracterização da glândula salivar e interação com patógenos**. 2020. 65p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Stomoxys calcitrans, conhecida como mosca-dos-estábulo é um díptero de grande importância médico veterinária. Machos e fêmeas se alimentam de sangue, hábito parasita que tem como consequência prejuízos nos ambientes de animais de criação. Os desdobramentos da alimentação sanguínea incluem o estresse da picada, que leva a menor ganho de peso e produção de leite, e à infecção por patógenos que *S. calcitrans* transmite mecanicamente. Os prejuízos anuais causados pela mosca-dos-estábulo no Brasil são estimados em 340 milhões de dólares. Considerando a importância desse organismo e os prejuízos acarretados por ele nos ambientes de criação é cada vez mais importante entender diversos aspectos da biologia de *S. calcitrans*. No presente trabalho são apresentados diferentes assuntos relacionados a esse inseto. O capítulo I se dedica a descrever o estabelecimento de uma colônia de *S. calcitrans*, com o objetivo de gerar insetos em condições de laboratório que pudessem ser utilizados para experimentos controlados. O capítulo II descreve a morfologia das glândulas salivares da mosca a partir de técnicas de microscopia óptica, histologia e ultraestrutura, e também a composição lipídica. Além disso, foi realizado teste da atividade de stomoxina, um peptídeo antimicrobiano da saliva de *S. calcitrans* contra *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. No capítulo III buscamos entender como *S. calcitrans* interage com patógenos. Esse é um passo importante para esclarecer a dinâmica de transmissão por essa mosca, sendo assim o modelo escolhido foi *Leishmania* agente etiológico das leishmanioses, doenças com característica antropozoonótica. *Leishmania sp.* foi capaz de interagir com o intestino de *S. calcitrans*, mas os mecanismos pelo qual essa ligação ocorre ainda devem ser esclarecidos.

Palavras-chaves: Colônias de inseto, saliva, vetor mecânico.

ABSTRACT

FLORENCIO, Melissa Cristina Moraes. *Stomoxys calcitrans*: **colony establishment, salivary gland characterization and interaction with pathogens**. 2020. 65p. Thesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2020.

Stomoxys calcitrans (Diptera), known as stable fly presents great veterinary importance. Males and females feed on blood, a parasitic habit that results in damage to livestock. The consequences of blood feeding include bite stress, which leads to lower weight gain and milk production, and infection with pathogens that *S. calcitrans* mechanically transmits. The annual economic damage caused by the stable fly in Brazil is estimated at US \$ 340 million. Considering the importance of this organism and the damage caused by it in the breeding environments, it is increasingly important to understand different aspects of the biology of *S. calcitrans*. In the present work, different subjects related to this insect are presented. Chapter I describes the establishment of a colony of *S. calcitrans*, with the objective of generating insects under laboratory conditions that could be used for controlled experiments. Chapter II describes the fly's salivary glands morphology using optical microscopy, histology, ultrastructure and also lipid composition. In addition the activity of stomoxin, an antimicrobial peptide from *S. calcitrans* saliva against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. In chapter III we seek to understand how *S. calcitrans* interacts with pathogens. This is an important step to clarify the dynamics of transmission by this fly, so the model of choice was *Leishmania* etiologic agent of leishmaniasis, diseases with anthroponozoonotic characteristics. *Leishmania* sp. was able to interact with the intestine of *S. calcitrans*, but the mechanisms by which this interaction occurs remain yet to be clarified.

Keywords: Insect colonies, saliva, mechanical vector.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I Estabelecimento de colônia de <i>Stomoxys calcitrans</i>	3
RESUMO CAPÍTULO I	4
ABSTRACT CAPÍTULO I	5
1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 <i>Stomoxys calcitrans</i>	6
2.2 <i>Stomoxys calcitrans</i> e prejuízos econômicos	7
2.3 <i>S. calcitrans</i> como vetor mecânico	8
2.4 Colônias de insetos	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Coleta das moscas	10
3.2 Triagem e identificação	10
3.3 Gaiolas	11
3.4 Alimentação	11
3.5 Coleta de ovos	11
3.6 Dieta	12
3.7 Larvas	12
3.8 Pupas	13
3.9 Moscas adultas	13
2.10 Avaliação dos fatores abióticos	13
3.11 Estatística	14
4 RESULTADOS	15
4.1 Variação dos fatores abióticos na colônia de <i>S. calcitrans</i>	15
4.2 Produção da colônia	16
5 DISCUSSÃO	20

CAPÍTULO II Caracterização das glândulas salivares de <i>S. calcitrans</i>	23
RESUMO CAPÍTULO II	24
ABSTRACT CAPÍTULO II	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Hematofagia	26
2.2 Glândula salivar	27
2.3 Glândula salivar e saliva de <i>S. calcitrans</i>	28
2.4 Composição lipídica	29
2.5 Peptídeos antimicrobianos de insetos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Insetos e dissecação	31
3.2 Microscopia óptica	31
3.3 Histologia	31
3.4 Análise ultraestrutural	31
3.5 Composição lipídica	31
3.5 Peptídeo antimicrobiano stomoxina	32
3.6 Parasitos	32
3.7 Tratamentos dos parasitos com stomoxina	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Microscopia óptica	33
4.2 Histologia da glândula salivar de <i>S. calcitrans</i>	34
4.3 Análise ultraestrutural da glândula salivar de <i>S. calcitrans</i>	36
4.4 Composição lípica da glândula salivar de <i>S. calcitrans</i>	37
4.5 Efeito do peptídeo antimicrobiano stomoxina sobre parasitos de importância médico veterinário	38
5 DISCUSSÃO	39
CAPÍTULO III INTERAÇÃO ENTRE <i>S. calcitrans</i> E <i>Leishmania sp.</i>	41
RESUMO CAPÍTULO III	42
ABSTRACT CAPÍTULO III	43
1 INTRODUÇÃO	44

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	44
2.1 Transmissão de patógenos	44
2.2 <i>Leishmania sp</i> e leishmanioses	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Parasitos	47
3.2 Insetos	47
3.3 Ensaio <i>in vitro</i>	47
3.4 Ensaio <i>in vivo</i>	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Interação <i>in vitro</i> de <i>S. calcitrans</i> com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum chagasi</i>	48
4.2. Interação <i>in vivo</i> de <i>S. calcitrans</i> e <i>L. infantum chagasi</i>	49
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES GERAIS	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

Stomoxys calcitrans, conhecida como mosca-dos-estábulo é um díptero de grande importância médico veterinária. Hematófaga, essa mosca tem sua preferência alimentar em equinos seguida por bovinos, podendo se alimentar também de cães, outros animais de criação e na falta de seus hospedeiros preferenciais, se alimenta até de humanos (GUIMARÃES, 1984). Ambos, machos e fêmeas se alimentam de sangue, o que leva a consideráveis prejuízos em ambientes de criação. Os desdobramentos dessa alimentação passam pelo estresse da picada, que leva a menor ganho de peso e produção de leite, pela perda de sangue do animal, que em infestações intensas pode ser considerável, até a infecção por patógenos que *S. calcitrans* possa transmitir mecanicamente (BALDACCHINO et al., 2013).

Os prejuízos anuais causados por *S. calcitrans* no Brasil são estimados em 340 milhões de dólares. Dados de 2017 mostram que a agropecuária é responsável diretamente por 5,7% e indiretamente chega a 24% do PIB no Brasil (IBGE, 2017). A estimativa para o ano de 2019 é que a agropecuária tenha um faturamento de 564,32 bilhões de reais total, 78,5 bilhões gerados diretamente pela pecuária bovina (CGEA/DCEE/SPA/MAPA, 2019). Nos últimos anos a agropecuária foi o setor que mais cresceu economicamente no país (SERIGATI, 2013). Levando em consideração a importância da agropecuária na economia nacional, é de extrema importância a busca por soluções de problemas existentes nesse cenário.

O primeiro passo para o estudo de organismos de interesse é o acesso aos mesmos. Dessa forma a manutenção desses organismos em condições de laboratório é um passo crucial no estabelecimento de uma linha de pesquisa com o organismo em questão. Colônias de insetos em laboratório são importantes para diversos estudos que vão desde o comportamento até estratégias de controle dos mesmos. Refinar e otimizar colônias de insetos sob condições de laboratório é uma constante. Já foram descritas formas de criar *S. calcitrans* em colônias em laboratório (DOTY, 1937; CHRISTMAS, 1970; BAILEY et al., 1975; SALEM et al., 2012) porém a busca por números maiores de mosca nascidas em laboratório, em condições mais controladas é crucial para o desenvolvimento de trabalhos com esses organismos.

Como descrito anteriormente um dos danos diretos causados por *S. calcitrans* em ambientes de criação é a picada dolorida que esse inseto apresenta, no momento da alimentação sanguínea. Um dos danos indiretos é a transmissão de patógenos de forma mecânica também no momento da alimentação sanguínea. Pouco se sabe sobre essa dinâmica de transmissão. Um dos principais órgãos relacionados com a hematofagia são as glândulas salivares. Moléculas presentes na saliva podem modular o sistema imune, levando à produção de citocinas anti-inflamatórias, inibindo ação de células do sistema imune o que pode favorecer o estabelecimento de uma infecção (RIBEIRO, 1995; LEHANE, 2005).

Em algumas transmissões como em *Glossina* sp. e *Trypanosoma brucei*, *Anopheles* sp. e *Plasmodium* sp. as glândulas salivares são infectadas pelo patógeno que é transmitido no momento do repasto sanguíneo (AKSOY et al., 2003). Em *S. calcitrans* a infecção da glândula salivar nunca foi caracterizada, porém caracterizar a estrutura desse órgão é uma informação importante no entendimento da dinâmica de transmissão de patógenos.

Entender como esse organismo se relaciona com alguns patógenos é necessário para esclarecer possíveis formas de transmissão e tentar bloqueá-las. Dentre os diversos

patógenos relatados transmitidos por *S. calcitrans* o gênero *Leishmania* é de interesse por ser uma antroponose que afeta humanos e cães, organismos que podem ser parasitados por essa mosca (BERBERIAN, 1938). Assim nos próximos três capítulos trabalhamos com questões distintas da mosca-dos-estábulos (I) o estabelecimento de uma colônia de *S. calcitrans*, da qual se torne possível obter um número considerável de insetos para realizar experimentos e (II) a descrição morfológica, histológica e ultraestrutural da glândula salivar de *S. calcitrans*, assim como o efeito de um peptídeo antimicrobiano presente na saliva dessa mosca sobre protozoários de importância médica veterinária (III) a interação desse organismo com tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*.

CAPÍTULO I

ESTABELECIMENTO DA COLÔNIA DE *Stomoxys calcitrans*

RESUMO

FLORENCIO, Melissa Cristina Moraes. **Estabelecimento de colônia de *Stomoxys calcitrans***. 2020. 24p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Colônias funcionais de insetos são essenciais para o estudo de sua biologia, evolução, comportamento e controle. Além do estabelecimento, o aprimoramento na manutenção de uma colônia é importante, pois pode levar a maior produção de insetos. Existem trabalhos anteriores que descrevem o estabelecimento e a manutenção de colônias de *Stomoxys calcitrans*, porém a descrição dos métodos não era acompanhada de resultados satisfatórios na capacidade de produção das moscas. Com o objetivo de gerar moscas em condições de laboratório se iniciou o estabelecimento da colônia de *S. calcitrans* do Laboratório de Parasitos e Vetores. Adultos coletados no campo foram mantidos em laboratório com alimentação diária em sangue bovino com anticoagulante oferecido em absorventes higiênicos descartáveis. As formas imaturas foram mantidas em dietas ricas em matéria orgânica. A temperatura e umidade relativa da colônia foram acompanhadas diariamente, bem como o desenvolvimento dos insetos. Os parâmetros mensurados foram o desenvolvimento de ovos em pupas e de pupas em adultos F1, além da comparação entre o número de moscas coletadas em campo e o número de moscas F1 eclodidas em laboratório. Os dados aqui apresentados refletem os meses de março a novembro de 2019. Nesse período as médias por mês foram de 604,2 moscas coletadas em campo, 2694,3 ovos recolhidos das gaiolas, 349,5 pupas e 205,9 moscas F1 geradas em laboratório. Algumas metodologias utilizadas na colônia devem ser reavaliadas e modificadas na busca por maior número de moscas geradas em laboratório.

Palavras-chaves: Colônia de insetos, mosca-dos-estábulos, desenvolvimento.

ABSTRACT

FLORENCIO, Melissa Cristina Moraes. **Colony establishment of *Stomoxys calcitrans* 2020.** 24p. Thesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Functional insect colonies are essential for the study of their biology, evolution, behavior and control. In addition to the establishment, the improvement in the maintenance of a colony is important, as it can lead to greater production of insects. There are previous works that describe the establishment and maintenance of colonies of *Stomoxys calcitrans*, however the description of the methods was not accompanied by satisfactory results in the capacity of production of the flies. In order to generate flies under laboratory conditions, a colony of *S. calcitrans* at the Laboratory of Parasites and Vectors was established. Adults collected in the field were kept in the laboratory with daily feeding in bovine blood with anticoagulant offered in disposable sanitary napkins. Immature forms were maintained on diets rich in organic matter. The colony temperature and relative humidity were daily monitored, as well as the development of insects. The parameters measured were the development of pupae eggs and pupae in F1 adults, in addition to the comparison between the number of flies collected in the field and the number of F1 flies hatched in the laboratory. The data presented here reflect the months from March to November 2019. In that period the averages per month were 604.2 flies collected in the field, 2694.3 eggs collected from the cages, 349.5 pupae and 205.9 F1 flies generated in laboratory. Some methodologies used in the colony must be reevaluated and modified whit the goal of obtaining higher numbers of flies generated in the laboratory.

Keywords: Insect colony, stable fly, development.

1 INTRODUÇÃO

Única espécie do gênero a ocorrer nas Américas, *Stomoxys calcitrans*, é um díptero conhecido como mosca-dos-estábulo. Hematófago, esse organismo se alimenta de vertebrados mamíferos, principalmente equinos e bovinos em ambientes de criação. A alimentação sanguínea nesse ambiente tem muitas consequências, pois sua picada dolorida leva os animais ao estresse diminuindo a produção de leite e o ganho de peso dos mesmos. Os prejuízos causados por essa mosca ainda são potencializados pelo papel que *S. calcitrans* têm como vetor mecânico de diversos patógenos de interesse médico veterinário.

Dada a sua importância para a medicina veterinária, o fato de pouco se conhecer sobre as dinâmicas de transmissão dessa mosca e o fato de não haver ainda um método de controle efetivo para esse inseto, aprofundar os estudos sobre *S. calcitrans* é muito importante. Um passo inicial para se conhecer melhor um organismo é a partir do desenvolvimento de colônias desse modelo, obtendo assim organismos em condições controladas para a realização de estudos mais confiáveis.

Parte do objetivo deste trabalho foi a instalação e desenvolvimento de uma colônia de *S. calcitrans*. A colônia foi iniciada com as informações disponíveis na literatura, seguidas de adaptações, e observada diariamente para que seu desenvolvimento e produção fossem acompanhados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Stomoxys calcitrans*

Stomoxys calcitrans (Figura 1) são artrópodes da família Muscidae, subfamília Muscinae, tribo Muscini Stomoxyini (DA SILVA, 2018). Os membros dessa subfamília apresentam como característica as veias M_{1+2} das asas suavemente curvadas (DE CARVALHO, MOURA; RIBEIRO, 2002). É a única espécie do gênero *Stomoxys* que ocorre no continente americano (BRITO et al., 2008). Os adultos de *S. calcitrans* medem aproximadamente 6 milímetros, apresentam coloração acinzentada, quatro listras longitudinais na posição dorsal do tórax, abdome encurtado com manchas escuras no segundo e terceiro segmentos abdominais (MORAES, 2007). Possuem probóscide rígida e alongada cranialmente localizada, visível pelo dorso e os palpos encurtados (MARCONDES, 2001). A sexagem entre os adultos se dá pelo posicionamento dos olhos, onde machos possuem olhos holópticos e fêmeas olhos dicópticos (BRITO et al., 2008).



Figura 1: *Stomoxys calcitrans*

Fonte: https://www.3tres3.com.pt/artigos/psa-as-moscas-podem-transmitir-o-virus-aos-porc0s_11803/

Machos e fêmeas são hematófagos, se alimentando até quatro vezes ao dia em períodos mais quentes do ano, porém em períodos frios podem interromper a alimentação sanguínea passando então a se alimentar somente de néctar e seiva de plantas (JONES et al., 1992; BOWMAN, 2006; BRITO et al., 2008).

As fêmeas podem colocar até 400 ovos ao longo da vida, em posturas distintas. Os ovos de *S. calcitrans* são alongados e apresentam um sulco longitudinal. 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 (GUIMARÃES, 1894; MORAES, 2007; BRITO et al., 2008). As larvas apresentam estágio de primeiro (L1), segundo (L2) e terceiro (L3) instar e são identificadas pela presença da abertura de espiráculos respiratórios pequenos e afastados formando um “S” na porção posterior. A duração do ciclo na natureza (figura 2) é diretamente influenciada pela temperatura do ambiente, em condições favoráveis, na faixa dos 30°C, a duração do ciclo do ovo até o adulto é em média de 30 dias.

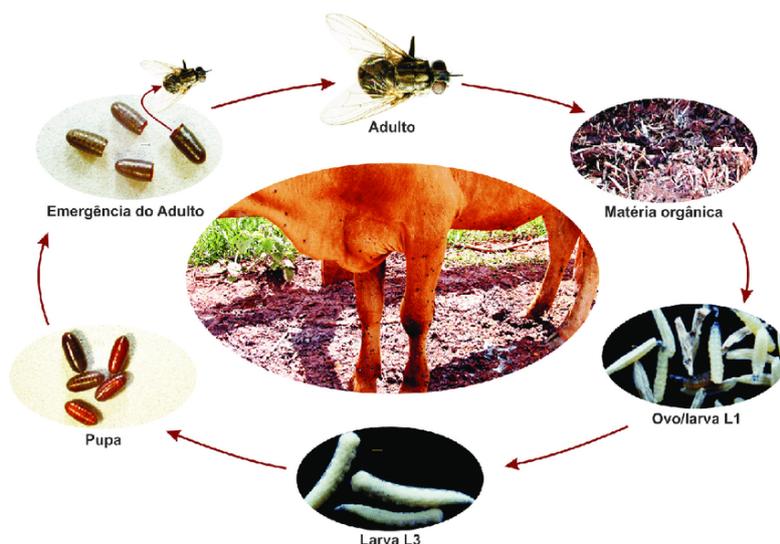


Figura 2: Ciclo de vida *Stomoxys calcitrans*

Fonte: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Ciclo-biologico-da-mosca-dos-estabulos-Stomoxys-calcitrans-L-Diptera>

Na natureza a mosca dos estábulos é parasitada por outros artrópodes sendo considerado de maior importância ácaros do gênero *Macrocheles*, que além de parasitar as moscas adultas, predam ovos, larvas e pupas (KINN, 1966). Além de *Macrocheles*, são reconhecidos como predadores de *S. calcitrans* coleópteros das famílias Staphylinidae, Hydrophilidae, Carabidae e Histeridae (SMITH et al., 1989).

2.2 *Stomoxys calcitrans* e prejuízos econômicos

A mosca-dos-estábulo, *S. calcitrans* é uma grande praga na criação de gado e cavalos. Os prejuízos causados por essa mosca são difíceis de serem estimados, já que podem estar relacionados com diferentes efeitos do seu parasitismo. A sua picada

dolorida e seu comportamento alimentar agressivo e persistente levam os animais a uma situação de estresse extremo (ZUMPT, 1973). 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).

A presença de *S. calcitrans* no ambiente afeta os animais de diversas formas levando a um comportamento defensivo, na intenção de espantar as moscas (MULLENS, 2006). 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 (CAMPBELL, 1993). A ausência de componentes anestésicos na saliva de *S. calcitrans* causa muito desconforto (CORTINAS, 2006), suas picadas podem levar ao desenvolvimento de dermatites necróticas (YERUHAM, 1995). Com preferência de picar os membros dos animais, a presença dessa mosca gera um comportamento de chutes e pisoteio por parte dos animais parasitados, o que pode levar a lesões nos mesmos (CORTINAS, 2006).

Um estudo publicado nos Estados Unidos atribuiu um impacto econômico anual no valor de 2,2 bilhões de dólares relacionados com a presença da mosca-dos-estábulo até o presente momento (TAYLOR, 2012). No Brasil o impacto econômico anual relacionado com *S. calcitrans* é estimado em 340 milhões de dólares (GRISSI, 2014).

2.3 *S. calcitrans* como vetor mecânico

Além dos prejuízos diretos causados pela presença desses organismos nos ambientes de produção, há os prejuízos indiretos, mais difíceis de mensurar, que muitas vezes estão relacionados com a capacidade vetorial dessa mosca.

Stomoxys calcitrans pode atuar como vetor mecânico de inúmeros patógenos. Em uma revisão publicada em 2013 são listados diversos vírus, bactérias, protozoários e helmintos transmitidos pela mosca-dos-estábulo. (BALDACCHINO, et al., 2013). Entre os principais patógenos é possível destacar vírus da anemia infecciosa equina (HAWKINS et al., 1973; FOIL et al., 1983; GREEN et al., 1996), vírus da febre do Nilo (DOYLE et al., 2011), *Bacillus anthracis* (TURREL; KNUDSON, 1987), *Anaplasma marginale* (SCOLES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011), *Trypanosoma vivax* (MIHOK et al., 1995; CUGLOVICI et al., 2010), *Leishmania tropica* (BERBERIAN, 1938), *Habronema microstoma* (TRAVERSA et al., 2008) entre outros. Recentemente foi demonstrado, pela primeira vez no Brasil, exemplares de *S. calcitrans* coletados no campus da UFRRJ contendo material genético de *A. marginale*, um dado muito relevante, sugerindo que a mosca pode atuar na dinâmica de transmissão dessa bactéria (ARAÚJO, 2019).

A capacidade vetorial dessa mosca é dada tanto por seu hábito alimentar, já que na natureza a mosca busca se alimentar de sangue até quatro vezes por dia, como a sua capacidade de dispersão que pode chegar a 500 metros por dia, normalmente em busca de alimento (BAILEY et al., 1973).

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).

2.4 Colônias de insetos

Colônias de insetos, mantidas em laboratório são de extrema importância para diversos estudos, como avaliação do potencial vetorial, ciclo de vida, dinâmica de transmissão, fisiologia e comportamento desses insetos, além de serem essenciais no desenvolvimento de estratégias de controle (CHELBI; ZHIOUA, 2019).

O estabelecimento de colônias de inseto bem estruturadas é um passo crucial para o melhor entendimento desses organismos. Nessa busca muitos grupos vêm estudando o estabelecimento de colônias em laboratórios (MONTEZANO et al., 2019; CHELBI & ZHIOUA, 2019; CANNET et al., 2015; SALLEN et al., 2012).

A pesquisa por formas mais eficientes de manter colônias de insetos em laboratório é uma constante, envolve adaptações por uma forma eficiente de alimentação artificial, dietas para estágios imaturos, condições abióticas mais favoráveis, impedimento de contaminação por outros organismos estão sempre se renovando.

Já foram descritas algumas formas de manter *S. calcitrans* sob condições de laboratório (DOTY, 1937; ASHRAFI, 1965; CHRISTMAS, 1970; BAILEY et al., 1975; BRITO et al., 2008; SALEM et al., 2012). Porém nem sempre é possível reproduzir as mesmas condições previamente descritas, seja por questões de infraestrutura ou porque os organismos não respondem da mesma forma previamente descrita.

Moraes (2007) descreveu o estabelecimento de colônia de *S. calcitrans* na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro baseado em trabalhos previamente publicados. Apesar de ser um trabalho muito completo em relação à descrição de todas as etapas da manutenção desses insetos em laboratório não foi explorada a eficiência desses métodos nessa colônia. De modo geral, os trabalhos anteriores são muito informativos em relação ao tipo de material a se utilizar, como modelos de gaiolas ou dietas utilizadas para os estágios imaturos, mas não se aprofundam muito sobre a quantidade de moscas geradas sob esses métodos. Salem e colaboradores (2012) foram os primeiros a descrever essa eficiência, não só dos estágios do ciclo de vida, como a duração do ciclo e a longevidade das moscas em condição de laboratório.

A expectativa é que uma colônia de insetos além de oferecer as melhores condições possíveis para o desenvolvimento de seu organismo modelo, gere o maior número possível de insetos, em seus diversos estágios de vida que possam ser utilizados para pesquisa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das moscas

As moscas foram coletadas no *campus* da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (E.E.P.P.W.O.N.) (figura 3). Com a ajuda de um funcionário da estação, os bovinos foram amarrados e as moscas localizadas nas patas dianteiras e traseiras dos animais foram coletadas com auxílio de um puçá de fabricação própria, constituído de tubo de PVC, arame e tecido de malha fina. No mesmo local da coleta as moscas eram transferidas para uma gaiola de campo. Os dados apresentados no presente trabalho refletem coletas realizadas ao menos três vezes por semana, de março a novembro de 2019.



Figura 3: Coleta de moscas no campus da UFRRJ

3.2 Triagem e identificação

Após a coleta no campo as moscas foram transportadas para o Laboratório de Parasitos e Vetores no anexo II no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFRRJ, onde está localizada a colônia do laboratório. Nesse local as moscas foram anestesiadas a -20°C por aproximadamente 5 minutos e distribuídas em tubos Falcon mantidos em banho maria de gelo. As moscas foram então observadas individualmente em microscópio estereoscópico binocular onde foram identificadas com auxílio da “Chave para adultos de díptero (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil” (DE CARVALHO, MOURA & RIBEIRO, 2002). Moscas de outras espécies ou parasitadas com ácaros foram descartadas (figura 4).



Figura 4: Mosca do campo parasitada com ácaros

3.3 Gaiolas

Após a triagem moscas coletadas no campo foram mantidas em gaiolas (25 x 30 x 22cm) fechadas com tecido de malha fina e vedadas com fita adesiva para diminuir a entrada de outros insetos oportunistas (figura 5). Foram colocadas, no máximo, 500 moscas por gaiola.



Figura 5: Gaiola das moscas com sangue oferecido e pano preto para postura dos ovos

3.4 Alimentação

As moscas foram alimentadas diariamente com sangue bovino contendo anticoagulante (heparina) recolhido em abatedouro localizado em Piraí, RJ. O sangue, mantido congelado, era aquecido em banho maria até aproximadamente 40°C e oferecido para as moscas em absorventes higiênicos descartáveis de algodão. Os absorventes contendo o sangue eram mantidos na parte superior da gaiola, com a superfície contendo sangue exposta para a abertura da gaiola, sendo trocados diariamente.

3.5 Coleta de ovos

Os ovos de *S. calcitrans* foram recolhidos diariamente das gaiolas. Um tecido preto umedecido com água foi colocado na parte superior da gaiola, próximo ao absorvente higiênico contendo sangue (figura 6). Além dos ovos recolhidos desse tecido preto foram recolhidos também ovos colocados nos absorventes contendo sangue e na parte inferior da gaiola, forrada com papel sulfite. Os ovos foram lavados com água em peneira granulométrica (0,8 mm) para retirar resquícios de sangue, contados a olho nu e posteriormente passados para um pote contendo dieta para o desenvolvimento das larvas e mantidos em temperatura ambiente dentro da colônia ou em estufa a 34°C.



Figura 6: Ovos no tecido preto e peneira utilizada para recolher os ovos

3.6 Dieta

A dieta utilizada para manutenção e desenvolvimento das formas imaturas foi realizada a partir da dieta descrita por Christma, 1970 com modificações. Para cada dieta foram utilizados 330g de cana de açúcar triturada, 125g de farelo de trigo, 40g de farinha de carne, 5g de bicarbonato de sódio e 125ml de água destilada (figura 7). Depois de misturados os componentes, a dieta foi mantida em um recipiente não vedado em temperatura ambiente por três dias para fermentar (figura 8). Após esse período a mesma foi mantida em geladeira e utilizada diariamente para o recolhimento dos ovos. Foi utilizado nistatina (Teuto 100.000UI/mL), sempre que necessário para conter a proliferação de fungos na dieta.



Figura 7: Componentes da dieta, em ordem farelo de trigo, farinha de carne, cana, bicarbonato de sódio e água destilada



Figura 8: Dietas, na esquerda antes da fermentação, na direita após fermentação

3.7 Larvas

O desenvolvimento das larvas nas dietas foi acompanhado diariamente por observação das dietas contendo ovos recolhidos em dias anteriores. Dessa forma foi possível

acompanhar quantos dias eram necessários para que as dietas começassem a apresentar larvas e se o número de larvas era compatível com o número de ovos previamente recolhidos. Nos meses de julho e agosto as dietas com ovos e larvas foram mantidas em estufa BOD a 34°C, nos demais meses foram mantidas em temperatura ambiente na colônia.

3.8 Pupas

As pupas foram recolhidas diariamente das dietas, higienizadas, contadas e transferidas para um recipiente denominado pupário (recipiente de coleta de urina com tampa), onde ficavam as pupas recolhidas em cada dia, até que as moscas adultas emergissem.



Figura 9: Pupas, na esquerda pupas ainda na dieta, localizadas na borda dos potes, na direita pupas recolhidas

3.9 Moscas adultas

Diariamente as moscas F1 recém-emergidas nos pupários (figura 10) foram passadas para novas gaiolas de moscas, onde eram colocadas moscas nascidas por 3 dias seguidos. Dessa forma foi possível determinar a idade e o estado nutricional das moscas, que poderiam então ser utilizadas em experimentos.



Imagem 10: Moscas F1 passando do pupário para gaiola

3.10 Avaliação dos fatores abióticos

A temperatura e umidade relativa na colônia foram registradas diariamente com o uso de um termohigrômetro (Digoo).

3.11 Estatística

As análises estatísticas foram conduzidas no programa *GraphPad Prism*, versão 5, em testes de análise one-way ANOVA para amostras independentes. Os valores de significância foram representados nos gráficos por (*) para valores com $p < 0,05$; (**) para valores com $p < 0,01$ e (***) para valores com $p < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Variação dos fatores abióticos na colônia de *S. calcitrans*

Os fatores abióticos avaliados no estabelecimento da presente colônia foram temperatura (Figura 11) e umidade relativa (UR) (Figura 12). Em momento algum a temperatura na colônia de adultos foi artificialmente controlada com aquecedores, ou ar condicionado, sendo sempre sujeita à temperatura ambiente. A maior temperatura registrada foi de 29,6°C no mês de março e a menor temperatura registrada foi de 20,0°C no mês de julho. Quando submetidas a tratamento estatístico é possível observar que há diferença significativa em da temperatura média ao longo dos meses. A UR da colônia foi positivamente controlada em alguns momentos pontuais, quando a marcação era abaixo de 65% foram colocadas bandejas com água no ambiente da colônia para aumentar a UR no local. A maior UR registrada foi de 91% em novembro e a menor de 56% no mês de julho. Também é possível observar diferença significativa na UR ao longo dos meses.

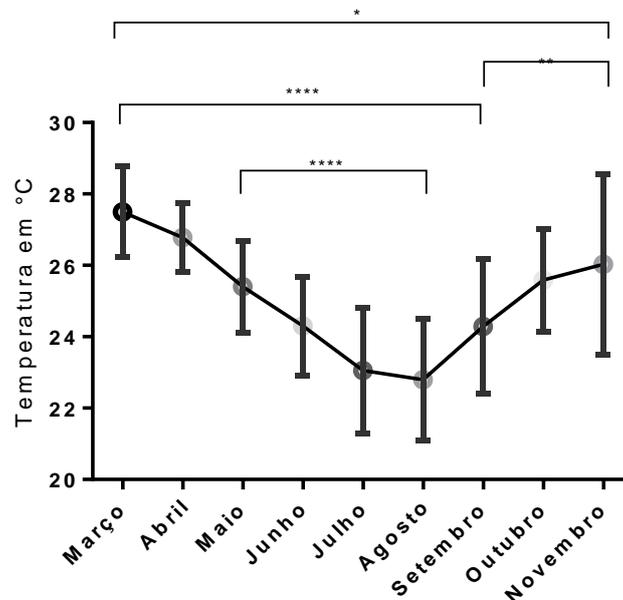


Figura 11: Variação da temperatura ao longo dos meses.
Expressão da temperatura média de cada mês.

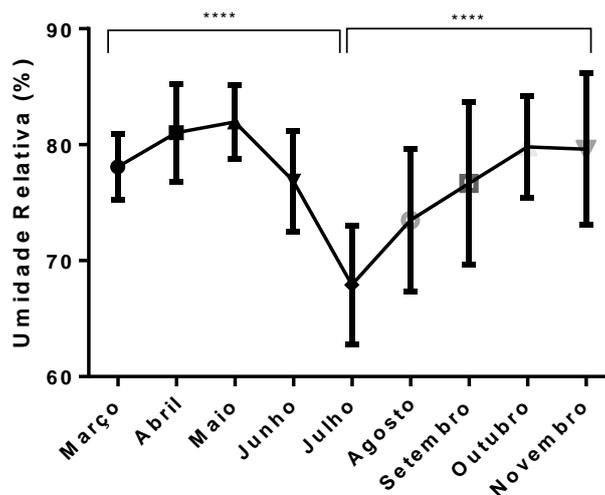


Figura 12: Variação da umidade relativa do ar ao longo dos meses.
Expressão da umidade relativa do ar média de cada mês.

4.2 Produção da colônia

A produção da colônia foi avaliada de acordo com os seguintes critérios: número de moscas selvagens coletadas e número de ovos recolhidos (Figura 13), número de ovos recolhidos e número de pupas recolhidas (Figura 14), número de pupas recolhidas e número de adultos emergidos (Figura 15) e finalmente número de moscas selvagens coletadas e número de adultos emergidos (Figura 16).

O maior número de moscas selvagens coletadas ocorreu no mês de outubro, com 1604 moscas coletadas ao longo do mês. A média de coleta geral é de 604,16 moscas selvagens por mês. O número de ovos sempre é muito grande, alcançando o maior número em abril com 5596 ovos recolhidos. A média geral é de 2694,3 ovos por mês. É importante esclarecer que o baixo número de moscas coletadas em alguns meses, como em agosto (179) e setembro (140) não se devem a falta de esforço de coleta, porém podem ser explicadas por questões externas como baixas temperaturas, períodos chuvosos, adversidades em relação aos dos animais utilizados para coleta.

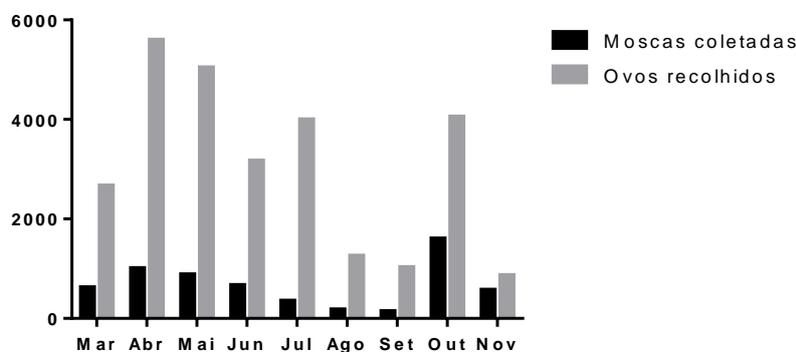


Figura 13: Relação do número de moscas selvagens coletadas e o número de ovos recolhidos em cada mês.

Como mencionado anteriormente no mês de abril ocorreu o maior número de ovos, porém o maior número de pupas ocorreu no mês de junho com 1544 pupas recolhidas. A média geral foi de 349,5 pupas por mês. Em maio, os ovos levaram de seis a onze dias para começarem a se desenvolver em pupas, passando por todos os estágios larvais. Em junho esse tempo ficou entre seis e nove dias. Em julho o tempo para o aparecimento das pupas foi de seis a oito dias. Nos meses de julho, agosto e setembro os recipientes com as dietas para desenvolvimento das larvas foram mantidos em BOD com temperatura controlada em 34°C, nos outros meses as larvas foram mantidas em temperatura ambiente dentro da colônia.

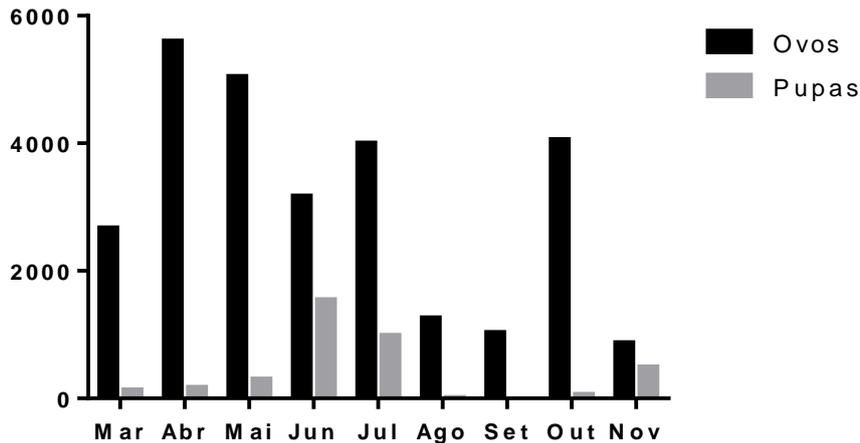


Figura 14: Relação do número de ovos recolhidos e pupas recolhidas em cada mês.

O número de adultos emergidos foi maior no mês de julho chegando ao número de 950 moscas emergidas em laboratório. As pupas de onde emergiram as moscas F1 do mês de julho foram mantidas em BOD com temperatura controlada a 34°C, assim como nos meses de agosto e setembro, que tiveram menor número de emergência de F1 na colônia. A média geral de emergência foi de 205,9 moscas por mês.

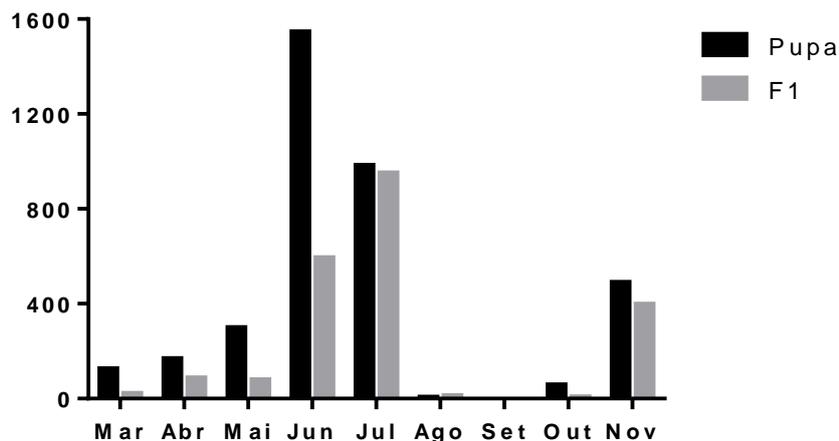


Figura 15: Relação de pupas recolhidas e moscas emergidas por mês.

O último parâmetro analisado em relação à eficiência da colônia é a relação de moscas selvagens coletadas e moscas emergidas em laboratório. Como em um primeiro momento o

laboratório foca em experimentos com moscas adultas F1, saber quanto do esforço de coleta está se refletindo em moscas F1 no laboratório é um dado muito importante. Nos meses analisados o único momento em que a proporção F1:mosca selvagem foi positiva foi no mês de julho onde para cada mosca coletada 2,7 F1 foram geradas em laboratório.

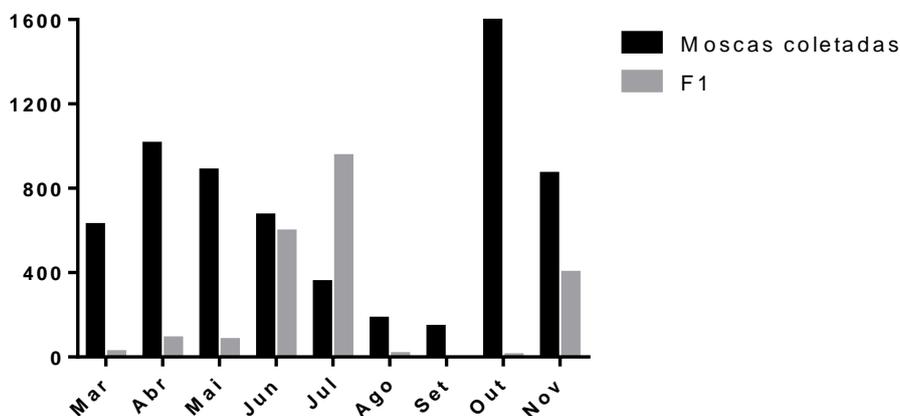


Figura 16: Relação no número de moscas selvagens coletadas no campo e moscas adultas emergidas em laboratório.

A produção por mês também foi avaliada, levando em consideração todos os parâmetros citados anteriormente (figura 17). No mês de março (A) 4,68% dos ovos foram convertidos em pupas e 16,8% das pupas foram convertidas em adultos F1. Levando em consideração o número de moscas coletadas no campo e o número de moscas emergidas em laboratório a eficiência no mês de março foi de 3,37%. Em abril (B) 2,98% dos ovos foram convertidos em pupas e 51,49% das pupas foram convertidas em adultos F1, a eficiência no mês de abril foi de 8,53%. Em maio (C) 5,91% dos ovos foram convertidos em pupas e 26,17% das pupas foram convertidas em adultos F1, a eficiência de maio foi de 8,84%. Em junho (D) 49% dos ovos foram convertidos em pupas e 38% das pupas foram convertidas em adultos F1, a eficiência da colônia em junho foi de 88,77%. No mês de julho (E) 24,5% dos ovos foram convertidos em pupas e 96,74% das pupas foram convertidas em adultos F1, em julho a eficiência da colônia foi de 269,88%. Em agosto (F) 0,39% dos ovos foram convertidos em larvas, 100% de pupas se desenvolveram em adultos F1. A relação moscas coletadas e F1 foi de 6,14%. Em setembro (G) apesar das moscas coletadas em campo não foram obtidas pupas ou moscas F1, o aproveitamento da colônia nesse mês foi de 0%. Em outubro (H) a colônia seguiu com baixa produção de moscas, com eficiência de 0,37% comparando o número de moscas coletadas no campo e F1 geradas em laboratório. Em novembro (I) a colônia recuperou a produção de moscas com eficiência de 69,1% na produção de F1 em relação a moscas coletadas no campo.

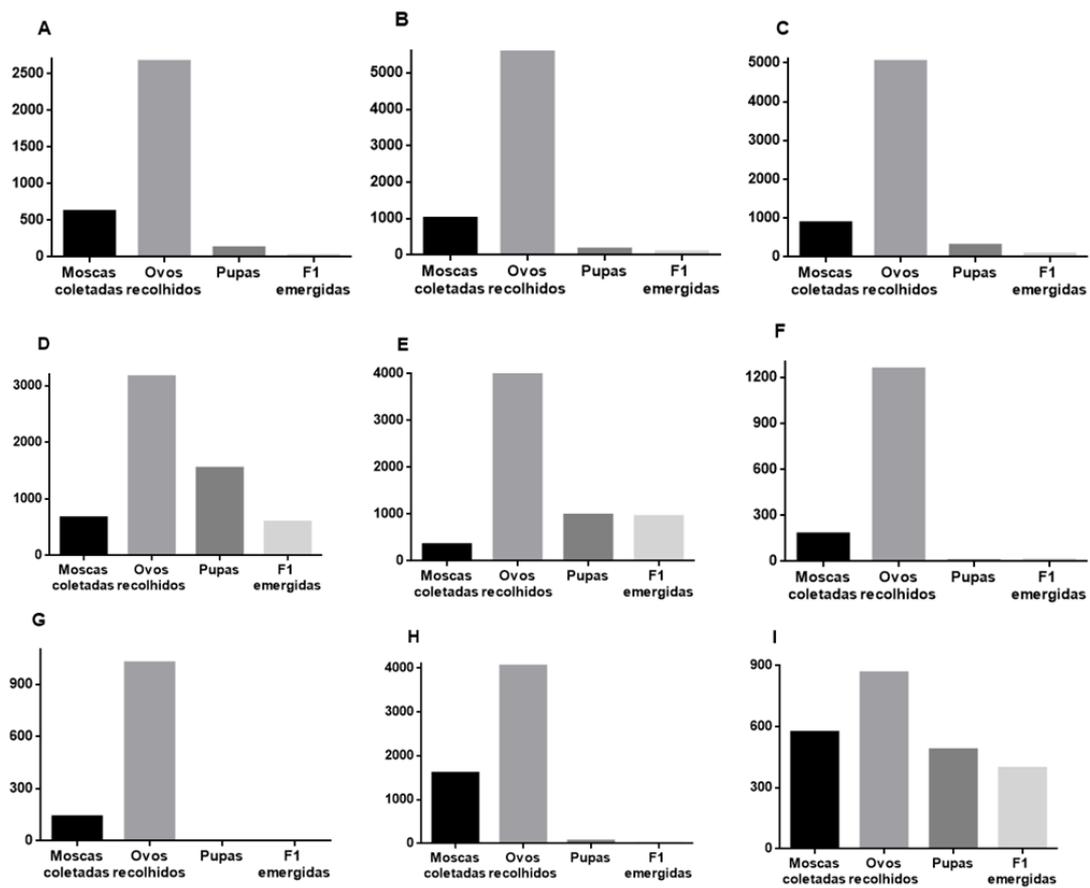


Figura 17: Produção da colônia nos meses de março (A), abril (B), maio (C), junho (D) e julho (E), demonstrando número de moscas selvagens coletadas, número de ovos recolhidos, número de pupas recolhidas e número de adultos emergidos em laboratório (F1).

5 DISCUSSÃO

Como previamente apresentado *S. calcitrans* é um organismo de grande relevância na medicina veterinária, seja pelos prejuízos gerados por essa mosca nos ambientes de criação, seja pelo papel como vetor mecânico de patógenos de importância veterinária.

Já foram publicados anteriormente metodologias de como criar *S. calcitrans* em laboratório, em contramão às detalhadas dietas e dimensões das gaiolas, apenas um trabalho explorou os dados sobre a eficiência de uma colônia de *S. calcitrans* como quantidade de adultos gerados em laboratório (SALEM et al., 2012). O trabalho em questão empregou metodologias diferentes das descritas em outros anteriores (DOTY, 1937; CHRISTMAS, 1970; BAILEY et al., 1975; BRITO et al., 2008) utilizando, por exemplo, vermiculita como base para o desenvolvimento das larvas, enquanto as outras utilizaram basicamente os mesmos substratos utilizados no presente trabalho, com poucas modificações em alguns casos.

Com a metodologia empregada na realização da atual colônia foi possível obter todos os estágios de vida desse inseto em laboratório, desde os ovos, passando pelos estágios de larvas, pupa e adultos. O objetivo do presente trabalho foi, além de estabelecer uma colônia, baseada nos métodos disponíveis na literatura, avaliar a eficiência da mesma. Ao longo do desenvolvimento dessa colônia, algumas metodologias foram adaptadas pela necessidade de torná-la mais eficiente. A colônia foi estabelecida em uma sala no anexo II do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Mesmo sem a estrutura ideal para o desenvolvimento de uma colônia, o atual trabalho se baseia não apenas em seguir métodos previamente descritos, mas em adaptações às necessidades e possibilidades.

Em um primeiro momento, referente aos meses de março, abril até meados de maio, as dietas com as formas imaturas não foram mantidas em estufa BOD com temperatura controlada. Em um primeiro momento a importância do controle de temperatura para os estágios imaturos foi muito favorável, principalmente ao se observar o número de ovos convertidos em pupas antes e após o uso da estufa, em março e abril esse número foi de 4,68% e 2,98%, respectivamente. Em maio, junho e julho, com as dietas mantidas em BOD, observamos uma conversão de 5,41%, 49% e 24,5%, respectivamente. Em nossa colônia a BOD ficou programada para uma temperatura média de 34°C o que vai contra dados de que as formas imaturas não se desenvolveriam em temperaturas acima de 30°C (HANSENS, 1951; GILLES et al., 2005). Outros trabalhos sugerem uma temperatura mais amena, por volta dos 23°C (SALEM et al., 2012), 25°C (CHRISTMAS, 1970; BRITO et al., 2008), 27°C (MORAES, 2007). Antes de serem colocadas na BOD as dietas com as formas imaturas foram mantidas no mesmo ambiente que as gaiolas de moscas adultas, em uma sala sem controle de temperatura. A média de temperatura de cada mês é expressa na Figura 1, sendo possível observar que a temperatura média ficou próxima do sugerido nos trabalhos anteriores, porém quando submetidas a tratamento estatístico fica claro que há diferença significativa entre as médias mensais, o que pode influenciar o desenvolvimento das moscas diretamente. Porém nos meses seguintes, as dietas com formas imaturas mantidas em temperatura controlada não tiveram a mesma eficiência. Por três meses (agosto, setembro e outubro) os ovos não eclodiram, conseqüentemente não obtivemos larvas, pupas ou adultos. A partir de novembro as dietas não foram mais mantidas em condição de temperatura controlada por estufa BOD e as formas imaturas voltaram a se desenvolver em temperatura ambiente.

Moraes e colaboradores (2008) destaca a fragilidade dos ovos de *S. calcitrans* em relação à manipulação, o que explicaria a baixa porcentagem de eclosão dos ovos. A

metodologia de recolhimento e manuseio dos ovos é um ponto crucial para uma maior eficiência da colônia, visto que todos os meses são coletados grande número de ovos, mas a conversão em pupas não segue o mesmo padrão.

Outro ponto importante na fase de desenvolvimento dos imaturos na colônia é a presença de ácaros do gênero *Macrocheles* além da presença de dípteros do gênero *Drosophila*, que aproveitavam as dietas para colocar os seus ovos. Nos meses iniciais da colônia, as dietas foram mantidas em potes com tecido cuja malha não impedia a passagem de *Drosophila sp.*, que além de colocar seus ovos na dieta, carregavam ácaros do gênero *Macrocheles*, predador natural das formas imaturas de *S. calicitrans*, além de parasitar as formas adultas (KINN, 1989). Não foi possível identificar o efeito direto da presença desses outros organismos durante o desenvolvimento das formas imaturas, porém ao trocar os tecidos os potes para um de menor trama que diminui a entrada de *Drosophila* nas dietas carregando ácaros, o número de conversão de ovos em pupas chegou a 49% em julho. Salem e colaboradores (2012) observaram uma grande mortalidade em sua colônia após empupamento das larvas e relacionaram esse fato com a introdução de *Macrocheles sp.* O problema com ácaros foi erradicado com o uso de Amitraz, medicamento inseticida e acaricida. Apesar de não ter sido observado aumento na mortalidade das moscas na colônia após o início do uso deste medicamento, o impacto do mesmo no ciclo de vida de *S. calicitrans* ainda deve ser avaliado (SALEM, et al., 2012).

A dieta utilizada para as formas imaturas é rica em matéria orgânica. Em um primeiro momento todos os componentes orgânicos foram autoclavados para eliminar a presença de microorganismos que posteriormente pudessem influenciar no desenvolvimento das fases imaturas. Esse procedimento foi descartado após a observação do aparecimento de fungos na dieta, independentemente da esterilidade inicial dos componentes da dieta e a partir dos dados de Mraba e colaboradores (2007) que relataram um melhor desenvolvimento das formas imaturas em substratos não esterilizados. Esses fungos, não identificados, são facilmente combatidos com o uso do antifúngico nistatina, diluído em água destilada em uma proporção de 1:100 e borrifado sobre as dietas sempre que necessário.

O desenvolvimento das pupas em adultos foi acelerado a partir do momento em que os pupários foram mantidos em BOD com temperatura elevada (34°C). O uso de pupários separados da dieta inicial das fases imaturas ainda diminui a chance dessas pupas entrarem em contato com o predador *Machocheles sp.* Após dois dias do recolhimento das pupas, os adultos começam a emergir. Em nossos melhores resultados houve produção de moscas adultas em nove dias, desde o recolhimento do ovo até o adulto nascido em laboratório. Esses dados vão de encontro ao descrito por outros autores que tiveram o tempo mínimo de 16 dias para completar o ciclo (SALEM, et al., 2012). Gilles e colaboradores (2005) fizeram uma relação diretamente positiva entre o encurtamento do tempo de desenvolvimento do ovo até o adulto com o aumento da temperatura: a 15°C o tempo médio de desenvolvimento do ovo até o adulto foi de 70 dias, nas mesmas condições, porém com a temperatura a 35°C, esse tempo foi de 12 dias. O efeito do encurtamento do ciclo na biologia do adulto gerado ainda deverá ser avaliado.

Reconhecer e reproduzir as melhores condições possíveis para o desenvolvimento do modelo de estudo é o principal objetivo deste trabalho. Assim o desenvolvimento da colônia foi considerado positivo quando foram geradas mais moscas em laboratório do que coletadas em campo no mês. O melhor resultado até o momento se deu no mês de julho, onde tivemos 950 moscas eclodidas em condições controladas no laboratório, frente a 393 coletadas em campo.

No mês de julho também foi introduzida uma nova metodologia, na qual as moscas F1 emergidas em laboratório e não utilizadas em experimento passaram a ser introduzidas na gaiola de moscas selvagens para posterior coleta dos ovos provenientes destes cruzamentos. Nesse momento a ideia foi avaliar a possibilidade de interromper as coletas em campo e alimentar a colônia apenas com as moscas geradas pela própria colônia. O resultado não correspondeu ao esperado e nos meses seguintes (agosto, setembro e outubro) as formas imaturas não se desenvolveram.

Espera-se que os dados e as metodologias aqui reunidos auxiliem no esclarecimento sobre esse organismo e na importância de investigação sobre o mesmo, dado a grande importância que essa mosca apresenta para a medicina veterinária. A possibilidade de gerar um grande número de moscas que possam posteriormente ser utilizadas para os mais diversos tipos de pesquisa com a finalidade de esclarecer os mecanismos de transmissão de patógenos, a fisiologia e biologia e estratégias de controle desse organismo é muito importante e foi, em parte, o objetivo deste trabalho.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *Stomoxys calcitrans*

RESUMO

FLORENCIO, Melissa Cristina Moraes. **Caracterização das glândulas salivares de *Stomoxys calcitrans*** 2020. 21p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Nos artrópodes a alimentação sanguínea está estritamente ligada à expressão de moléculas com diversos efeitos farmacológicos, como anticoagulante, vasodilatadora, anti ou pró inflamatória, além de ação contra patógenos. Essas moléculas fazem parte da adaptação que esses organismos sofreram em resposta a hematofagia. Essas adaptações, acumuladas ao longo de milhões de anos de evolução, também estão presentes nas glândulas salivares e saliva dos hematófagos. Dada a importância desses órgãos, que muitas vezes podem estar envolvidos na transmissão de patógenos durante a alimentação sanguínea, o objetivo desse capítulo foi caracterizar morfológicamente as glândulas salivares de *Stomoxys calcitrans*, bem como a atividade do peptídeo antimicrobiano stomoxina sobre protozoários de importância médica. As glândulas salivares apresentam comprimento médio de 3,23 mm e alargamento de 81,86 μm na porção anterior e 121,97 μm na posterior. A histologia revelou citoplasma basófilo com arquitetura poligonal e núcleo volumoso, além de grânulos de conteúdo lipídico nas células das glândulas salivares. As análises ultraestruturais mostram um citoplasma rico em mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, bem como numerosos ribossomos. O peptídeo antimicrobiano stomoxina não demonstrou ação contra *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, não levando à inibição de crescimento dos parasitos mesmo em concentrações acima de 100 μM . Os dados morfológicos aqui obtidos poderão vir a futuramente embasar aspectos funcionais

Palavras-chaves: Hematofagia, saliva, peptídeo antimicrobiano.

ABSTRACT

FLORENCIO, Melissa Cristina Moraes. **Characterization of the salivary glands of *Stomoxys calcitrans***. 2020. 21p. Thesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

In arthropods, blood supply is strictly linked to the expression of molecules with various pharmacological effects, such as anticoagulant, vasodilator, anti or pro inflammatory, in addition to action against pathogens. These molecules are part of the adaptation that these organisms underwent in response to hematophagy. These adaptations, accumulated over millions of years of evolution, are also present in the salivary glands and saliva of hematophagous organisms. Given the importance of these organs, which can often be involved in the transmission of pathogens during blood feeding, the objective of this chapter was to morphologically characterize the salivary glands of *Stomoxys calcitrans*, as well as the activity of the antimicrobial peptide stomoxin on protozoa of medical importance. The salivary glands have an average length of 3.23 mm and an enlargement of 81.86 μm in the anterior portion and 121.97 μm in the posterior portion. Histology revealed basophilic cytoplasm with polygonal architecture and large nucleus, in addition to granules of lipid content in the salivary gland cells. Ultrastructural analyzes show a cytoplasm rich in mitochondria and a rough endoplasmic reticulum, as well as numerous ribosomes. The antimicrobial peptide stomoxin showed no action against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*, not leading to growth inhibition of the parasites even at concentrations above 100 μM . Morphological data herein described may futurely support the functional aspects of the *S. calcitrans* glands.

Keywords: Hematophagy, saliva, antimicrobial peptide.

1 INTRODUÇÃO

Artrópodes que se alimentam de sangue sofreram diversas adaptações até que esse hábito alimentar se estabelecesse com sucesso. Podem ser notadas adaptações como os aparelhos bucais, divertículos no intestino, expressão de moléculas na saliva que permitam que a alimentação sanguínea seja mais eficiente para os hematófagos, como vasodilatadores, anticoagulantes, anestésicos.

Uma consequência indireta da alimentação sanguínea ao longo da evolução foi a transmissão de patógenos para os hospedeiros vertebrados nos quais os hematófagos se alimentam, tornando-os vetores de patógenos. Em muitos casos tecidos desses vetores são infectados e colonizados por esses patógenos, sendo o caso das glândulas salivares. Na dinâmica de transmissão de alguns agentes infecciosos as glândulas salivares são infectadas e a transmissão se dá no momento em que o vetor inocula saliva para se alimentar, liberando junto com a saliva os patógenos.

Por estar intimamente relacionada com a hematofagia e transmissão de patógenos pelos hematófagos, entender e caracterizar as glândulas salivares é muito importante e poder levar a informações relevantes quanto ao mecanismo de transmissão por alguns vetores

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hematofagia

O hábito da alimentação sanguínea surgiu no grupo dos artrópodes mais de 20 vezes, independentemente. Nos insetos, especificamente, o comportamento hemofágico surgiu ao menos cinco vezes, estima-se que 14000 espécies de insetos se alimentem de sangue, e esse hábito pode ser encontrado em gêneros não tão proximamente relacionados (ADAMS 1999; MANS, 2011). Acredita-se que o hábito da alimentação sanguínea surgiu após um longo período de associação entre insetos que ainda não eram hematófagos e vertebrados. Esses organismos buscavam o ambiente em que os vertebrados viviam por múltiplos motivos, como oferta de matéria orgânica onde pudessem colocar seus ovos e ninhos com temperaturas mais altas (MOCKFORD, 1971). Eventualmente esses insetos entravam em contato e se alimentam do sangue desses vertebrados. Por ser rica em nutrientes, uma dieta com alimentação sanguínea se refletiu diretamente no aumento da fecundidade nesses grupos (LEHANE, 2005).

Organismos hematófagos passaram por adaptações ao longo de suas evoluções que permitiram que esse hábito se desenvolvesse. Algumas adaptações morfológicas podem ser observadas no intestino de dípteras, onde existem divertículos onde o sangue é armazenado (LEHANE, 1997). Há também a presença da matriz peritrófica: a do tipo I é uma camada secretada pelas células epiteliais em contato com sangue e a do tipo II é secretada continuamente pelo pró-ventrículo (LEHANE, 1976). A matriz peritrófica é uma membrana semipermeável que permite a passagem de proteínas e protege o epitélio do estresse mecânico e químico da digestão (MILLER & LEHANE, 1990). Existem ainda adaptações relacionadas com a digestão de hemoglobina e acúmulo de heme no intestino (STIEBLER et al., 2011) passando por componentes na saliva desses insetos que modulam o sistema hemostático do hospedeiro agindo como vasodilatadores, inibindo a cascata de coagulação sanguínea e agregação plaquetária (RIBEIRO, 2000).

Além de adaptações morfológicas os artrópodes hematófagos ainda devem lidar com os sistemas de homeostasia, inflamação e imune dos vertebrados nos quais se alimentam. É possível identificar componentes na saliva desses hematófagos que atuam neutralizando esses

sistemas, com o objetivo de uma alimentação eficiente. Assim é possível encontrar ao menos uma substância anticoagulante, uma vasodilatadora e uma anti agregação plaquetária na saliva desses artrópodes (RIBEIRO e FRANCISCHETTI, 2003). Uma exceção a essa regra é o díptero *Haematobia irritans*, que não possui em sua saliva moléculas com ação vasodilatadora ou antiplaquetária (CUPP, et al., 1998). Uma sugestão é que tanto *H. irritans*, quanto *Stomoxys* sp., que compartilham ancestral em comum com a mosca doméstica, não tenham desenvolvido adaptações muito refinadas à alimentação sanguínea, o que justifica seus hábitos alimentares, rápidos e repetitivos ao longo do dia, com pouca quantidade de sangue ingerido por vez, e escolha por regiões do corpo do animal onde o mesmo não consegue espantar as moscas, mesmo sentindo as picadas, além do aparelho sugador robusto que causa graves lesões aos hospedeiros (RIBEIRO e FRANCISCHETTI, 2003)

As salivas de hematófagos também costumam apresentar moléculas que neutralizem a dor, seja por inibição da condução nervosa ou por inibição dos agonistas da dor (DAN, et al., 1999; RIBEIRO e MATHER, 1998). Ainda é possível identificar moléculas com ação anticomplemento (VALENZUELA, et al., 2000), inibidores de protease (GILLESPIE, et al., 2001), substâncias que modulam citocinas de diversas formas (MEJRI, et al., 2001; MACALUSO e WIKEL, 2002).

Um dos principais efeitos indiretos na alimentação sanguínea em artrópodes é transmissão de patógenos e nesse sentido moléculas presentes na saliva desses organismos ainda podem agir modulando também o sistema imune dos hospedeiros, o que indiretamente acaba favorecendo o estabelecimento de uma infecção a partir da produção de citocinas anti-inflamatórias e inibição das células do sistema imune (RIBEIRO, 1995).

2.2 Glândula salivar

As glândulas salivares são órgãos de grande importância, tanto para a alimentação sanguínea, onde componentes presentes na saliva serão cruciais para o estabelecimento desse hábito alimentar, como na dinâmica de transmissão de patógenos, quando os mesmos infectam esse órgão e são transmitidos no momento do repasto sanguíneo ou mesmo quando componentes da saliva auxiliam no estabelecimento de uma infecção (RIBEIRO, 1995; RIBEIRO 2000). Na transmissão de *T. brucei* pela mosca Tsé Tsé, o protozoário infecta a glândula salivar da mosca, onde se prolifera na forma epimastigota, se diferenciando ainda no órgão na forma tripomastigota metacíclica, que será inoculado com a saliva no hospedeiro vertebrado na próxima alimentação sanguínea (AKSOY, et al., 2003). No ciclo de transmissão da malária, esporozoítos invadem a glândula salivar de mosquitos *Anopheles* sp. e posteriormente são inoculados com a saliva no próximo repasto sanguíneo. Nas arboviroses, a glândula salivar dos insetos também são infecadas e têm grande importância na dinâmica de transmissão.

Na transmissão de *Leishmania* sp. por flebotomíneos um fator de crescimento secretado pelas glândulas salivares do inseto inibe a produção de superóxido estimulada por IFN- γ , o que impede que os macrófagos do hospedeiro eliminem o parasito (HALL; TITUS, 1995). Adenosina (ADO) e adenosina monofosfatada (AMP) presentes na saliva de *Phlebotomus papatasi* inibem células dendríticas a partir de um mecanismo dependente de IL-10 que exacerbam a infecção por *L. amazonensis* e *L. major* (CARREGARO et al., 2015). Por outro lado foi demonstrado que camundongos podem ser imunizados contra leishmaniose quando expostos previamente a picadas de *P. papatasi* não infectados, sugerindo que moléculas presentes na saliva desse inseto possam ser candidatos a componentes de uma vacina contra leishmaniose (KAMHAWI, 2000; DE MOURA, et al., 2013).

As moléculas presentes na saliva com ações moduladoras no hospedeiro não são necessariamente proteínas, já foi demonstrado que um lipídio identificado como lisofosfatidilcolina na saliva de *Rhodnius prolixus* tem ação anti-hemostática (GOLODNE, et al., 2003).

2.3 Glândula salivar e saliva de *S. calcitrans*

O par de glândulas salivares de *S. calcitrans* atravessa todo o tórax, chegando ao abdômen e nesse segmento a localização das glândulas é ventral, abaixo do intestino. Pela posição dorsal, é visível apenas na porção final, região levemente bulbosa e curvada. Exceto pela porção final, as glândulas são retas em todo o curso. Apresentam a mesma espessura por toda a região do tórax e próximo à cabeça, as glândulas se unem em um ducto estreito e fino composto por células achatadas. Essa estrutura dá origem a uma traqueia quitinosa que leva à faringe. Há uma dilatação no ducto comum, provavelmente uma câmara de armazenamento de saliva (TULLOCH, 1906).

Em um estudo de 2002 Swist e colaboradores demonstraram que o extrato da glândula salivar da mosca-dos-estábulo modula linfócitos bovinos. Mesmo na presença de substâncias mitógenas, o extrato de glândula salivar levou à supressão da proliferação de linfócitos, diferente do extrato do intestino, que não foi capaz de modular essas células. No mesmo trabalho foi identificado anticorpo contra proteínas da glândula salivar de *S. calcitrans* no soro de vacas expostas as moscas. Sendo identificada principalmente uma proteína de 27 kDa.

Posteriormente, o sialoma da mosca mostrou que 45% dos transcritos constitutivos da glândula salivar são relacionados à síntese proteica, 16,7% estão relacionados com metabolismo. Entre as proteínas putativas estão enzimas, proteínas do antígeno 5, peptídeos antimicrobianos e proteínas multigênicas que não têm semelhança com proteínas previamente descritas (WANG et al., 2009).

Classe	Função
Serino protease	Associadas com atividade fibrinogenolítica Digestão de componentes da matriz extracelular dos hospedeiros
Nucleases	Diminuição da viscosidade da matriz de alimentação Produção de fragmentos de DNA farmacologicamente ativos que auxiliam na alimentação sanguínea
Inibidores de serino protease	Atividade anti-trombina
Antígeno 5	Toxina
	Bloqueador do canal de Ca ⁺⁺
	Inibidor de complemento
Peptídeos antimicrobianos	Atividade antimicrobiana

Tabela 1: Classes de proteínas com função presumida ou validada no sialoma de *S. calcitrans*. Fonte: Wang et al., 2009

2.4 Lipídeos em insetos

A composição lipídica em insetos se dá em maior parte por lipídios neutros e por fosfolipídios. Lipídios neutros têm função de armazenamento de energia e/ou carbono (CANAVOSO, et al., 2001). Nos insetos o transporte de lipídios ocorre por uma lipoproteína denominada lipoforina. Após a alimentação, lipídios complexos são hidrolisados e absorvidos no epitélio intestinal. Esses lipídios são então transportados pelas lipoforinas para sítios de utilização ou para o corpo gorduroso, onde são estocados e utilizados para síntese de lipídios mais complexos (CHINO, 1985; SHAPIRO et al., 1988).

Já foram descritos lipídios bioativos na saliva de insetos, como a lisofosfatidilcolina (LPC) que auxilia a alimentação sanguínea do inseto *Rodhnius prolixus* por inibir agregação plaquetária e estimular a produção de óxido nítrico, o que leva à vasodilatação (GOLODNE et al., 2003). A LPC age também na dinâmica de transmissão de *Trypanosoma cruzi* por *R. prolixus*, pois além de estar na saliva, também está presente nas fezes desse inseto. No momento da transmissão a LPC é capaz de bloquear a produção de óxido nítrico induzida pela presença dos parasitos em via TLR-dependente (MESQUITA, et al., 2008).

Investigar a composição lipídica da saliva e glândula salivar pode nos auxiliar a identificar lipídios bioativos, além de entender como essas moléculas podem ter papel importante na transmissão de patógenos.

2.5 Peptídeos Antimicrobianos de insetos

Em insetos o primeiro peptídeo antimicrobiano (PAM) foi identificado e purificado das pupas de *Hyalophora cecropia* (Lepdoptera) em 1980 e foi denominado cecropina (HULTMARK et al., 1980). Desde a purificação do primeiro PAM mais de 150 moléculas da mesma classe foram identificadas (YI et al., 2014). Os PAMs de insetos são classificados em quatro grupos: peptídeos α -helicoidais (cecropina e moricina), peptídeos cisteína (defensina e drosomicina), peptídeos prolinerinos (apidaecina, drosocina e lebecina) e proteínas ricas em glicina (atacina e gloverina) (BULET e STOCKLIN 2005; OTVOS 2000). A maioria dos PAMs de insetos apresenta atividades contra bactérias e ou fungos, mas alguns também mostram atividades contra protozoários e vírus.

As propriedades catiônicas e anfipáticas são elementos importantes envolvidos no modo de ação dos PAMs. O contato inicial entre PAM e o microorganismo ocorre por meio de interação eletrostática ou hidrofóbica. Logo é fortemente dependente da composição lipídica da membrana plasmática do patógeno (ONGEY et al., 2018). A partir da interação com a membrana plasmática, o PAM leva à alteração na permeabilidade da mesma, afetando o potencial de membrana e balanço da pressão osmótica (SHEN et al., 2018). A formação de poros na membrana, a partir dos PAMs pode levar à morte da célula afetada (JOZEFIK e ENGBERG, 2017). A diferença das composições nas membranas plasmáticas entre bactérias, protozoários e hospedeiros mamíferos explica a ação seletiva dessas moléculas, que, na maior parte das vezes não apresenta ação citotóxica para células dos hospedeiros (YEAMAN e YOUNT, 2003).

Por um longo tempo se acreditou que a atividade antimicrobiana dos PAMs era exclusivamente resultado da permeabilização ou ruptura da membrana, Atualmente se sabe que os PAMs podem ter alvos intracelulares também, por exemplo a buforina II, que penetra na membrana celular de *Escherichia coli*, se acumulando no interior da célula bacteriana e se

ligando ao DNA e RNA, o que leva à morte da célula, provavelmente por inibição das funções celulares (PARK; KIM; KIM, 1998). Alguns PAMs são capazes de induzir a morte celular apoptótica pela quebra do potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspase 3 em *Leishmania* (KULKARNI et al., 2006).

A ação de PAMs de insetos contra protozoários vem demonstrando resultados favoráveis. No tratamento contra *P. falciparum*, cecropinas de *H. cecropia* afetam o desenvolvimento de oocistos em esporozoítos com DL₅₀ entre 0,5 e 1 µg/µL (GWADZ et al., 1989). Derivados da cecropina também demonstraram efeito sobre as formas sanguíneas, levando à lise do parasito em tratamentos com concentração de 50 µM (JAYNES, et al., 1988). Uma defensida presente na hemolinfa de *Phlebotomus duboscqi* (Diptera) apresenta ação contra promastigotas de *Leishmania major* com IC₅₀ de 78 µM *in vitro* (BOULANGER, et al., 2004). O tratamento *in vitro* com uma atacina recombinante de *Glossina morsitans morsitans* apresentou IC₅₀ de 0,075 µM contra formas sanguíneas e procíclicas de *Trypanosoma brucei* (HU e AKSOY, 2005).

Entre PAMs identificados no sialoma de *S. calcitrans* está a stomoxina, um peptídeo com sequência de 42 aminoácidos com estrutura helicoidal anfipática, previamente identificada no intestino da mosca. A proteína recombinante desse peptídeo apresentou atividade microbicida contra bactéria Gram-negativa como *Escherichia coli*, bactéria Gram-positiva como *Enterococcus faecalis*, fungos como *Fusarium culmorum* e *Candida albicans* além de afetar o protozoário *Trypanosoma brucei rhodesiense*, com IC₅₀ de 37 µM para formas tripomastigotas deste parasito (BOULANGER et al., 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Insetos e dissecação

Insetos adultos F1 provenientes da colônia descrita no capítulo I foram utilizados. Moscas em jejum de 24 horas anestesiadas a -4°C por 2 minutos 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). As glândulas salivares foram separadas para pós-processamento.

3.2 Microscopia óptica

Dez pares de glândulas salivares frescas obtidas como descrito acima foram montadas com PBS em lâmina com lamínulas e observadas em microscópio Olympus BX53. O material foi medido e fotografado a partir do software CellR&CellRImaging Life Science Microscopy.

3.3 Histologia

Eosina-Hematoxilina: glândulas salivares frescas obtidas como descrito acima foram fixadas em Bouin por 30 minutos, posteriormente lavadas em PBS pH 7.2 e desidratada em soluções de concentrações crescentes de etanol (de 70, 80, 90, 95, 100%), diafanizado em xilol, seguido de impregnação e inclusão em parafina-Histosec (Merck). Foram realizados cortes histológicos transversais de 4 μm de espessura posteriormente corados com HE para análise morfológica (TOLOSA *et al.* 2003). Os cortes histológicos foram observados e fotomicrografados com câmera digital Sony Cyber-Shot W230 diretamente acoplada ao microscópio Olympus BX41.

Sudan III: glândulas salivares frescas obtidas como descrito acima foram depositadas com PBS em lâminas silanizadas e posteriormente coradas com Sudan III por 40 minutos em câmara úmida. O órgão foi observado e fotomicrografado com câmera digital Sony Cyber-Shot W230 diretamente acoplada ao microscópio Olympus BX41.

3.4 Análise ultraestrutural

Glândulas salivares de *S. calcitrans* frescas obtidas como descrito acima foram lavadas em Hank's (DIFCO) e fixadas por 1 hora com 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato, pH 7,2. Após repetidas lavagens em 0,1M de tampão cacodilato, as glândulas foram pós-fixadas em solução de 0,1M de tampão cacodilato, contendo 5mM de cloreto de cálcio, 0,8 mM de ferricianeto de potássio e 1% de tetróxido de ósmio por 40 minutos a temperatura ambiente. As glândulas foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de acetona (50, 70, 90, 100%). O material foi emblocado em Epon. Secções finas foram obtidas em ultramicrotomo, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

3.5 Composição lipídica

Insetos: Adultos F1 provenientes da colônia descrita no capítulo I foram utilizados. Moscas em jejum de 24 horas anestesiadas a -4°C por 5 minutos foram microinjetadas no tórax com 690 nanolitros de trítio. Após 24 horas os insetos foram dissecados em microscópio

estereoscópico em lâmina escavada contendo PBS, com o auxílio de pinças (Jewelers forceps, Dumont nº 5, Sigma-Aldrich). As glândulas salivares foram separadas para pós-processamento.

Análise de lipídios: Dez pares de glândulas salivares foram submetidas à extração de lipídios com metanol:clorofórmio:água destilada (2:1:0,8) (BLIGH e DYER, 1959). Após agitação por 1 hora as amostras foram centrifugadas por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado em geladeira. O restante do material passou por uma segunda extração de lipídios com o mesmo procedimento descrito acima. O segundo sobrenadante foi adicionado ao anterior e então 1,0 ml de água destilada e 1,0 ml de clorofórmio foram adicionados. O material foi energeticamente agitado e centrifugado por 15 minutos. A fase orgânica (inferior) que continha os lipídios foi então separada com auxílio de uma pipeta Pasteur e seca por arraste em N₂.

HPTLC: Os lipídios neutros foram analisados em HPTLC (Cromatografia de camada fina de alto desempenho) utilizando mistura hexano:éter etílico:ácido acético (60:40:1) como solvente (KAWOOYA e LAW, 1988). As placas foram coradas com vapores de iodo e as manchas na placa correspondentes a cada lipídio foram extraídas e a radioatividade foi estimada por cintilação líquida.

3.6 Peptídeo antimicrobiano stomoxina

A proteína recombinante stomoxina foi produzida como descrito em Boulanger et al., 2002 e gentilmente cedida pelo pesquisador Dr Philippe Bulet do Centre National de la Recherche Scientifique (França) e solubilizada em água destilada.

3.7 Parasitos

Trypanosoma cruzi, cepa DM28c foi cultivado em meio de cultura BHI suplementado com soro bovino fetal inativado (10%), hemina (1%) e ácido fólico (1%), mantido a 27°C. *Leishmania amazonensis*, cepa JOS, foi cultivado em meio de cultura Schneider suplementado com soro bovino fetal inativado (10%), mantido a 27°C.

3.8 Tratamentos dos parasitos com stomoxina

Epimastigotas de *T. cruzi* (2×10^5 /poço) crescidos em placas de 96 poços com meio BHI suplementado como descrito acima foram mantidos a 27°C na presença ou não de 0,1, 1, 10, 50, 100, 200, 300 ou 400 µM de stomoxina. A viabilidade dos parasitos foi estimada por contagem em câmara de Neubauer após 4 dias de tratamento. Promastigotas de *L. amazonensis* (2×10^5 /poço) crescidos em placas de 96 poços com meio Schneider suplementado como descrito acima foram mantidos a 27°C na presença ou não de 1, 10, 25, 50 ou 100 µM de stomoxina. A viabilidade dos parasitos foi estimada por contagem em câmara de Neubauer após 7 dias de tratamento.

4 RESULTADOS

4.1 Microscopia óptica

O comprimento médio das glândulas salivares é de 3,23mm, a região anterior apresenta largura média de 81,86 μm e a porção posterior, mais alargada apresenta largura média de 121,97 μm .



Figura 18: Microscopia óptica de uma glândula salivar visualizada com aumento de 40x. Barra 500 μm .

4.2 Histologia da glândula salivar de *S. calcitrans*

A técnica histológica corada com HE (figura 19) permitiu verificar a organização estrutural das células glandulares. Os lóbulos são formados por epitélio glandular simples delimitando o lúmen, onde a saliva é armazenada. As células secretoras possuem formato poligonal, núcleo volumoso e citoplasma basófilo. Entre as células que compõem o parênquima glandular foi observada a presença de delgada camada de tecido conjuntivo frouxo.

Foram observadas nas glândulas vesículas de secreção, característica do tipo de secreção merócrina.

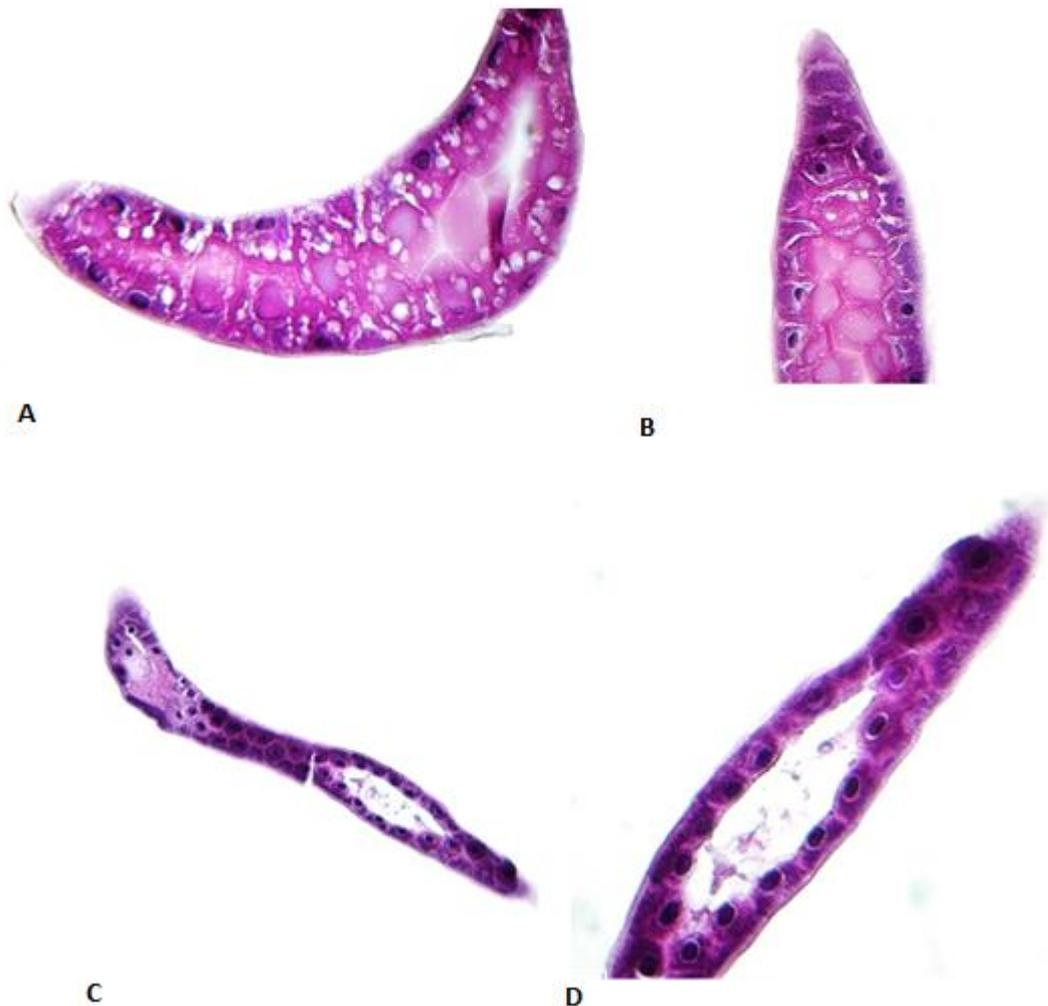


Figura 19: Histologia da glândula salivar de *S. calcitrans*: A-B Cortes histológicos dos lóbulos de glândula salivar corados pela Hematoxilina e Eosina (HE). (A) Visão geral da arquitetura do lóbulo glandular (Aumento 1310x); (B) Destaque para o formato celular (Aumento 1150x) e (C-D) Detalhe do epitélio glandular (Aumento 360x, Aumento 1310x, respectivamente).

A técnica utilizada com a coloração Sudan III (figura 20) permitiu a visualização de grânulos com conteúdo lipídico ao longo de todo o órgão.

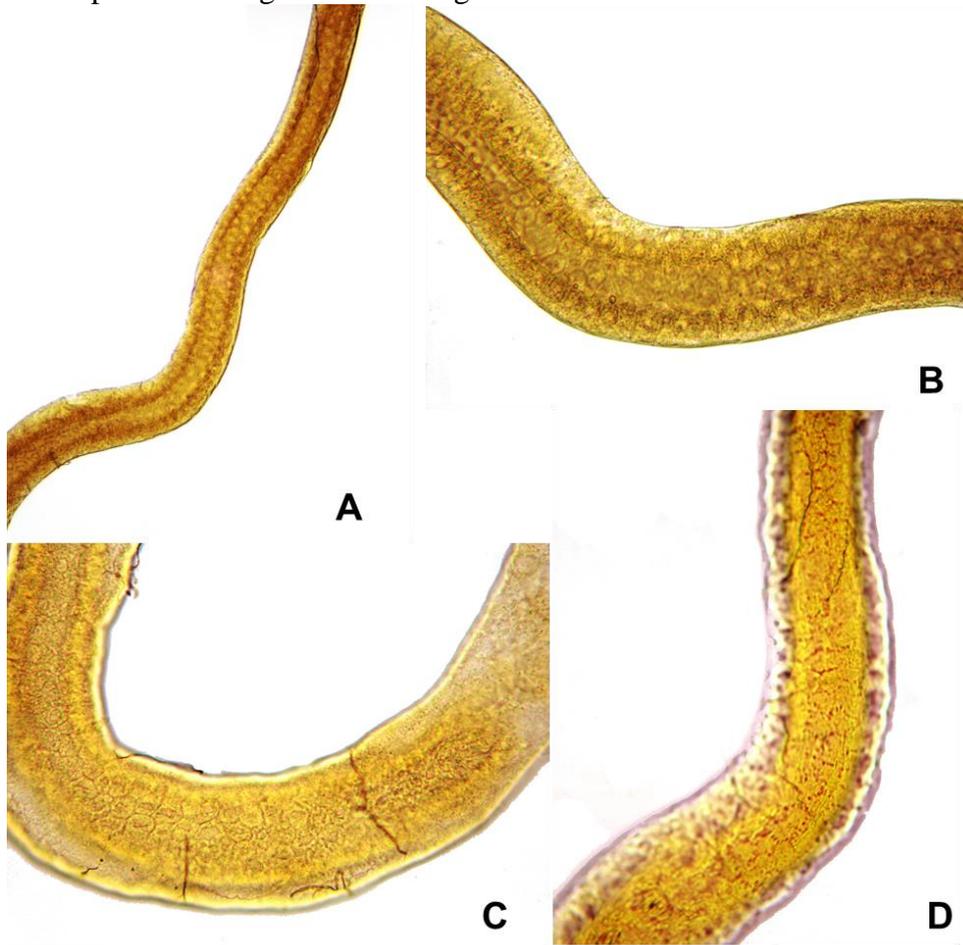
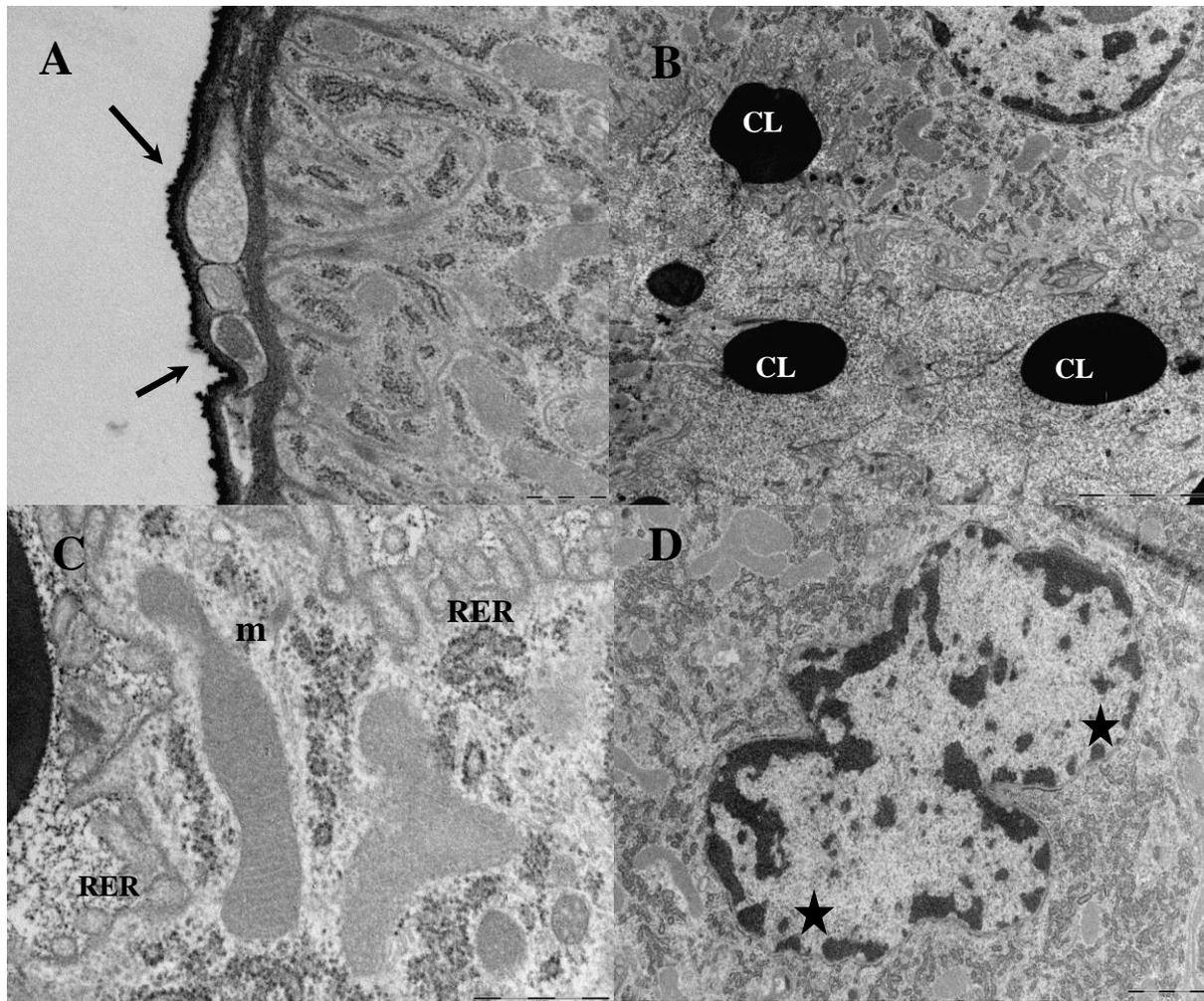


Figura 20: Histologia da glândula salivar de *S. calcitrans*: Cortes histológicos dos lóbulos de glândula salivar corados por Sudan III. É possível observar grânulos com conteúdo lipídico por toda a extensão do órgão. (A) Aumento de 180x. (B) Aumento de 360x. (C e D) Aumento de 740x.

4.3 Análise ultraestrutural da glândula salivar de *S. calcitrans*

As análises ultraestruturais (figura 21) revelam que as células apresentam grânulos eletrondensos indicativos de corpos lipídicos, bem como parte do material que está sendo secretado, muitos perfis de mitocôndria e de retículo endoplasmático rugoso.



ndula
Em C

4.4 Composição lipídica das glândulas salivares de *S. calcitrans*

Os resultados da composição de lipídios neutros da glândula salivar e saliva de *S. calcitrans* (figura 22) mostram que a maior parte da composição lipídica desse órgão é monoacilglicerol (42,58%) e triacilglicerol (31,9%), seguida por 1,3 diacilglicerol e 1,2 (9,85%) diacilglicerol + colesterol (9,34%). Ácido graxo (1,42%) e colesterol esterificado (0,83%) estão em menor quantidade nessa composição. Foram ainda observados na placa duas manchas lipídicas não determinadas, ND1 (2,3%) e ND2 (1,75%). As porcentagens da composição lipídica foram calculadas a partir dos dados brutos.

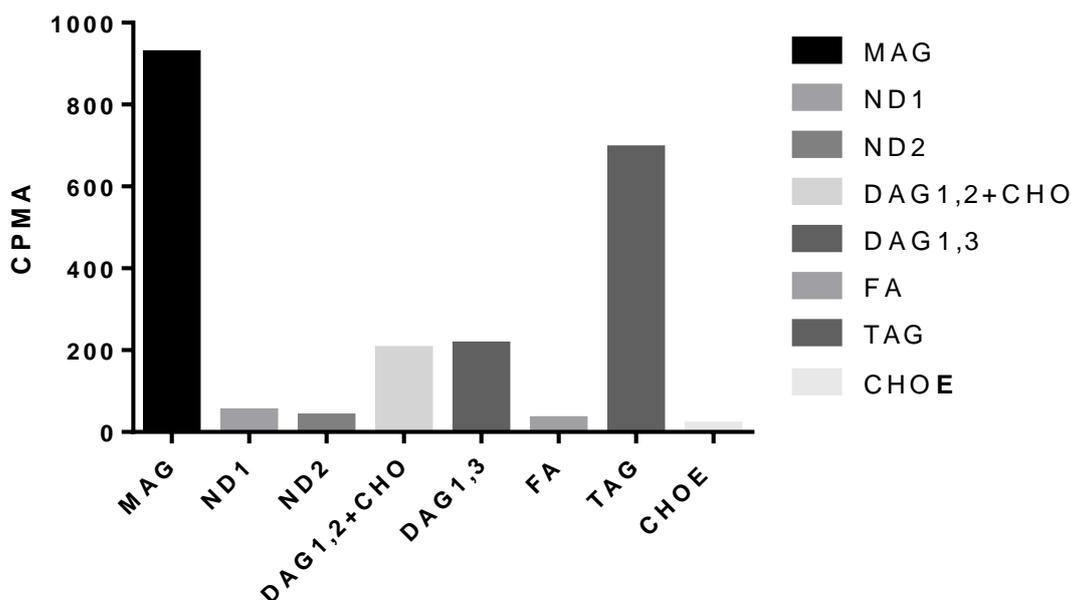


Figura 22: Composição de lipídios neutros das glândulas salivares de *S. calcitrans*. Expressos em contagem por minuto (CPMA) MAG: monoacilglicerol, ND1: não determinado 1, ND2: não determinado 2, DAG 1,2,+CHO: 1,2 diacilglicerol + colesterol, DAG 1,3: 1,3 diacilglicerol, FA: ácido graxo, TAG: triacilglicerol, CHOE: colesterol esterificado.

4.5 Efeito do peptídeo antimicrobiano stomoxina sobre parasitos de importância médico veterinário

Os tratamentos com stomoxina sobre *T. cruzi* (figura 23) e *L. amazonensis* (figura 24) não apresentaram inibição do crescimento dos parasitos em nenhuma das concentrações testadas, sugerindo que o peptídeo não tem ação microbicida sobre esses protozoários.

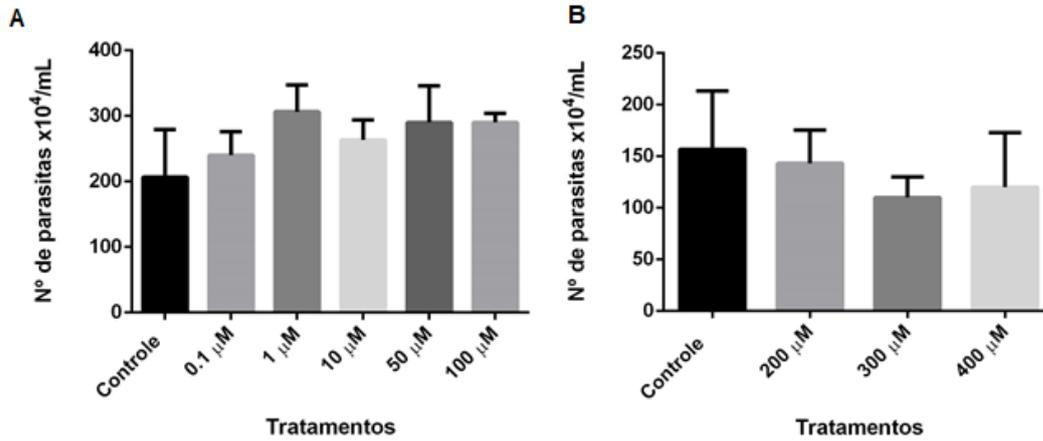


Figura 23: Efeito de stomoxina sobre *T. cruzi*. Parasitos foram tratados em diferentes concentrações do peptídeo antimicrobiano por 4 dias. Experimento realizado em triplicata.

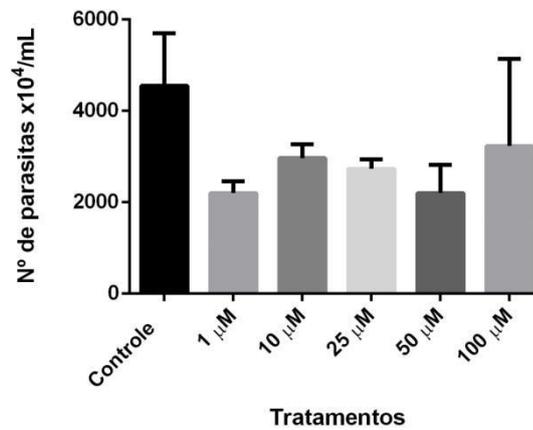


Figura 24: Efeito de stomoxina sobre *L. amazonensis*. Parasitos foram tratados em diferentes concentrações do peptídeo antimicrobiano por 7 dias. Experimento realizado em triplicata.

5 DISCUSSÃO

Acredita-se que a alimentação sanguínea se desenvolveu a partir do relacionamento íntimo e prolongado entre insetos não hematófagos e vertebrados. Esse relacionamento ao longo de milhões de anos pode ter selecionado populações de insetos capazes de digerir matéria orgânica dos vertebrados, como pêlos, penas e pele o que auxiliou o desenvolvimento da hematofagia (ADAMS, 1999). A alimentação sanguínea pode ser considerada uma vantagem evolutiva pois proporciona uma maior fecundidade para esses organismos (LEHANE, 2005). As adaptações relacionadas com a hematofagia ao longo de milhões de anos podem ser observadas na fisiologia e anatomia desses organismos. A composição da saliva dos hematófagos apresenta diversas moléculas com propriedades farmacológicas, e a glândula salivar é um órgão de enorme importância na dinâmica da alimentação desses organismos.

As glândulas salivares de *S. calcitrans* são órgãos alongados porém mais curtos do que as glândulas salivares de *Glossina sp* (TULLOOCH, 1906). Foi possível observar pelo preparo histológico que as células apresentam formato poligonal e núcleos volumosos com uma única camada de células formando o epitélio secretor, como no percevejo *Brotoncoris tabidus* (AZEVEDO et al., 2007). Apresenta citoplasma basófilo assim como o citoplasma das células das glândulas salivares da barata *Periplaneta americana* (DAY, 1950) e do mosquito *Aedes aegypti* (ORR et al., 1961). Independente de esses organismos serem ou não hematófagos, as características celulares desses órgãos aparentemente são conservadas em artrópodes da classe Insecta. Foi observada ainda uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo, e foi também identificado que essas células são secretoras merócrinas, que secretam por exocitose, sem liberar conteúdo citoplasmático.

As análises ultraestruturais revelaram que as células das glândulas salivares são metabolicamente muito ativas pela presença de muitos perfis de mitocôndria observados e pelo grande número de retículo endoplasmático rugoso. Dallai e colaboradores (2017) ao descreverem a glândula salivar de *Zorotypus caudelli* e *Z. hubbardi* (Zoraptera) visualizaram citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e microtúbulos, como os de *S. calcitrans*. Apesar da composição da saliva dos organismos analisados por Dallai não ser conhecida, eles presumem que seja rica em proteínas, pela grande quantidade de estruturas ligadas à síntese de proteína no citoplasma. O proteoma da saliva de *S. calcitrans* já é conhecido e de fato a secreção é rica em conteúdo protéico (WANG et al., 2009).

A grande quantidade de grânulos eletrodensos nas glândulas salivares, observada na microscopia eletrônica de transmissão, são características de grânulos de lipídios, o que foi mais tarde confirmado a partir da técnica histológica utilizando a coloração com Sudan III. O ensaio para composição de lipídios neutros, realizado com as moscas em jejum, revelou que a composição majoritária da glândula salivar se dá por mono e triacilglicerol. Ensaio em outras condições fisiológicas devem ser realizados para melhor comparação e entendimento do metabolismo de lipídios nesse organismo. Além disso, lipídios não determinados foram observados. A futura caracterização da composição dos fosfolipídios deve esclarecer ainda se há a presença de lipídios com bioatividades já descritas, como a LPC (CHAGAS-LIMA, et al., 2019)

O peptídeo antimicrobiano stomoxina descrito na saliva de *S. calcitrans* e testado em protozoários de importância humana, *T. cruzi* e *L. amazonensis* não apresentou atividade tripanocida. Por sua conformação helicoidal, stomoxina é classificada como uma cecropina (BOULANGER et al., 2002). Peptídeos antimicrobianos dessa classe são conhecidos por seu amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (YI et al., 2014), porém já foi demonstrado que cecropinas podem apresentar efeitos contra protozoários como

P. falciparum (GWADS et al., 1989; JAYNES, et al., 1988), *Leishmania aethiopica* (AKUFFO, et al., 1998), *T. b. brucei* (BOULANGER, et al., 2002).

Stomoxina foi testado contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e a falta de ação contra esses parasitos nessa forma pode ser explicada pelo fato da membrana plasmática de promastigotas ser formada principalmente por lipídios neutros, o que reduziria a interação com PAMs além da presença do glicocálice espesso na superfície do corpo celular (WASSEF, FIORETTI e DWYER, 1985). Nas formas amastigotas o glicocálice é quase ausente (SPATH, et al., 2000). *Leishmania* apresenta ainda uma metaloprotease de superfície dependente de zinco chamada leishmanolisina que tem papel na resistência a PAMs, via inibição dos mesmos e prevenção da apoptose (KULKARNI, et al., 2006). De forma semelhante ao que ocorre em *Leishmania*, a superfície de *T. cruzi* é recoberta por glicoproteínas semelhantes às mucinas, moléculas presentes na superfície do parasito nos estágios de epi, tripo e amastigota, que têm papel nos processos de invasão celular do parasito, ativam macrófagos e conferem também uma proteção à superfície desse protozoário (ACOSTA-SERRANO et al., 2001). As características de superfície de *L. amazonensis* e *T. cruzi* podem ter papel importante na inativação de PAMs sobre esses parasitos.

CAPÍTULO III

INTERAÇÃO ENTRE *Stomoxys calcitrans* E *Leishmania* sp.

RESUMO

FLORENCIO, Melissa Cristina Moraes. **Interação entre *Stomoxys calcitrans* e *Leishmania* sp.** 2020. 21p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Stomoxys calcitrans, a mosca-dos-estábulos, é um díptero de grande importância veterinária. Vetor mecânico de muitos patógenos, esse inseto leva a consideráveis perdas econômicas no setor pecuário. Ambos machos e fêmeas, são hematófagos e apresentam um comportamento alimentar persistente e agressivo, o que favorece a transmissão de patógenos para seus hospedeiros, principalmente bovinos. Entre os parasitos transmitidos mecanicamente por *S. calcitrans* estão espécies de *Leishmania*, protozoários que causam leishmaniose, um grupo de doenças que afeta seres humanos e animais. Com base nessas informações, o trabalho teve como objetivo investigar a interação entre as espécies *S. calcitrans* e *Leishmania*. Para ensaios *in vitro*, foram utilizadas moscas coletadas no campo e moscas F1 de colônia. Os intestinos dissecados e com epitélio exposto interagiram com *Leishmania amazonensis* (1×10^6) ou *Leishmania infantum chagasi* (1×10^6) por 1 hora, sendo posteriormente lavados e homogeneizados. Os parasitos que permaneceram ligados ao intestino foram contados em câmara de Neubauer. Foi obtida uma média de $2,9 \times 10^3$ parasitos por intestino na interação mosca de campo com *L. amazonensis*, 3×10^3 para moscas de colônia e *L. amazonensis* e $4,7 \times 10^3$ para moscas de campo e *L. i. chagasi*. Para ensaios *in vivo*, as moscas F1 de colônia foram artificialmente alimentadas com sangue bovino contendo *L. i. chagasi* (1×10^7 por mL). Trinta minutos após a alimentação, as moscas foram dissecadas, os intestinos lavados e homogeneizados e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, obtendo-se um número médio de 6×10^3 parasitos viáveis por intestino. Esses resultados preliminares indicam uma interação entre esses organismos, uma vez que *L. amazonensis* foi capaz de se ligar ao epitélio intestinal de *S. calcitrans*, além de *L. i. chagasi* permanecer viável no intestino de *S. calcitrans* após a alimentação.

Palavras-chaves: *Stomoxys calcitrans*, *Leishmania* sp., interação.

ABSTRACT

FLORENCIO, Melissa Cristina Moraes. **Interaction between *Stomoxys calcitrans* and *Leishmania* sp.** 2020. 21p. Thesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Stomoxys calcitrans, the stable fly, is a diptera of great veterinary importance. Mechanical vector of many pathogens, this insect leads to considerable economic losses in the livestock sector. Both males and females are hematophagous and have a persistent and aggressive feeding behavior, which favors the transmission of pathogens to their hosts, mainly cattle. Among the mechanically transmitted parasites by *S. calcitrans* there are species of *Leishmania*, protozoa that cause leishmaniasis, a group of diseases that affect humans and animals. Based on this information, the work aimed to investigate the interaction between *S. calcitrans* and *Leishmania*. For *in vitro* tests, flies collected in the field and F1 colony flies were used. The dissected intestines and exposed epithelium interacted with *Leishmania amazonensis* (1×10^6) or *Leishmania infantum chagasi* (1×10^6) for 1 hour, then washed and homogenized. Parasites that remained attached to the intestine were counted in a Neubauer chamber. An average of 2.9×10^3 parasites per gut was obtained in field flies interaction with *L. amazonensis*, 3×10^3 for colony flies and *L. amazonensis* and 4.7×10^3 for field flies and *L. i. chagasi*. For *in vivo* tests, F1 colony flies were artificially fed with bovine blood containing *L. i. chagasi* (1×10^7 per mL). Thirty minutes after feeding, the flies were dissected, the intestines were washed and homogenized and the parasites were counted in a Neubauer chamber. An average number of 6×10^3 viable parasites was obtained per intestine. These preliminary results indicate an interaction between these organisms, since *L. amazonensis* was able to bind to the intestinal epithelium of *S. calcitrans* and in addition to *L. i. chagasi* remain viable in the intestine of *S. calcitrans* after feeding.

Keywords: *Stomoxys calcitrans*, *Leishmania* sp, interaction.

1 INTRODUÇÃO

Apesar de ser frequentemente acusada de atuar apenas como vetora mecânica, existem inúmeros relatos na literatura de *S. calcitrans* transmitindo uma gama muito diversificada de patógenos como bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Os mecanismos pelos quais esse organismo atua como vetor não são muito claros. Mesmo sem evidências concretas, esses relatos podem se basear em dados epidemiológicos, que cruzam os dados de infestações de *S. calcitrans* com surtos de doenças de importância veterinária.

Na década de 40, na busca por vetores da Leishmaniose, doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, Berberian (1938) especulou sobre a possibilidade de essa enfermidade ser transmitida por *S. calcitrans*. Os testes realizados na época mostraram que a transmissão de *L. tropica* foi possível de um paciente para o outro através de picadas da mosca-dos-estábulo.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são transmitidos por flebotomíneos, sendo esses vetores considerados permisivos quando transmitem diversas espécies de *Leishmania* ou específicos quando transmitem apenas espécies específicas. A especificidade da relação vetor patógeno se dá por vários fatores, entre eles a capacidade de interação molecular entre os protozoários e o epitélio intestinal dos vetores.

O trabalho buscou verificar a possibilidade de parasitos de diferentes espécies do gênero *Leishmania* interagirem com o epitélio intestinal de *S. calcitrans*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Transmissão de patógenos

S. calcitrans é um reconhecido vetor mecânico de uma diversidade de patógenos. Em alguns casos, como na transmissão de bactérias *S. calcitrans* pode agir como a fonte da contaminação, apresentando as bactérias em sua superfície, como *Enterobacter sakazakii*, que pode causar meningite, isolada de larvas e adultos coletados no campo. Em laboratório foi observado que as moscas suportam uma concentração alta e constante da bactéria ao longo de semanas e que as mesmas contaminaram as fontes alimentares oferecidas, sangue e solução de mel (MRAMBA et al., 2007). Recentemente nosso grupo mostrou *S. calcitrans* coletadas no campus de Seropédica da UFRRJ infectadas com *A. marginale*, indicando uma possível participação da mosca na transmissão desse agente infeccioso (ARAÚJO, 2019). Em um trabalho comparativo, a transmissão de *A. marginale* de forma biológica pelo carrapato *Dermacentor andersoni* foi muito mais eficiente do que a transmissão mecânica por *S. calcitrans*, sendo a bactéria detectada apenas em moscas que se alimentaram em animais com parasitemia muito alta. Entretanto, é importante destacar que existem cepas de *A. marginale*, como a cepa Flórida, que não são transmitidas por *D. andersoni* e nesse cenário, a transmissão mecânica por moscas hematófagas, incluindo *S. calcitrans* tem grande importância epidemiológica em potencial (SCOLES et al., 2005). Em um estudo realizado em municípios do interior do estado do Rio de Janeiro, foram isoladas 28 espécies de bactérias em moscas coletadas do campo, algumas com potencial patogênico como *Serratia odorifera* e *Hafnia alvei* (CASTRO et al., 2008).

Os estudos de competência vetorial podem se basear também em dados epidemiológicos, correlacionando surto de doenças com infestações dos possíveis vetores. Dessa forma *S. calcitrans* foi identificada como forte candidata a transmitir o vírus da dermatite nodular contagiosa ou lumpy skin disease (LSD) (KAHANA-SUTIN et al., 2017).

Com a mesma lógica, durante um surto de infecção por *Trypanosoma evansi* nas Ilhas Canárias o único hematófago capturado em uma fazenda com camelos infectados foi *S. calcitrans*, sendo assim responsabilizada pela transmissão mecânica nesse cenário (RODRÍGUEZ et al., 2014). Surtos de tripanossomíase por *T. vivax* no estado da Paraíba também ocorreram concomitante ao aumento da população de *S. calcitrans*, mais uma vez relacionando esse organismo com a transmissão mecânica desse patógeno (BATISTA et al., 2012).

Em relação a outros protozoários, foi demonstrado que *S. calcitrans* é capaz de transportar *Besnoitia besnoiti*, um apicomplexa de importância veterinária, de um animal infectado para sangue livre de parasitos oferecido em alimentador artificial (LIÉNARD et al., 2013).

Em 1938 Berberian demonstrou em laboratório a transmissão de *Leishmania tropica* de um indivíduo para outro, através da picada de *S. calcitrans*. O autor descreve que causou uma lesão em si mesmo, pela inoculação intracutânea de *L. tropica* e após 15 dias da inoculação as lesões começaram a se manifestar. *Stomoxys calcitrans* foram colocadas para se alimentar no local das lesões e posteriormente eram imediatamente colocadas em contato com um voluntário, onde poderia realizar alimentação sanguínea. No total, o voluntário recebeu 11 picadas destas moscas e após cinco meses, as lesões começaram a aparecer exatamente nos locais onde as moscas haviam se alimentaram. Ainda hoje pouco se sabe sobre essa dinâmica e é importante investigar melhor como *S. calcitrans* pode atuar no cenário da transmissão de patógenos, incluindo *Leishmania sp.*

2.2. *Leishmania sp.* e leishmanioses

O gênero *Leishmania* compreende parasitos protozoários heteroxênicos passando por hospedeiros vertebrados e invertebrados. Ao longo do seu ciclo de vida apresentam fase intracelular e extracelular. As principais formas evolutivas são promastigota e amastigota. A forma promastigota é caracterizada por uma forma alongada e presença de longo flagelo, estando presente no hospedeiro invertebrado. A forma amastigota é caracterizada pelo corpo celular arredondado e o flagelo curto, limitado à bolsa flagelar, é a forma intracelular presente no hospedeiro vertebrado (REY, 2013).

Os vetores biológicos desse protozoário são os flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Os vetores da leishmaniose podem ser divididos em específicos, como *L. tropica* e *P. sergenti*, onde esse protozoário é preferencialmente transmitido apenas por esse vetor, ou permissivos, quando uma espécie de flebotomia é capaz de transmitir várias espécies de *Leishmania* (VASELEK e VOLF, 2019). O desenvolvimento desse protozoário no inseto vetor apresenta várias etapas e formas evolutivas intermediárias como descrito a seguir. Quando as formas amastigotas são adquiridas pelo inseto a partir da alimentação sanguínea em um hospedeiro vertebrado infectado ocorre diferenciação da mesma em promastigota procíclica. Essa forma evolutiva se multiplica no intestino médio do inseto. Os protozoários são capazes sobreviver às enzimas digestivas do inseto pela secreção de moléculas protetoras como o lipofosfoglicano (LPG), principal glicoconjugado de superfície do parasito, e escapam da matriz peritrófica pela secreção de quitinases que degradam essa matriz, permitindo que os mesmos se fixem no epitélio intestinal do inseto, não sendo eliminados com o conteúdo intestinal. Posteriormente, 2 a 3 dias após a alimentação sanguínea, os parasitos sofrem um alongamento se diferenciando em promastigotas nectomonadas. Essas formas apresentam alta motilidade e colonizam o intestino. O evento seguinte é a diferenciação em promastigotas leptomonadas,

que ocorre de 3 e 7 dias após a alimentação. Essas formas se acumulam na luz do intestino médio, se replicam e são responsáveis pela produção de gel secretor do promastigota (PSG), um fator importante na transmissão do parasito. Há também a forma promastigota haptomonada, que não tem origem descrita. O PSG, secretado pelas leptomonadas, atua bloqueando o tubo digestório do inseto, de modo que o mesmo precisa regurgitá-lo para liberar o tubo e realizar o repasto sanguíneo. Nesse momento, junto com o PSG o inseto regurgita as formas promastigotas metacíclicas, infectivas para o hospedeiro vertebrado (KAMHAWI, 2006).

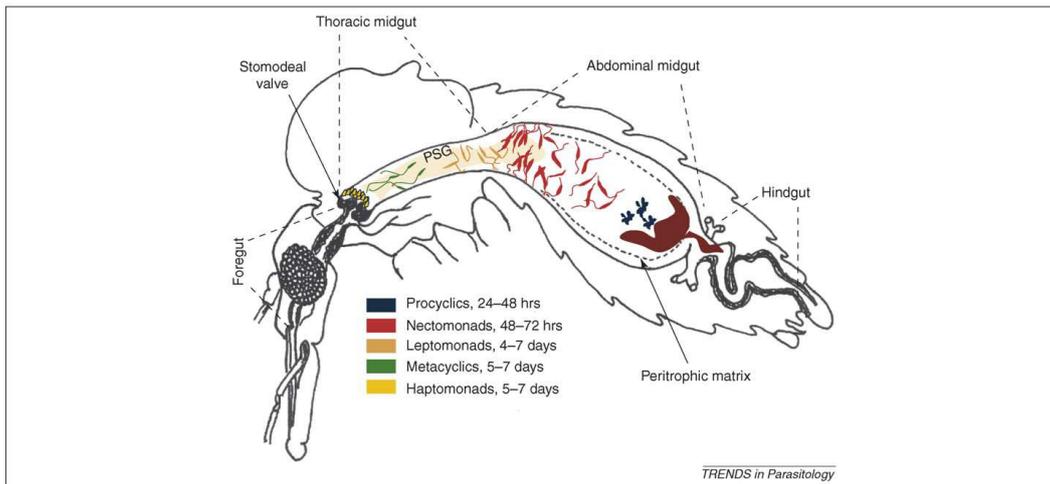


Figura 23: Ciclo de *Leishmania* no flebotomíneo. Fonte: KAMHAWI, 2006

Um importante aspecto epidemiológico da leishmaniose é o fato de a doença ocorrer em cães e humanos em algumas regiões do Brasil onde o vetor biológico não está presente (VIOL, et al., 2016). Este fato acaba por fomentar a busca por outros hematófagos que possam atuar como vetores desses protozoários, já foi encontrado material genético de *Leishmania* sp. em pulgas (FERREIRA, et al., 2009) e carrapatos (TROTTA et al., 2012) recolhidos de cães infectados. Já foram encontrados também a forma promastigota do parasito nos intestinos, ovários e glândula salivar de *Rhipicephalus sanguineus* (VIOL, et al., 2016)

O complexo de manifestações clínicas causada por parasitos do gênero *Leishmania* é determinado leishmanioses. Existem diversas manifestações clínicas que variam de acordo com a espécie do parasito infectante. As formas clínicas são denominadas leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. No Brasil tanto leishmaniose cutânea como mucocutânea são causadas principalmente por *L. braziliensis*, porém podem ser causadas também pro *L. amazonensis*, enquanto leishmaniose visceral é causada por *L. infantum chagasi*. O complexo de leishmanioses é uma antroponose de grande importância epidemiológica no Brasil, afetando humanos e cães (BRASIL, 2010).

O cão é considerado o reservatório doméstico mais importante da leishmaniose visceral. Por essa razão é um dos alvos do controle no Brasil. Nos cães a infecção se caracteriza como uma doença sistêmica, crônica que em animais susceptíveis pode levar a lesões cutâneas, renais, oftalmológicas, digestivas, locomotoras e neurológicas. Normalmente casos de leishmaniose canina precedem ou estão correlacionados com casos de leishmaniose humana (OLIVEIRA et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitos

Leishmania amazonensis (JOS) foi cultivado em meio de cultura Schneider suplementado com soro bovino fetal inativado (10%), mantido a 27°C. *Leishmania infantum chagasi* (MCAM 263) foi cultivado em meio de cultura Schneider suplementado com soro bovino fetal inativado (10%) e urina humana filtrada (2%), mantido a 27°C.

3.2 Insetos

Foram utilizadas moscas de colônia cedidas pelo Professor Avelino Bittencourt (IV) da UFRRJ e moscas coletadas no *campus* de Seropédica da UFRRJ.

3.3 Ensaios *in vitro*

Para testes *in vitro*, moscas de colônia com 1 a 3 dias após a emergência, alimentadas apenas com solução de sacarose (10%) e moscas coletadas no campo tiveram seus intestinos dissecados em solução salina com auxílio de pinças (Jewelers forceps, Dumont nº 5, Sigma-Aldrich) e cortados longitudinalmente. O epitélio intestinal exposto foi incubado na presença de *Leishmania amazonensis* 1×10^6 por 60 minutos. Após esse período, os intestinos foram lavados três vezes com solução salina e homogeneizados individualmente. Os parasitos que permaneceram ligados ao intestino foram contados em câmara de Neubauer. Alguns intestinos de *S. calcitrans* da interação com *Leishmania* não foram macerados, sendo colocados em lâminas de vidro em uma gota de PBS e observados em microscópio óptico acoplado à câmera fotográfica.

3.4 Ensaios *in vivo*

Para ensaios *in vivo*, moscas de colônia, nunca antes alimentadas com sangue, foram alimentadas artificialmente com sangue bovino citratado, com soro inativado por calor, contendo *Leishmania infantum chagasi* 1×10^7 por mL por 60 minutos. Após 30 minutos do término da alimentação, as moscas foram dissecadas, os intestinos homogeneizados e o número de parasitos foi estimado em câmara de Neubauer.

4.2. Interação *in vivo* de *S. calcitrans* e *L. infantum chagasi*

O número médio de parasitos por intestino foi de 6×10^3 . Após 30 minutos do fim da alimentação.

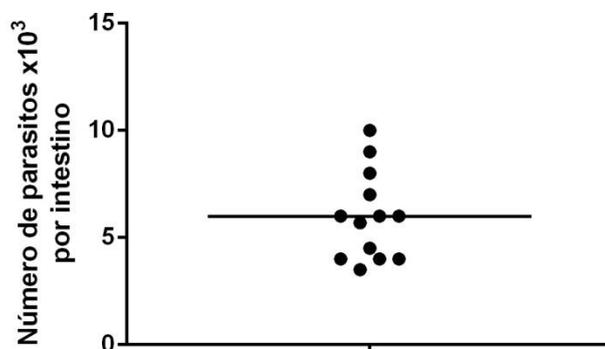


Figura 26: Interação *in vivo* entre *S. calcitrans* de colônia e *L. infantum chagasi*.

5 DISCUSSÃO

O papel de *S. calcitrans* como vetor mecânico de diversos agentes infecciosos é bem reconhecido. A capacidade desse organismo em transmitir esses patógenos aparentemente é relacionada ao seu hábito alimentar persistente e agressivo, que o leva a se alimentar seguidamente em outro animal próximo, após ser espantado de um primeiro hospedeiro.

Na literatura já foram descritas transmissão e transferência de agentes infecciosos de um hospedeiro para outro, ou para outras superfícies por *S. calcitrans*. Como o protozoário *B. besnoiti* que foi transferido para sangue livre de parasito após a mosca se alimentar em hospedeiro infectado (LIÉNARD et al., 2013). Berberian descreveu transmissão de leishmaniose cutânea de um hospedeiro infectado para um voluntário infectado a partir das picadas da mosca-dos-estábulo.

O gênero *Leishmania* apresenta parasitos heteroxênicos que infectam hospedeiro vertebrado e invertebrado ao longo do seu ciclo de vida. No inseto invertebrado *Leishmania* sp. passa por diversos estágios evolutivos essenciais para sua transmissão bem sucedida para outro hospedeiro vertebrado. As relações observadas na transmissão biológica de *Leishmania* incluem vetores permissivos e vetores restritivos. Os vetores restritivos são aqueles que só se infectam e transmitem espécies específicas de *Leishmania*, como o exemplo: *Phlebotomus papatasi* com *L. major* e *L. turanica*. Essas duas espécies de *Leishmania* têm em comum o fato da porção final do LPG ser formada por resíduos de β -galactosil (VOLF et al., 2014), o que indica que nesse tipo de relação o LPG é um componente muito importante dessa interação (NOGUEIRA et al., 2017). Porém em vetores permissivos não foram identificadas características moleculares que determinem a interação.

Trabalhos recentes demonstram que vetores permissivos apresentam o intestino colonizado por protozoários, é o caso de *P. perniciosus* e *P. tobbi*, que possuem em pelos 60% dos casos mais de 1000 parasitos da espécie *L. tropica* colonizando seus intestinos, após dois dias da infecção inicial (VASELEK e VOLF, 2019). Esses números são compatíveis aos encontrados no vetor restritivo *P. sergenti*. Considerando a existência de vetores permissivos e o relato de *S. calcitrans* transmitindo *L. tropica*, o presente trabalho teve como objetivo investigar se *Leishmania* sp é capaz de interagir com intestino da mosca-dos-estábulo. Nossos resultados demonstraram uma ligação *in vitro* com a maior média de parasitos por intestino na interação *L. infantum chagasi* e *S. calcitrans* coletadas no campo, de 4700 parasitos por intestino. A média na interação com *L. amazonensis* foi de 3100 e 2900 parasitos por intestino para moscas de colônia e do campo respectivamente. Não sabemos quais são os fatores que podem mediar essa interação, se há interação específica do protozoário com o intestino da mosca ou se é uma ligação inespecífica, é necessário esclarecer esse mecanismo.

Na alimentação artificial foi possível observar que *L. infantum chagasi* não morreu em contato com sangue bovino, e após 30 minutos do final da alimentação havia parasitos vivos no intestino da mosca. É necessário esclarecer por quanto tempo esses parasitos, até em dias, permanecem viáveis após a aquisição dos mesmos pela alimentação sanguínea. Em relação a tripanomatídeos e *S. calcitrans*, experimentos em que as moscas se alimentaram em ovinos infectados com *T. vivax*, demonstraram formas tripomastigotas em 100% dos intestinos dissecados das moscas até 25 minutos após a alimentação. A partir desse tempo o número de moscas positivas para tripanosomas diminuiu, chegando a 33% após 8 horas da alimentação, tempo máximo acompanhado (SERRA-FREIRE; REZENDE, 1988). Juntos esses resultados demonstram a capacidade de interação entre esses parasitos e *S. calcitrans*, mais estudos são necessários para esclarecer o papel que esse inseto pode representar na transmissão dessa

infecção. Ensaios para observar se a mosca alimentada artificialmente com sangue contendo *Leishmania* sp pode transmitir ou transferir os parasitos pela probólide deverão ser realizados.

Apesar de seu claro papel como vetor mecânico, é necessário aprofundar como essa mosca se relaciona com patógenos quando está infectada, se ela é capaz de combatê-los ou se e como os mesmos se desenvolvem no seu organismo, o esclarecimento dessas interações é importante para entender a importância que *S. calcitrans* tem na transmissão de doenças e buscar estratégias para bloqueá-las.

3 CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho descreveu a instalação de uma colônia de *Stomoxys calcitrans* na UFRRJ. A partir das moscas geradas na colônia foi possível realizar a descrição morfológica das glândulas salivares da mosca-dos-estábulos, além da caracterização histológica, ultraestrutural e a composição lipídica. Essas informações reunidas devem auxiliar a esclarecer como esse órgão pode atuar na dinâmica de transmissão de patógenos, além de questões relacionadas à biologia e alimentação da mosca. Os dados da interação de *S. calcitrans* com *Leishmania* sp nos levam a concluir que essa relação deve ser melhor investigada para de fato contribuir como modelo com dados sobre a transmissão de patógenos por esse importante vetor.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, T. S. Hematophagy and hormone release. **Ann. Ent. Soc. Am.**, v.92, p.1–13, 1999.
- ARAÚJO, T. Presença de *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale* em *Stomoxys calcitrans*, mosca-dos-estábulo, no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **TESE DE MESTRADO** (Programa de Pós-graduação em Ciências veterinárias, UFRRJ), 47 p, 2019.
- AKSOY, S., GIBSON, W. C., LEHANE, M. J. Perspectives on the interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. **Advances in Parasitology**. v.53, p.1–84, 2003.
- AZEVEDO, D. O., ZANUNCIO, J. C., ZANUNCIO, L. S., MARTINS, G. F., MARQUES-SILVA, S., SOSSA, M. F., *et al.* E. Biochemical and Morphological Aspects of Salivary Glands of the Predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Archives of biology and Technology**. v.50, p.469-477, 2007.
- AZEVEDO, L. H., FERREIRA, M. P., CASTILHO, R. C., CANÇADO, P. H., MORAES G. J. Potential of *Macrocheles* species (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae) as control agents of harmful flies (Diptera) and biology of *Macrocheles embersoni* Azevedo, Castilho and Berto on *Stomoxys calcitrans* (L.) and *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Biological Control**. v.123, p.1–8, 2018.
- 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.
- BATISTA, J. S., BEZERRA, F. S. B., LIRA, R. A., CARVALHO, J. R. G., ROSADONETO, A. M., PETRI, A. A., *et al.* Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.** v.28, p.63-69, 2008.
- 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.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** v.37, p.911-917, 1959.
- BOULANGER, N., MUNKS, R. J. L., HAMILTON, J. V., VOVELLE, F., BRUN, R., LEHANE, M. J., BULET, P. A Novel Antimicrobial Peptide With Antiparasitic Activity in

the Blood-sucking Insect *Stomoxys calcitrans*. **The Journal of Biological Chemistry**. v.277, p. 49921–49926, 2002.

BOULANGER, N., LOWENBERGER, C., VOLF, P., URSIC, R., SIGUTOVA, L., SABATIER, L. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infect Immun**. v.72, p.7140–7146, 2004.

BOWMAN, D. D. Parasitologia veterinária de Georgis. 8ª edição, **Barueri SP: Manole**, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010**

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

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.

BULET, P., STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein Pept Lett**. v.12, p.3–11, 2005.

CAMPBELL, J. B., SKODA, S. R., BERKEBILE, D. R., BOXLER, D. J., THOMAS, G. D., ADAMS, D. C., *et al.* 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., JOUNI, Z. E., KARNAS, K. J., PENNINGTON, J. E., WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. **Annu. Rev. Nutr**. v 21, p.23-46, 2001.

CANNET, A., AKHOUNDI, M., BERENGER, J. M., MICHEL, G., MARTY, P., DELAUNAY, P. A review of data on laboratory colonies of bed bugs (Cimicidae), an insect of emerging medical relevance. **Parasite**. v.22, p.1-7, 2015.

CARREGARO, V., RIBEIRO, J. M., VALENZUELA J. G., SOUZA-JÚNIOR, G. L., COSTA, D. L., OLIVEIRA, C. J., *et al.* Nucleosides Present on Phlebotomine Saliva Induce Immunossuppression and Promote the Infection Establishment. **Plos Negl Trop Dis**. v. 9, p.01-21, 2015.

CHAGAS-LIMA, A. C., PEREIRA, M. G., FAMPA, P., LIMA, M. S., KLUCK, G. E., ATELLA, G. C. Bioactive lipids regulate *Trypanosoma cruzi* development. **Parasitology Research**. v.118, p.2609-2619, 2019.

CHELBI, I., ZHIOUA, E. Establishment, Maintenance of *Phlebotomus* spp. in the Laboratory, and Infection with *Leishmania* spp. **Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature**, Capítulo 19, 2019.

CHINO, H. Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin. **Oxford: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v.10, p.115-134, 1985.

CHRISTMAS, P. E. Laboratory rearing the biting fly *Stomoxys calcitrans*, p. 446 – 449, 1970.

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

CUGLOVICI, D. A., BARTHOLOMEU, D. C., REIS-CUNHA, J. L., CARVALHO, A. U., RIBEIRO, M. F. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v, 169, p.320–326, 2010.

DALLAI, R., MERCATI, D., MASHIMO, Y., MACHIDA, R., BEUTEL, R. G. The morphology and ultrastructure of salivary glands of Zoraptera (Insecta). **Arthropod Structure & Development**. v.46, p 508-517, 2017.

DAY, M. F. The Mechanism of Secretion by the Salivary Gland of the Cockroach *Periplaneta americana* (L.). **Division of Entomology, C.S.I.R.O**, 1950.

DE CASTRO, B. G., DE SOUZA M. M., BITTENCOURT, A. J. Isolation of enterobacterial species in *Stomoxys calcitrans*. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.38, p.2654-2657, 2008.

DE MOURA, T. R., OLIVEIRA, O., CARNEIRO, M. W., MIRANDA, J. C., CLARÊNCIO, J., BARRAL-NETTO, M., *et al.* Functional Transcriptomics of Wild-Caught *Lutzomyia intermedia* Salivary Glands: Identification of a Protective Salivary Protein against *Leishmania braziliensis* Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.7 , 2013.

DOTY, A. E. Convenient method of rearing the Stable fly. **Journal of Economic Entomology**, v.30, p.367-369, 1937.

DOYLE, M. S., SWOPE, B. N., HOGSETTE, J. A., BURKHALTER, K. L., SAVAGE, H. M., NASCI, R. S. Vector competence of the stable fly (Diptera: Muscidae) for West Nile virus. **Journal of Medical Entomology**. v,48, p,656–668, 2011.

FERREIRA, M. G., FATTORI, K. R., SOUZA, F., LIMA, V. M. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet Parasitol**. v.165, p.150–154, 2009.

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.

GILLES, J., DAVID, J. F., DUVALLET, G. Temperature Effects on Development and Survival of Two Stable Flies, *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* (Diptera: Muscidae), in La Re´union Island. **J. Med. Entomol.** v.42, p.260-265, 2005.

GOLODNE, D. M., MONTEIRO, R. Q., GRAÇA-SOUZA, A. V., SILVA-NETO, M. A., ATELLA, G. C. Lysophosphatidylcholine Acts as an Anti-hemostatic Molecule in the Saliva of the Blood-sucking Bug *Rhodnius prolixus*. **The Journal of Biological Chemistry.** v.278, p.27766-27771, 2003.

GUIMARÃES, J. H. Mosca dos est´abulos – uma importante praga do gado. **Agroquímica Ciba – Geigy**, v.23, p.10-14, 1984.

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., DE BARROS, A. T., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P. H., *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.** v.23, p.150-156, 2014.

HALL, L. R., TITUS, R. G. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **Journal of Immunology.** v.155, p.3501-3506, 1995.

HANSENS, E. The Stable Fly and Its Effect on Seashore Recreation Areas in New Jersey. **Journal Serie N. J. Experimental Station**, 1951.

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.

HU, Y. J., AKSOY, S. An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. **Insect Biochem Molec.** v.35, p.105–115, 2005.

HULTMARK, D., STEINER, H., RASMUSON, T., BOMAN, H. G. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **Eur J Biochem.** v.106, p.7–16, 1980.

IBGE <http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017>
CGEA/DCEE/SPA/MAPA [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica
agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica_agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros), acesso em agosto de 2019

- JAYNES, J. M., BURTON, C. A., BARR, S. B., JEFFERS, G. W., JULIAN, G. R., WHITE, K. L. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. **Faseb J.** v.2, p.2878–2883, 1988.
- JONES, C. J., MILNE, D. E., PATTERSON, R. S., SCHREIBER, E. T., MILIO, J. A. Nectar Feeding by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae): Effects on Reproduction and Survival. **Environmental Entomology.** v. 21, p.141-147, 1992.
- JOZEFIAK, A., ENGBERG, R. M. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. **J. Anim. Feed Sci.** v.26, p.87–99, 2017.
- KAHANA-SUTIN, E., KLEMENT, E., LENSKY, I., GOTTLIEB, Y. High relative abundance of the stable fly *Stomoxys calcitrans* is associated with lumpy skin disease outbreaks in Israeli dairy farms. **Medical and Veterinary Entomology.** v.31, p.150-60, 2017.
- KAMHAWI, S., BELKAID, Y., MODI, G., ROWTON, E., SACKS, D. Protection Against Cutaneous Leishmaniasis Resulting from Bites of Uninfected Sand Flies. **Science.** v.290, p.1351-1354, 2000.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **TRENDS in Parasitology.** v.22, p.439-445, 2006.
- KAWOOYA, J. K., LAW, J. H. Role of lipophorin transport to the insect egg. **J. Biol. Chem.** v.263, p.8748-8753, 1988.
- KINN, D. N. Predation by the Mite, *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina: Macrochelidae), on Three Species of Flies. **J. Med. Ent.** v.3, p.155-158, 1966.
- KULKARNI, M. M., MCMASTER, W. R., KAMYSZ, E., KAMYSZ, W., ENGMAN, D. M., MCGWIRE, B. S. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. **Mol Microbiol.** v.62, p.1484–1497, 2006.
- LEHANE, M. J. The formation and histochemical structure of the peritrophic membrane in the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. **J. Insect Physiol.** v.22, p.1551-1557, 1976.
- LEHANE, M. J., WU, D., LEHANE, S. M. Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.94, p.502-507, 1997.
- LEHANE, M. The Biology of Blood-Sucking in Insects. **Cambridge University press** 2ª edição, 2005.
- LIÉNARD, E., SALEM, A., JACQUIET, P., GRISEZ, C., PRÉVOT, F., BLANCHARD, B., *et al.* Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Parasitol Res.** v.112, p.479-486, 2013.

- MANS, B. J. Evolution of Vertebrate Hemostatic and Inflammatory Control Mechanisms in Blood-Feeding Arthropods. **J Innate Immun**, v.3, p.41-51, 2011.
- MARCONDES, C. B. Entomologia Médica veterinária. **São Paulo: Editora Atheneu**, 2001.
- MESQUITA, R. D., CARNEIRO, A. B., BAFICA, A., GAZOS-LOPES, F., TAKIYA, C. M., SOUTO-PADRON, T.; *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. **Infect Immun**. v.76, p.5543-5552, 2008.
- MIHOK, S., MARAMBA, O., MUNYOKI, E., KAGOIYA, J. Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxiinae (Diptera: Muscidae). **Tropical Medicine and Parasitology**. v.46, p.103-105, 1995.
- MILLER, N., LEHANE, M. J. In vitro perfusion studies on the peritrophic membrane of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae). **J. Insect Phys.** v.36, p.813-818, 1990.
- MOCKFORD, E. L. Psocoptera from the dusky-footed wood rat in southern California (Psocoptera: Atropidae, Psoguillidae, Liposcelidae). **Pan-Pacific Entomologist**. v.47, p.127-140, 1971.
- MONTEZANO, D. G., HUNT, T. J., SPECHT, A., LUZ, P. M., PETERSON, J. A. Life-History Parameters of *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) Under Laboratory Conditions. **Journal of Insect Science**. v.19, p.1-8, 2019.
- MORAES, A. P. R. *Stomoxys calcitrans*: Estabelecimento de colônia e efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos. **Dissertação (Mestrado em ciências) – Ciências Veterinárias**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 65 pag, 2007
- MORAES, A. P., ANGELO, I. C., FERNANDES, E. K., BITTENCOURT, V. R., BITTENCOURT, A. J. Virulence of *Metarhizium anisopliae* to Eggs and Immature Stages of *Stomoxys calcitrans*. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.1149, p.384-387, 2008.
- MRAMBA, F., BROCE, A. B., ZUREK, L. Vector competence of stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae), for *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Vector Ecology**. v.32, p.134-139, 2007.
- 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. **Medical and Veterinary Entomology**. v.20, p 122-137, 2006.
- NOGUEIRA, P. M., GUIMARÃES, A. C., ASSIS, R. R., SADLOVA, J., MYSKOVA, J., PRUZINOVA, K., *et al.* Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect *Leishmania amazonensis* development in the permissive vectors *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. **Parasites & Vectors**. v. 608, p.1-10, 2017.

- OLIVEIRA, C. D., ASSUNÇÃO, R. M., REIS, I. A., PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**. v.17, p. 231-1239, 2001.
- OLIVEIRA, J. B., MONTOYA, J., ROMERO J. J., URBINA, A., SOTO-BARRIENTOS, N., MELO, E.S., et al. Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. **Veterinary Parasitology**. v.177, p.359-365, 2011.
- ONGEY, E. L., PFLUGMACHER, S., NEUBAUER, P. Bioinspired designs, molecular premise and tools for evaluating the ecological importance of antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, 11, 68, 2018
- OOR. C. W., HUDSON, A., WEST A. S. The Salivary Glands of *Aedes aegypti* Histological-Histochemical Studies. **Can. J. Zool**. v.39, p.265-272, 1961.
- OTVOS, L. Antibacterial peptides isolated from insects. **J Pept Sci**. v.6, p.497-511, 2000.
- PARK, C. B., KIM, H. S., KIM, S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin ii: Buforin ii kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochem Biophys Res Commun**. v.244, p.253–257, 1998.
- REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 883p. 2013.
- RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: Live syringes or invertebrate pharmacologists. **Infect Agents Dis**, v.4, p.143-152. 1995.
- RIBEIRO, J. M. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Med Vet Entomol**, v.14, p.142-148, 2000.
- RIBEIRO, J. M., FRANCISCHETTI, M. B. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annu. Rev. Entomol**. v.48, p.73–88, 2003.
- RODRÍGUEZ, N. F., TEJEDOR-JUNCO, M. T., GONZÁLEZ-MARTÍN, M., GUTIERREZ, C. *Stomoxys calcitrans* as possible vector of *Trypanosoma evansi* among camels in an affected area of the Canary Islands, Spain. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 47(4):510-512, Jul-Aug, 2014.
- SALEM, A., FRANC, M., JACQUIET, P., BOUHSIRA, E., LIÉNARD, E. Feeding and breeding aspects of *Stomoxys calcitrans* (diptera: muscidae) under laboratory conditions. **Parasite**, v.19, p.309-317, 2012.
- SCHIMIDT, C. D., KUNZ, S. E. *Testing Immature Laboratory-reared Stable Flies and Horn Flies for Susceptibility to Insecticides*. **Journal of Economic Entomology**, v. 73, out 1980.
- SCOLES, G. A., BROCE, A. B., LYSYK, T. J., PALMER, G. H. Relative Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by

Dermacentor andersoni (Acari: Ixodidae) Compared with Mechanical Transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **J. Med. Entomol.** v.42, p.668-675, 2005.

SERIGATI, F. *A agricultura puxa o PIB? Agroanalysis*, 2013.

SERRA-FREIRE, N. M., REZENDE, A. M. *Stomoxys calcitrans*, um vetor mecânico do *Trypanosoma vivax* no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor. **Arquivos da Universidade Rural do Rio de Janeiro.** v.11, p.77- 82, 1988.

SHAPIRO, J. P., LAW, J. H., WELLS, M. A. Lipid transport in insects. **Ann. Rev. Entomol.** v.33, p.297-318, 1988.

SHEN, W., HE, P., XIAO, C., CHEN, X. From Antimicrobial Peptides to Antimicrobial Poly (-amino acid)s. **Adv. Healthc. Mater.** 1, 1800354.

STIEBLER, R., SOARES, J. B., TIMM, B. L., SILVA, J. R., MURY, F. B., DANSA-PETRETSKI, M.; *et al.* On the mechanisms involved in biological heme crystallization. **J Bioenerg Biomembr.** v.43, p.93-99, 2011.

SWIST, S. L., WILKERSON, M. J., WYATT, C. R., BROCE, A. B., KANOST, M. R. Modulation of Bovine Lymphocyte Response by Salivary Gland Extracts of the Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v.39, p.900-907, 2002.

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.

TOLOSA, E. M., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O. A., NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia: normal e patológica. **Editora Malone**, São Paulo, 2003.

TRAVERSA, D., OTRANTO, D., IORIO, R., CARLUCCIO, A., CONTRI, A., PAOLETTI, B., *et al.* Identification of the intermediate hosts of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* under field conditions. **Medical and Veterinary Entomology**, 22, 283–287, 2008.

TROTTA, M., NICETTO, M., FOGLIAZZA, A., MONTARSI, F., CALDIN, M., FURLANELLO, T., *et al.* Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. **Ticks Tick Borne Dis.** v.3, p.293-296, 2012.

TULLOCH, F. *The Internal Anatomy of Stomoxys*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, v. 77, n. 521 p. 523-531, 1906.

TURELL, M. J., KNUDSON, G. B. Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). **Infection and Immunity.** v.55, p.1859–1861, 1987.

VASELEK, S., VOLF, P.; Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus tobbi* with different *Leishmania tropica* strains. **International Journal for Parasitology** . v.49, p. 831–835, 2019.

VIOL, M, A.; GUERRERO, F. D., DE OLIVEIRA, B. C., DE AQUINO, M. C., LOIOLA, S. H., DE MELO, G. D., *et al.* Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. **Parasitol Res.** v.115, p. 3479-3484, 2016.

VOLF, P., NOGUEIRA, P. M., MYSKOVA, J., TURCO, S. J., SOARES, R. P. Structural comparison of lipophosphoglycan from *Leishmania turanica* and *L. major*, two species transmitted by *Phlebotomus papatasi*. **Parasitol Int.** v.63, p.683-686, 2014.

WANG, X., RIBEIRO, J. M., BROCE, A. B., WILKERSON, M. J., KANOST, M. R. *An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, Stomoxys calcitrans.* **Insect Biochem Mol Biol**, v, 39, n. 9, p. 01-21, set. 2009.

YEAMAN, M. R., YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol. Rev.** V.55, p.27–55, 2003.

YI, H.; CHOWDHURY, M., HUANG, Y., YU, X. Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.98 p.5807-5822, 2014.

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

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.