

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

*Stomoxys calcitrans*: primeira identificação de infecção  
natural por *Herpetomonas muscarum*, aspectos de sua  
interação e caracterização de hemócitos circulantes

Dayana Palmeira da Silva Rosa

Agosto, 2022



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

*Stomoxys calcitrans*: primeira identificação de infecção  
natural por *Herpetomonas muscarum*, aspectos de sua  
interação e caracterização de hemócitos circulantes

DAYANA PALMEIRA DA SILVA ROSA

*Sob a Orientação de*

PATRÍCIA FAMPA NEGREIROS LIMA

*Coorientação*

LUCIA HELENA PINTO DA SILVA

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

Seropédica  
Agosto de 2022



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



ATA Nº 6306/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.077135/2022-18

Seropédica-RJ, 20 de dezembro de 2022.

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

**DAYANA PALMEIRA DA SILVA ROSA**

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

TESE APROVADA EM 31/08/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese.

*(Assinado digitalmente em 20/12/2022 19:51)*

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

*(Assinado digitalmente em 21/12/2022 11:01)*

DANIELA COSENTINO GOMES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DBQ (11.39.00.24)  
Matricula: ###455#0

*(Assinado digitalmente em 20/12/2022 15:20)*

PATRICIA FAMPA NEGREIROS LIMA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIORDCFar  
(12.28.01.00.00.00.47)  
Matricula: ###921#5

*(Assinado digitalmente em 21/12/2022 18:52)*

DANIELE PEREIRA DE CASTRO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.801-##

*(Assinado digitalmente em 22/12/2022 17:52)*

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

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **6306**, ano: **2022**, tipo: **ATA**, data de emissão: **20/12/2022** e o código de verificação: **209dc11b6f**

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

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

R788s Rosa, Dayana Palmeira da Silva , 1992-  
Stomoxys calcitrans: primeira identificação de  
infecção natural por Herpetomonas muscarum, aspectos  
de sua interação e caracterização de hemócitos  
circulantes / Dayana Palmeira da Silva Rosa. - Barra  
do Piraí, 2022.  
101 f.: il.

Orientadora: PATRÍCIA FAMPA NEGREIROS LIMA.  
Coorientadora: LUCIA HELENA PINTO DA SILVA.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciência  
Veterinárias, 2022.

1. vetores mecânicos. 2. sistema imune. 3.  
tripanossomatídeos monoxênicos. 4. pecuária. I. LIMA,  
PATRÍCIA FAMPA NEGREIROS , 1976-, orient. II. SILVA,  
LUCIA HELENA PINTO DA , 1975-, coorient. III  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinárias. IV.  
Título.

*Dedico esse trabalho primeiramente a Lis, que sempre será o  
maior motivo de tudo.*

*E em segundo lugar, a todos os pesquisadores que se mantiveram  
firmes e confiantes, mesmo diante de toda a desvalorização e as  
incertezas que tivemos nos últimos anos.*

*“Mucha gente pequeña, en lugares pequeños, haciendo cosas  
pequeñas, puede cambiar el mundo.”*

Eduardo Galeano

## **BIOGRAFIA**

Dayana Palmeira da Silva Rosa, filha de Sônia Maria Palmeira da Silva Rosa e Adilson da Silva Rosa e mãe de Lis Rosa Bertuci, nascida em 22 de setembro de 1992 na cidade de Barra do Piraí, RJ. Em março de 2010 iniciou sua graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-a em dezembro de 2013. Durante o ano de 2013 foi estagiária no Laboratório de Anatomia Vegetal, estudando Aspectos morfológicos e anatômicos de galhas foliares de espécies de Meliaceae. Durante a graduação participou de eventos científicos e publicou trabalhos em anais de eventos. No ano de 2016 foi aprovada no processo de seletivo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, como aluna de mestrado do Laboratório de Parasitos e Vetores, sob a orientação da professora Patrícia Fampa e do professor Douglas Siqueira. No ano de 2018 foi aprovada no processo seletivo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, como aluna de doutorado do mesmo Laboratório do mestrado, sob a orientação da Dra. Patrícia Fampa e da Dra. Lúcia . Durante a vida acadêmica participou e apresentou trabalhos em congressos, simpósios e cursos de aperfeiçoamento.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por não permitir que eu me sentisse sozinha em absolutamente nenhum momento da minha história.

A Lis, cuja existência já me dá motivos suficientes para ser melhor a cada dia.

Ao meu marido Leonardo, por acreditar mais em mim do que eu mesmo, e ser o melhor companheiro que eu poderia ter.

Aos meus pais, por me ensinarem sempre o caminho certo e por serem a minha segurança em qualquer etapa da minha caminhada. Devo a vida a vocês.

A minha irmã, por confiar tanto em mim, e por quem eu firmei o propósito de nunca desistir.

Aos meus sogros, que são incasáveis em todo o auxílio e ajuda, em absolutamente tudo que necessitamos.

A minha família, que mesmo com toda a correria, é força e sorrisos nos momentos que mais preciso.

Aos meus amigos íntimos, que me ouviram, apoiaram, incentivaram e enfrentaram cada momento ao meu lado. Seja via whatsapp ou presencialmente. A vida só é vivida quando se tem amigos.

A minha equipe do Laboratório de Parasitos e Vetores. Tudo só foi possível porque tive vocês me auxiliando. Em particular a Karina e Melissa, que estiveram comigo, compartilhando o laboratório e a vida.

A Paty, minha orientadora e amiga, que acreditou em mim e ainda acredita. E que me direcionou toda sua confiança, em um momento em que sei que poucos fariam.

A Lúcia, minha coorientadora, por toda a gentileza e ajuda imprescindível nesse trabalho.

A minha querida Helena, que me revelou o mundo da pesquisa com todo o amor, e com quem aprendi lições para toda uma vida.

A equipe do Laboratório de Imunologia e Virologia da UFRRJ, que sempre me recebe de braços e sorrisos abertos.

Ao pesquisador Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto, do Laboratório de Biologia Celular da FIOCRUZ, por toda a paciência e ajuda com as amostras para microscopia.

A pesquisadora Helena Lúcia Carneiro Santos, do Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, FIOCRUZ, pela ajuda com a identificação do tripanossomatídeo.

As pesquisadoras Elzira Saraiva e Natália Rocha Nadaes, do Laboratório de Biofísica da UFRJ, pelo auxílio com os ensaios de ET.

A professora Aparecida Alves do Nascimento, do DBA do ICBS/UFRRJ por todo auxílio com materiais histológicos.

Aos funcionários da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz da UFRRJ, em especial ao Zeca, sempre prontos para ajudar no que fosse necessário.

Ao querido boi Abacaxi, por tanta fofura nos meus dias e contribuição para a realização das nossas pesquisas.

Agradeço a banca, por disponibilizar seu tempo e conhecimento em prol da avaliação e melhora do meu trabalho.

Agradeço o curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

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



## RESUMO

ROSA, Dayana Palmeira da Silva. ***Stomoxys calcitrans*: primeira identificação de infecção natural por *Herpetomonas muscarum*, aspectos de sua interação e caracterização de hemócitos circulantes**. 2022. 101 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

*Stomoxys calcitrans* é um díptero cosmopolita e hematófago. Seu hábito alimentar é definido como agressivo e persistente, tendo como hospedeiros diferentes espécies de sangue quente. É considerada uma praga de importância econômica de gado e outros animais, reduzindo o peso e produção de leite em criações. Nos ambientes de criação, os integrantes do gênero *Stomoxys* possuem papel importante na epidemiologia de doenças transmissíveis, sendo vetores mecânicos de diversos agentes patogênicos. Conhecer e compreender os componentes celulares do sistema imune dessa mosca e a relação do organismo de *S. calcitrans* com os patógenos que transmite é fundamental para esclarecer as vias envolvidas nessas interações, identificando os melhores alvos de pesquisa para desenvolvimento de técnicas de controle dessa praga pecuária. Dessa maneira, neste trabalho isolamos e contabilizamos o número de hemócitos circulantes em diferentes fases evolutivas dessa mosca, identificando maiores populações nos indivíduos de campo avaliados. A partir do isolamento, pudemos identificar e caracterizar esses hemócitos em quatro tipos, sendo eles: prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos e oenocitóides. Os prohemócitos foram as células em menor quantidade nas avaliações, e os plasmatócitos foram as células mais abundantes. Diante do enfrentamento de uma infecção experimental por *Herpetomonas muscarum*, o tempo de maior resposta hemocitária foi duas horas após a injeção do tripanossomatídeo. De maneira geral, as população dos diferentes tipos de hemócitos aumentaram pós infecção, com exceção dos prohemócitos, que sofreram uma baixa. Também foi avaliada a produção de ETs por *S. calcitrans* estimulada com LPS, onde foi possível identificar a liberação de DNA após estímulo. Identificamos a presença de um parasito na hemolinfa de *S. calcitrans* em indivíduos do campo, larvas em laboratório e adultos gerados em colônia. O mesmo foi isolado e identificado a nível de espécie por sequenciamento de DNA, sendo ele o tripanossomatídeo denominado *H. muscarum*. Para avaliar seus aspectos de interação com seu hospedeiro, realizamos inicialmente, sua curva de crescimento buscando entender seu desenvolvimento e identificar os melhores tempos para ensaios laboratoriais. A interação desse parasito foi avaliada a nível intestinal, por experimentos *in vivo* e *ex vivo*, demonstrando que o mesmo é capaz de interagir e se fixar no intestino mesmo após algumas horas de interação. Por fim, avaliamos aspectos de desenvolvimento da mosca dos estábulos infectada oralmente com *H. muscarum*. A longevidade dos indivíduos não foi alterada significativamente, assim como sua oviposição. Porém, a viabilidade dos ovos foi afetada, diminuindo assim a eclosão dos mesmos e, conseqüentemente prejudicando o desenvolvimento de larvas em pupas e pupas em indivíduos adultos. Dessa maneira, a reprodução de *S. calcitrans* é afetada quando a mesma sofre infecção por *H. muscarum*. Mais avaliações devem ser realizadas, para maior entendimento das reações hemocitárias de *S. calcitrans*, mas esse trabalho já elucida tipos de hemócitos presentes na sua circulação e métodos de extração dos mesmos. Já as interações da mosca com o tripanossomatídeo revelam um potencial para duas vertentes, sendo elas: (1) utilização do tripanossomatídeo como forma de controle de população de *S. calcitrans*; (2) utilização desses organismos como modelo experimental para o entendimento da relação de dípteros com os tripanossomatídeos que os infectam, através de ensaios laboratoriais.

Palavras chave: vetores mecânicos, sistema imune, tripanossomatídeos monoxênicos.

## ABSTRACT

ROSA, Dayana Palmeira da Silva. ***Stomoxys calcitrans*: first identification of natural infection by *Herpetomonas muscarum*, aspects of its interaction and characterization of circulating hemocytes**. 2022. 101 p. Thesis (Doctorate of Veterinary Science). Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

*Stomoxys calcitrans* is a cosmopolitan and hematophagous dipteran. Its feeding habit is defined as aggressive and persistent, having different warm-blooded species as hosts. It is considered a pest of economic importance to cattle and other animals, causing reduction of the weight and milk production in livestock. In rearing environments, members of the genus *Stomoxys* play an important role in the epidemiology of transmissible diseases, being mechanical vectors of several pathogens. Knowing and understanding the cellular components of the fly's immune system and the relationship between the *S. calcitrans* organism and the pathogens it transmits is essential to clarify the pathways involved in these interactions, identifying the best research targets for the development of control techniques for this livestock pest. Thus, in this work we isolated and quantified the number of circulating hemocytes in different evolutionary phases of the fly, identifying larger populations in the evaluated field individuals. From the isolation, we were able to identify and characterize these hemocytes in four types, namely: prohemocytes, granulocytes, plasmatocytes and oenocytoids. Prohemocytes were in the lower number of cells in the assays, and plasmatocytes were the most abundant cells. Responding to an experimental infection by *Herpetomonas muscarum*, the time of greatest hemocytic response occurred at two hours after the injection of trypanosomatid. In general, the populations of different types of hemocytes increased after infection, with the exception of prohemocytes, which decreased. The production of extracellular traps (ETs) by *S. calcitrans* stimulated with LPS was also evaluated, being possible to identify the release of DNA after stimulation. We identified the presence of a parasite in the hemolymph of *S. calcitrans* in individuals from the field, larvae in the laboratory and adults generated in a colony. It was isolated and identified at the species level by DNA sequencing, being the trypanosomatid called *H. muscarum*. To evaluate its interaction aspects with its host, we initially performed its growth curve to understand its development and identify the best times for laboratory tests. The interaction of this parasite was analyzed at the intestinal level, by *in vivo* and *ex vivo* experiments, demonstrating that it is able to interact and settle in the intestine even after a few hours of interaction. Finally, we evaluated developmental aspects of the stable fly infected orally with *H. muscarum*. The longevity of individuals was not significantly altered, as well as their oviposition. However, the viability of the eggs was affected, thus reducing their hatching and, consequently, impairing the development of larvae in pupae and pupae in adult individuals. Thus, the reproduction of *S. calcitrans* is affected when it is infected by *H. muscarum*. More evaluations should be carried out, for a better understanding of the hemocytic reactions of *S. calcitrans*, but this work already elucidates the types of hemocytes present in its circulation and methods of their extraction. The interactions of the fly with the trypanosomatid reveal a potential use in two aspects, namely: (1) use of the trypanosomatid for controlling the population of *S. calcitrans*; (2) use of these organisms as an experimental model for understanding the relationship between dipterans and the trypanosomatids that infect them, through laboratory tests.

Keywords: mechanical vectors, immune system, monoxenic trypanosomatids

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo de vida de *Stomoxys calcitrans*. Imagem sem padrão de escala. Fonte: autoria própria.....9
- Figura 2:** Sexagem de *Stomoxys calcitrans* baseada no posicionamento dos olhos. **A** – Machos com olhos holópticos; **B** – Fêmeas com olhos dicópticos. Fonte: Acervo pessoal.....9
- Figura 3:** Árvore representativa da filogenia do grupo Trypanosomatidae, baseada em sequências de rRNA 18S. Grupos destacados em retângulos inteiros sendo dixênicos e grupos destacados em retângulos descontínuos sendo os de estudos em desenvolvimento. Fonte: FROLOV et al.; 2021.....13
- Figura 4:** Distribuição de diferentes gêneros de tripanossomatídeos no trato digestivo dos insetos. **(A)** Esquematização do sistema digestivo dos insetos. **(B)** Corte transversal do intestino médio. **(C)** Exemplos de vias de desenvolvimento com localizações únicas e múltiplas. **(D–G)** Localização de tripanossomatídeos em diferentes ordens de insetos. ? - indicando localização desconhecida desses gêneros. Fonte: FROLOV et al.; 2021.....15
- Figura 5:** Mecanismos possíveis de transmissão de tripanossomatídeos monoxenos e fitomonas, entre insetos. **A** – Esquematização de canibalismo, predação, necrofagia, injeção de saliva, transovariana, coprofagia e contaminação de substrato; **B** – Esquematização da transmissão transovum. Fonte: Adaptado de FROLOV et al., 2021 e DIAS et al., 2014, respectivamente.....16
- Figura 6:** Concentração de parasitos encontrados nas diferentes formas evolutivas de *Stomoxys calcitrans* (larva e adulto de colônia) contados em câmara de Neubauer.....25
- Figura 7:** Desenho esquemático da forma evolutiva Opimastigota, encontrada sob observação dos parasitos isolados da hemolinfa de *S. calcitrans*. Fonte: Autoria própria.....26
- Figura 8:** *Herpetomonas muscarum* isolada da hemolinfa de *Stomoxys calcitrans*. Visualização por microscopia óptica de campo claro, coloração em Giemsa. Escala 10 µm...26
- Figura 9:** Curva de crescimento de *Herpetomonas muscarum* em cultura axênica. Contagens realizadas diariamente, durante 6 dias após plaqueamento com concentração inicial de  $2 \times 10^5$  parasitos/mL. Experimento realizado em triplicata experimental.....27
- Figura 10:** Interação *ex vivo* de *S. calcitrans* com *H. muscarum* e *L. amazonensis*. Contagem realizada após uma hora de interação entre intestinos de *S. calcitrans* com os diferentes protozoários. \* $p < 0,05$  na comparação entre os grupos. Experimento realizado em triplicata experimental.....28
- Figura 11:** Microscopia de interação *ex vivo* entre *S. calcitrans* e *L. amazonensis* (A e B) e *S. calcitrans* e *Herpetomonas muscarum* (C e D). Setas vermelhas indicam parasitos.....29
- Figura 12:** Análise ultraestrutural da interação *ex vivo* de *Stomoxys calcitrans* e *Herpetomonas muscarum* a nível intestinal, por microscopia eletrônica de varredura. **A–B** – Controle. Células do epitélio inestinal de *S. calcitrans*, com formato arredondado e presença de microvilosidades. **C–F** – Intestinos após a interação por uma hora com *H. muscarum*. **C–D** – Presença dos parasitos na conformação de rosetas, distribuídos sobre as células do epitélio intestinal (setas brancas); **E–F** – Parasitos isolados, com flagelos inseridos entre as células epiteliais (setas brancas).....30
- Figura 13:** Interação *in vivo* de *S. calcitrans* com *Herpetomonas muscarum* através de alimentação artificial em algodão embebido com solução de sacarose contendo os parasitos na concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL. Dissecção e contagem em diferentes tempos após a refeição. Experimento realizado em duplicata. \* $p < 0,05$  do grupo de 3 horas para o de 24

horas.....	31
<b>Figura 14:</b> Avaliação do desenvolvimento de <i>S. calcitrans</i> infectada oralmente com <i>H. muscarum</i> . <b>A</b> – Sobrevivência de indivíduos adultos de <i>S. calcitrans</i> . <b>B</b> - Oviposição de <i>S. calcitrans</i> nos grupos não infectado (barras brancas) e infectado (barras rachuradas). Experimento único.....	32
<b>Figura 15:</b> Avaliação do desenvolvimento de <i>S. calcitrans</i> infectada oralmente com <i>H. muscarum</i> . <b>A</b> – Número de pupas gerado nos grupos não infectado (barras pretas) e infectado (barras cinzas); <b>B</b> – Emergência de adultos nos grupos não infectado (barra preta) e infectado (barra cinza). Experimento único.....	33
<b>Figura 16:</b> Distribuição dos hemócitos em insetos. Hemócitos circulantes e sésseis e suas distribuições ao longo do corpo do inseto. Fonte: HILLYER, 2016.....	44
<b>Figura 17:</b> Órgão hematopoiéticos em Lepdópteros e em <i>Drosophila melanogaster</i> . (a) Órgãos hematopoiéticos do 6º instar <i>Spodoptera frugiperda</i> . (b) Gânglio linfático larval de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	47
<b>Figura 18:</b> Respostas imunes celulares. Processos envolvendo hemócitos em representação esquemática. Fonte: ELEFThERIANOS et al., 2021.....	48
<b>Figura 19:</b> A- Coleta de moscas no campus da UFRRJ; B- Colônia de <i>Stomoxys calcitrans</i> , ICBS/UFRRJ.....	51
<b>Figura 20:</b> Procedimento de coleta de hemolinfa em <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	52
<b>Figura 21:</b> Contagem absoluta de hemócitos circulantes de <i>S. calcitrans</i> avaliados a fresco por microscopia de campo claro, em câmara de Neubauer. <b>A</b> - Indivíduos do campo adultos (C); <b>B</b> - Larvas provenientes de colônia; C- Indivíduos adultos de colônia (Co). * $p < 0,05$ em relação ao controle. Experimento realizado em duplicata experimental.....	54
<b>Figura 22:</b> Prohemócitos circulantes de <i>Stomoxys calcitrans</i> . <b>A</b> – Caracterização esquemática do tipo celular. <b>B-D</b> – Prohemócitos isolados da hemolinfa, fixados com Metanol, corados com Giemsa e analisados por microscopia de campo claro. Escala 20 $\mu\text{m}$ .....	55
<b>Figura 23:</b> Granulócitos circulantes de <i>Stomoxys calcitrans</i> . <b>A</b> – Caracterização esquemática do tipo celular. <b>B-D</b> – Granulócitos isolados da hemolinfa, fixados com Metanol, corados com Giemsa e analisados por microscopia de campo claro. Setas pretas indicando a presença de vacúolos no citoplasma. Setas vermelhas indicando a presença de grânulos no citoplasma. Escala 20 $\mu\text{m}$ .....	56
<b>Figura 24:</b> Plasmatócitos circulantes de <i>Stomoxys calcitrans</i> . <b>A</b> – Caracterização esquemática do tipo celular. <b>B-D</b> – Plasmatócitos isolados da hemolinfa, fixados com Metanol, corados com Giemsa e analisados por microscopia de campo claro. Setas vermelhas indicando as projeções de membrana. Escala 20 $\mu\text{m}$ .....	57
<b>Figura 25:</b> Oenocitóides circulantes de <i>Stomoxys calcitrans</i> . <b>A</b> – Caracterização esquemática do tipo celular. <b>B-D</b> – Oenocitóides isolados da hemolinfa, fixados com Metanol, corados com Giemsa e analisados por microscopia de campo claro. Escala 20 $\mu\text{m}$ .....	58
<b>Figura 26:</b> Esquema demonstrativo dos tipos celulares identificados na hemolinfa de <i>S. calcitrans</i> ., sendo eles: prohemócitos; plasmatócitos; granulócito; oenocitóide. Fonte: autoria própria.....	58
<b>Figura 27:</b> Contagem diferencial dos hemócitos circulantes de indivíduos adultos de colônia de <i>Stomoxys calcitrans</i> , fixados em Metanol, corados com Giemsa e contados em microscopia de campo claro. * $p < 0,05$ em relação a todos os grupos. ** $p < 0,05$ em relação a	

todos os grupos.....59

**Figura 28:** Análise dos hemócitos circulantes de *S. calcitrans* por citometria de fluxo. FSC-H representa o tamanho das células e SSC-H representa a granulidade. Experimento realizado em duplicata.....60

**Figura 29:** Contagem diferencial dos hemócitos de *S. calcitrans* desafiada com seu parasito *Herpetomonas muscarum*. Controle inoculado somente com PBS, infectados inoculados com a concentração de  $5 \times 10^4$  parasitos/mL em PBS. Avaliação realizada nos tempos de 2, 4 e 6 horas após inoculação. Experimento realizado em duplicata.....61

**Figura 30:** Lipopolissacarídeo e protozoário *H. muscarum* desencadeiam a liberação de ET. **A** – Microscopia óptica de campo claro de estruturas filamentosas observadas em lâminas de interação de hemócitos de *S. calcitrans* com o protozoário *H. muscarum*. Hemócitos isolados de adultos de *S. calcitrans* foram incubadas com as concentrações indicadas de LPS e  $2 \times 10^7$  parasitos/mL de *H. muscarum*. As ETs foram quantificadas por DNA liberado em sobrenadantes de cultura pelo ensaio Picogreen dsDNA. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de 1 experimento independente.....62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequências dos oligonucleotídeos utilizadas neste estudo.....	20
<b>Tabela 2.</b> Medição dos diferentes tipos celulares encontrados na hemolinfa de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	59

## LISTA DE ABREVIACÕES

AMPs	Peptídeos Antimicrobianos
$\beta$ GRPs	Proteínas de Reconhecimento de $\beta$ -1,3-glucano
B.O.D.	Biological Oxygen Demand
BSA	Albumina de Soro Bovino
C	Moscas do Campo
Co	Moscas Provenientes da Colônia
CYP	Citocromo P450
Dome	Domeless
ETs	Armadilhas Extracelulares
GALEs	Galectinas
gGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
Hop	Hopscotch
LIT	Liver Infusion Tryptose
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ML	Máxima Verossimilhança
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NET's	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
NIH	National Institute of Health
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PGRPs	Proteínas de Reconhecimento de Peptidoglicano
PO	Fenoloxidase
PPO	Profenoloxidase
PPRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PSC	Centro de Sinalização Posterior
SFB	Soro Fetal Bovino
SSU-rRNA	Subunidade Menor do RNA Ribossomal
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Upd	Citocina Extracelular Unpaired

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
CAPÍTULO I .....	4
2. INTRODUÇÃO.....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
3.1. <i>Stomoxys calcitrans</i> (Linnaeus, 1758).....	8
3.2. Estratégias de Controle de <i>S. calcitrans</i> .....	10
3.3. Os Tripanossomatídeos.....	12
3.3.1. Localização de Tripanossomatídeos em Insetos.....	14
3.4. Modelos de Estudo de Interação Parasito-vetor.....	18
3.5. Vetorização mecânica por <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Isolamento do Tripanossomatídeo.....	20
4.2. Identificação do Tripanossomatídeo.....	20
4.3. Interação <i>Stomoxys calcitrans</i> com <i>Herpetomonas muscarum</i> .....	21
4.3.1. Meios de cultura utilizados.....	22
4.3.2. Parasitos.....	22
4.3.3. Insetos.....	22
4.3.4. Curva de Crescimento <i>Herpetomonas muscarum</i> .....	22
4.3.5. Ensaios.....	22
4.3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MET) das Interações <i>ex vivo</i> .....	24
5. RESULTADOS .....	25
5.1. Detecção e Isolamento de <i>Herpetomonas muscarum</i> em <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	25
5.2. Microscopia ótica de campo claro <i>Herpetomonas muscarum</i> .....	25
5.3. Curva de crescimento de <i>Herpetomonas muscarum</i> .....	27
5.4. Ensaio de Interação <i>ex vivo</i> de <i>Stomoxys calcitrans</i> com <i>Herpetomonas muscarum</i> e <i>Leishmania amazonensis</i> .....	27
5.5. Ensaio de interação <i>in vivo</i> de <i>Stomoxys calcitrans</i> com <i>Herpetomonas muscarum</i> .....	31
5.6. Ensaio de interação para Avaliação do desenvolvimento de <i>Stomoxys calcitrans</i> frente a infecção por <i>Herpetomonas muscarum</i> .....	31
6. DISCUSSÃO.....	34
CAPÍTULO II.....	38
7. INTRODUÇÃO.....	41
8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	42
8.1. Sistema Imune em Insetos .....	42
8.1.1. Células imunes em insetos.....	44
8.1.2. Respostas imunes celulares.....	47
9. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
9.1. Insetos e Protozoário .....	51
9.1.1. Insetos .....	51
9.1.2. Protozoário.....	51
9.2. Coleta da Hemolinfa.....	51
9.3. Caracterização Morfológica dos Tipos de Hemócitos Livres .....	532
9.4. Contagem Diferencial e Medição dos Hemócitos Circulantes de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	52
9.5. Análise do Perfil Hemocitário de <i>Stomoxys calcitrans</i> Desafiada com Patógeno.....	53
9.6. Análise por Citometria de Fluxo .....	53
9.7. Quantificação de Armadilhas Extracelulares (ETs) .....	53
10. RESULTADOS .....	54
10.1. Contagem Absoluta de Hemócitos Circulantes de <i>Stomoxys calcitrans</i> .....	54
10.2. Caracterização dos Tipos Celulares.....	54
10.3. Contagem Diferencial e Medição de Hemócitos Circulantes de <i>Stomoxys</i>	



calcitrans.....	58
10.4. Análise da Resposta Hemocitária de <i>Stomoxys calcitrans</i> desafiada com <i>Herpetomonas muscarum</i> .....	60
10.5. Hemócitos de <i>Stomoxys calcitrans</i> liberam ETs clássicos.....	61
11. DISCUSSÃO .....	63
12. CONCLUSÕES.....	68
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
14. ANEXOS.....	84

## 1. INTRODUÇÃO

A mosca dos estábulos, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) é uma espécie cosmopolita, ectoparasita e hematófaga obrigatória (BALDACCHINO et al., 2013). Suas picadas são caracterizadas como dolorosas, e seu hábito alimentar é definido como agressivo e persistente, envolvendo diferentes espécies, como bovinos, caprinos, ovinos, equinos e até mesmo o homem (ZUMPT, 1973).

Seu hábito alimentar pouco seletivo e persistente, faz com que em conjunto com organismos de outras espécies pertencentes ao seu gênero, seja considerada uma praga econômica de gado, assim como de outros animais de sangue quente em muitas partes do mundo (ZUMPT, 1973). Além de todos os prejuízos econômicos atribuídos a essa espécie, existem complicações mais localizadas atribuídas às suas picadas, como dermatite necrótica nas pontas dos ouvidos do cão, dermatite exsudativa nas pernas de cavalos e nos "redemoinhos de cabelo" nas costas de bezerros (YERUHAM e BRAVERMAN, 1995).

As grandes infestações de *S. calcitrans* em áreas rurais, agregada ao seu hábito alimentar traz um papel importante para essa espécie na epidemiologia de doenças transmissíveis, onde ela pode ser capaz de carrear mecanicamente diversos agentes patogênicos, como vírus, bactérias, protozoários e helmintos (BALDACCHINO et al., 2013). Este modo de transmissão ocorre por partes bucais do vetor contaminadas ou por regurgitação do conteúdo do aparelho digestivo (BUTLER et al., 1977; DOYLE et al., 2011). Quando se trata de regurgitação, a transmissão de patógenos pode ser limitada devido a alguns fatores, como o tempo de reinoculação da alimentação anterior e sua exposição às enzimas digestivas, que poderia acarretar na morte dos patógenos ali presentes (FERENC et al., 1988). Em relação a essa última condição, em laboratório já foi observado que o sangue ingerido pode seguir para o divertículo, onde, com ausência de secreções digestivas o patógeno poderia sobreviver e permanecer viável por mais tempo (FOIL, 1994. CORONADO, 2004). Os organismos do gênero *Stomoxys* podem apresentar o intervalo entre as refeições variável, principalmente pelo hábito dos animais ectoparasitados, de espantar as moscas do dorso ou patas, devido a dor da picada. Os tempos entre alimentações pode ter uma amplitude de 4 a 72 h (KUNZ e MONTY, 1976; FOIL e HOGSETTE, 1994), o que torna a regurgitação do conteúdo digestivo contaminado mais fácil. Essa variação nos intervalos da alimentação também garante uma maior sobrevivência dos patógenos alojados nas suas peças bucais.

Conhecendo os hábitos e a biologia de *S. calcitrans*, podemos inferir que as mesmas entram em contato com muitos microorganismos que poderiam desafiar suas defesas imunológicas. Em condições naturais, insetos estão expostos a uma gama de microorganismos, muitas vezes patogênicos, seja pelo seu habitat ou por sua alimentação. Frente a esse desafio, com o objetivo de neutralizar possíveis infecções por diferentes microorganismos, mecanismos de defesa foram desenvolvidos. Dentre eles estão alguns amplamente conhecidos, como: barreiras físicas (cutícula, matriz peritrófica) e respostas por componentes celulares e humorais (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007; MARQUARDT, 2004). Dentro da resposta humoral, as ações do organismo envolvem proteínas de reconhecimento, ativação de vias de sinalização, e secreção de efetores que atuam para eliminando infecções. De acordo com o genoma de *S. calcitrans*, os principais componentes de suas vias de de resposta imunológica (Toll, Imd, JAK/STAT, p38 e JNK) estão conservados (BUCHON et al., 2014), o que ocorre no seu grupo, de uma maneira geral, uma vez que os dípteros que possuem seus mecanismos de sinalização intracelular da imunidade inata foram estáveis dentro da sua história evolutiva (OLAFSON et al., 2021). Essas características conservadas no genoma ao longo da evolução, conferem uma adaptação eficiente aos indivíduos com seu meio. Dessa forma, para o controle de grandes infestações desses insetos, é fundamental que se conheça seus mecanismos de defesa frente aos desafios do ambiente. Além do componente humoral, a resposta mediada por componentes celulares, que envolvem mecanismos como fagocitose e encapsulação, também compõem parte importante do sistema imune de insetos (LAVINE e STRAND, 2002). Nesse processo, as células de defesa, conhecidas como hemócitos, englobam os microorganismos, sendo esta a resposta inicial ao contato com os agentes patológicos, como bactérias, fungos, protozoários e vírus (BARILLAS-MURY *et al.*, 2004). Insetos produzem vários tipos de hemócitos que são tradicionalmente identificados usando morfologia, histoquímica e características funcionais (GUPTA, 1985; BREHELIN e ZACHARY, 1986). Os tipos mais comuns de hemócitos relatados na literatura são prohemócitos, células granulares (granulócitos), plasmócitos, células de esférulas (esferulócitos) e oenocitóides (LAVINE e STRAND, 2002). *S. calcitrans* não possui uma caracterização precisa das suas células de defesa, sendo esse um aspecto importante dentro do entendimento da sua fisiologia e resposta imune frente a desafios ambientais e parasitológicos.

Atualmente, é necessária a visão da saúde e interação de todos os organismos e ambientes de uma forma única, uma vez que a saúde das populações está fortemente conectada com a saúde do planeta e seus ecossistemas. A tríade “saúde humana”, “saúde animal” e “saúde ambiental” são os três fatores formadores do conceito de Saúde única, ou

One Health. O equilíbrio entre os três é essencial para que a saúde seja preservada e a emergência de doenças seja evitada (MWANGI et al., 2016). É válido ressaltar que humanos e outros animais vivem em ambientes compartilhados, possuindo assim, interação em questões de saúde e disseminação de doenças. Uma das formas de transmissão de doenças infecciosas entre humanos e animais é através de vetores, podendo eles atuar de maneira biológica ou mecânica. Como já citado nesse texto, uma das ações relevantes de *S. calcitrans* em ambientes de criação é a transmissão de patógenos de forma mecânica no momento da alimentação sanguínea e pouco se sabe sobre a dinâmica dessa transmissão. Sendo assim, entender a relação do organismo de *S. calcitrans* com alguns patógenos é fundamental para esclarecer as vias envolvidas nessa interação, identificando os melhores alvos de pesquisa para desenvolvimento de técnicas de controle da transmissão dessas doenças dentro de diferentes ambientes.

Nessa linha de pensamento, nesse trabalho, um parasito encontrado na hemolinfa de *S. calcitrans* foi isolado e posteriormente identificado como uma espécie do gênero *Herpetomonas*. Esse grupo de tripanossomatídeo acomoda indivíduos parasitas monoxênicos de insetos (HOARE e WALLACE, 1966), sendo esses insetos geralmente das ordens Diptera, Hemiptera ou Siphonaptera (PACHECO et al., 1998). Existe um grande interesse nos parasitos monoxênicos devido a sua interação com insetos de importância médica e agropecuária, onde eles são capazes de alterar parâmetros fisiológicos dos seus hospedeiros (LANGE e SENHOR, 2012). Essas alterações consistem em diferenças na sua fertilidade e reprodução, na sua alimentação e no seu desenvolvimento, o que afeta diretamente a dinâmica de populações dos hospedeiros, assim como seu tempo de vida (VEGA e KAYA, 2012). Neste contexto, os estudos das interações tripanossomatídeo-insetos são capazes de fornecer informações vitais para a ecologia e controle de espécies de insetos prejudiciais.

Tendo em mente todas as análises relevantes a respeito de *S. calcitrans* abordadas aqui, nos próximos dois capítulos tratamos de questões distintas da mosca- dos-estábulo (I) identificação e caracterização as células de defesa (hemócitos) circulantes de *S. calcitrans* (II) isolamento e identificação de parasitos observados em *S. calcitrans*, assim como os aspectos da sua interação com o protozoário monoxênico *H. muscarum*.

**CAPÍTULO I: PRIMEIRA IDENTIFICAÇÃO DE *Herpetomonas muscarum* EM  
*Stomoxys calcitrans* E SEUS ASPECTOS DE INTERAÇÃO**

## RESUMO

ROSA, Dayana Palmeira da Silva. ***Stomoxys calcitrans*: primeira identificação de infecção natural por *Herpetomonas muscarum*, aspectos de sua interação e caracterização de hemócitos circulantes**. 2022. 101 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

*Stomoxys calcitrans* é um díptero com ampla distribuição mundial, com hábito predominantemente hematófago de animais de sangue quente. Dentre os ambientes de maior viabilidade para a sua alimentação e reprodução estão os ambientes de produção animal, principalmente os de confinamento, que concentram hospedeiros em um único ambiente. Devido a sua alimentação persistente e sua picada dolorida, os índices de produção animal caem significativamente, com depreciação da carne e do leite dos hospedeiros. Outro fator relevante é sua potencialidade como agente vetorial mecânico de diversos agentes patogênicos. O entendimento da relação dessa mosca com seus parasitos é fundamental para o estabelecimento de estratégias de controle efetivas. Nesse trabalho isolamos da hemolinfa de *S. calcitrans* nas condições de: indivíduos do campo, larvas em laboratório e adultos gerados em colônia o parasito *Herpetomonas muscarum*. O mesmo foi isolado e identificado a nível de espécie por sequenciamento de DNA. Com o objetivo de avaliar os aspectos de interação com seu hospedeiro, realizamos inicialmente, sua curva de crescimento buscando entender seu desenvolvimento e identificar os melhores tempos para ensaios laboratoriais. A interação desse parasito foi avaliada a nível intestinal, por experimentos *in vivo* e *ex vivo*, demonstrando que o mesmo é capaz de interagir e se fixar no intestino mesmo após algumas horas de interação. Por fim, avaliamos aspectos de desenvolvimento da mosca dos estábulos infectada oralmente com *H. muscarum*. A longevidade dos indivíduos não foi alterada significativamente, assim como sua oviposição. Porém, a viabilidade dos ovos foi afetada, diminuindo assim a eclosão dos mesmos e, consequentemente prejudicando o desenvolvimento de larvas em pupas e pupas em indivíduos adultos. Dessa maneira, a reprodução de *S. calcitrans* é afetada quando a mesma sofre infecção por *H. muscarum*. As interações da mosca com o tripanossomatídeo revelam um potencial para duas vertentes, sendo elas: (1) utilização do tripanossomatídeo como forma de controle de população de *S. calcitrans*; (2) utilização desses organismos como modelo experimental para o entendimento da relação de dípteros com os tripanossomatídeos que os infectam, através de ensaios laboratoriais.

Palavras chave: vetores mecânicos, tripanossomatídeos monoxênicos, prejuízos econômicos, pecuária.

## ABSTRACT

ROSA, Dayana Palmeira da Silva. ***Stomoxys calcitrans*: first identification of natural infection by *Herpetomonas muscarum*, aspects of its interaction and characterization of circulating hemocytes**. 2022. 101 p. Thesis (Doctorate of Veterinary Science). Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

*Stomoxys calcitrans* is a dipteran with a worldwide distribution, with a predominantly hematophagous habit of warm-blooded animals. Among the most viable environments for their feeding and reproduction are the animal production environments, especially the confinement ones, which concentrate hosts in a single environment. Due to its persistent feeding and its painful bite, animal production rates drop significantly, with depreciation of the hosts' meat and milk. Another relevant factor is its potential as a mechanical vector of several pathogenic agents. Understanding the relationship between this fly and its parasites is essential for establishing effective control strategies. In this work, we isolated the parasite *Herpetomonas muscarum* from the hemolymph of *S. calcitrans* under the conditions of: individuals in the field, larvae in the laboratory and adults generated in a colony. It was isolated and identified at the species level by DNA sequencing. In order to evaluate the aspects of interaction with its host, we initially carried out its growth curve, seeking to understand its development and identify the best times for laboratory tests. The interaction of this parasite was evaluated at the intestinal level, by *in vivo* and *ex vivo* experiments, demonstrating that it is capable of interacting and settling in the intestine even after a few hours of interaction. Finally, we evaluated developmental aspects of the stable fly infected orally with *H. muscarum*. The longevity of individuals was not significantly altered, as well as their oviposition. However, the viability of the eggs was affected, thus reducing their hatching and, consequently, harming the development of larvae in pupae and pupae in adults. Thus, the reproduction of *S. calcitrans* is affected when it is infected by *H. muscarum*. The interactions of the fly with the trypanosomatid reveal potential for two aspects, namely: (1) use of the trypanosomatid as a means of controlling the population of *S. calcitrans*; (2) use of these organisms as an experimental model for understanding the relationship between dipterans and the trypanosomatids that infect them, through laboratory tests.

Keywords: mechanical vectors, monoxenic trypanosomatids, economic losses, livestock.

## 2. INTRODUÇÃO

*Stomoxys calcitrans* é um díptero com ampla distribuição mundial, com hábito predominantemente hematófago de animais de sangue quente. Dentre os ambientes de maior viabilidade para a sua alimentação e reprodução estão os ambientes de produção animal, principalmente os de confinamento, que concentram hospedeiros em um único ambiente. Devido a sua alimentação persistente e sua picada dolorida, os índices de produção animal caem significativamente, com depreciação da carne e do leite dos hospedeiros. Outro fator relevante é sua potencialidade como agente vetorial mecânico de diversos agentes patogênicos. O entendimento da relação dessa mosca com seus parasitos é fundamental para o estabelecimento de estratégias de controle efetivas.

A família Trypanosomatidae se destaca pelas graves doenças humanas que são capazes de causar. Sua ampla gama de espécies matam milhares de pessoas anualmente (como a doença do sono africana, doença de Chagas e diferentes formas de leishmaniose). Evolutivamente, o grupo dos tripanossomatídeos é bem-sucedido, tendo como hospedeiros uma ampla gama de invertebrados, vertebrados, plantas e até mesmo outros protozoários. Dentre os gêneros desse grupo, 60% compreendem a parasitas de insetos, sendo monoxenos e 40% são heteroxênicos, parasitando principalmente vertebrados, e sendo transmitidos por insetos. Quando falamos sobre os ciclos de vida dessa porcentagem monoxênica, pouco se sabe sobre o seu ciclo em seus hospedeiros.

Nesse trabalho, isolamos o tripanossomatídeo monoxênico *Herpetomonas muscarum* da hemolinfa da mosca *Stomoxys calcitrans*, em diferentes estágios evolutivos. A forma de transmissão de protozoários monoxênicos, basicamente ocorre de duas maneiras entre insetos: vertical, com o parasito sendo transmitido do genitor para sua prole; e horizontal, com a transferência do parasito ocorre entre dois indivíduos, diretamente, ou através da contaminação do ambiente onde eles se encontram. A transmissão e a virulência dos parasitas são fatores decisivos quando falamos das relações parasita-hospedeiro. Dessa maneira, estudar as relações dos tripanossomatídeos com seus hospedeiros é de extrema relevância para melhor compreensão desses parasitos.

Todos os ensaios realizados nesse capítulo tem por objetivo o esclarecimento de detalhes da relação parasito-hospedeiro desenvolvida entre as espécies *S. calcitrans* e *H. muscarum*.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758)

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordem: Diptera

Subordem: Brachycera

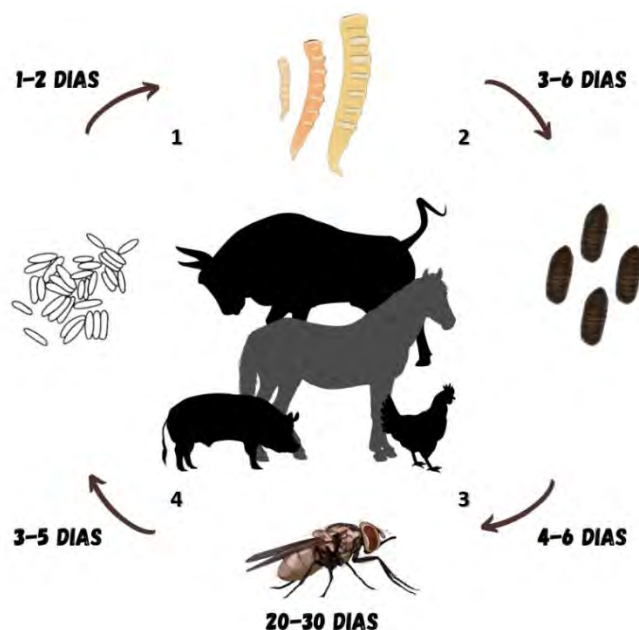
Infraordem: Muscomorpha

Superfamília: Muscoidea

Família: Muscidae

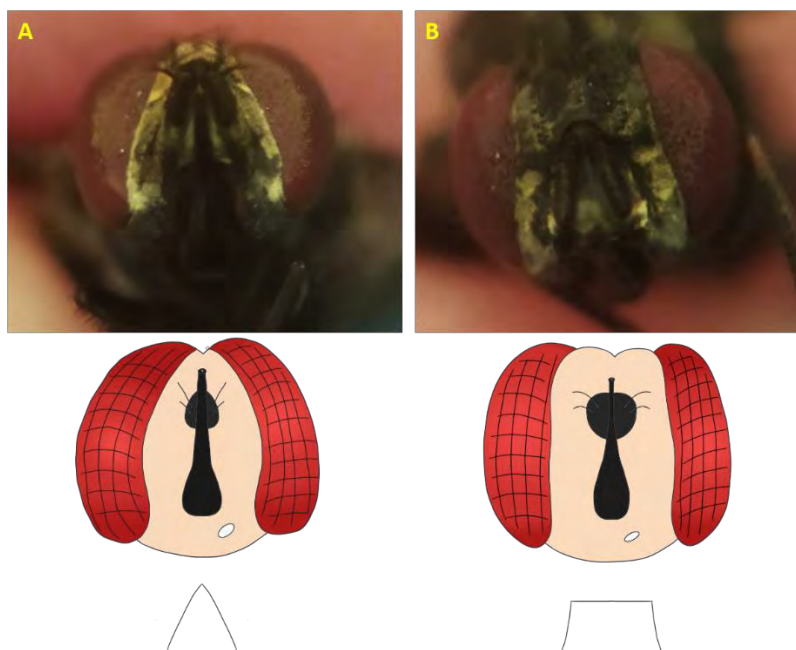
Gênero: *Stomoxys* (BRITO et al., 2008)

O inseto *Stomoxys calcitrans* é considerado como holometábolo, por se desenvolver passando pelos estágios de ovo, larva (três instares), pupa e adulto (FRIESEN et al., 2015). Seu ciclo de vida ocorre preferencialmente, em esterco de herbívoros (BALEBA et al., 2019). No entanto, materiais orgânicos em decomposição como silagem, feno, aparas de grama, restos de cana (COOK et al., 2018) podem ser eleitos pelas fêmeas para oviposição e desenvolvimento das fases imaturas. As fêmeas podem colocar até 400 ovos ao longo da vida, em posturas distintas, sendo elas geralmente em lotes de ovos (que são alongados e apresentam um sulco longitudinal). O desenvolvimento das larvas, passando por todos os instars, ocorre em torno de 3-6 dias, podendo acelerar ou retardar de acordo com as condições ambientais. As larvas empupam, levando em torno de 4-6 dias para a emergência dos adultos. O tempo de duração do seu ciclo é diretamente afetado pela temperatura do ambiente, sendo a faixa dos 30°C a mais favorável, com a duração do ciclo do ovo até o adulto de em média 30 dias (Fig.1). Os adultos vivem em média 30 dias, medindo aproximadamente 6 milímetros, tendo coloração acinzentada, quatro listras longitudinais na posição dorsal, abdome curto, possuindo manchas escuras no seu segundo e terceiro segmentos (MORAES, 2007).



**Figura 1:** Ciclo de vida de *Stomoxys calcitrans*. Imagem sem padrão de escala. Fonte: autoria própria.

Uma característica que a distingue visualmente de outras moscas é a presença de uma probóscide rígida e alongada cranialmente localizada, com os palpos encurtados (MARCONDES, 2001). A sexagem dessa espécie é realizada através da observação do posicionamento dos olhos (Fig. 2), onde machos possuem olhos holópticos e fêmeas olhos dicópticos (BRITO et al., 2008).



**Figura 2:** Sexagem de *Stomoxys calcitrans* baseada no posicionamento dos olhos. **A** – Machos com olhos holópticos; **B** – Fêmeas com olhos dicópticos. Fonte: Acervo pessoal.

Sua alimentação é obrigatoriamente hematófaga, com machos e fêmeas se alimentando até quatro vezes ao dia nos períodos mais quentes do ano. Porém, em períodos mais frios ambos podem interromper a alimentação sanguínea, passando a utilizar néctar e seiva de plantas como fonte de nutrientes e energia para atividades básicas, como o vôo (JONES et al., 1992; BOWMAN, 2006; BRITO et al., 2008; ZUMPT, 1973). Essa condição pode comprometer sua reprodução já que sua ausência de sangue compromete a transferência espermática e impede que o desenvolvimento dos ovos ultrapasse o estágio I (BALDACCHINO et al., 2013 e JONES et al., 1992).

Muito conhecida como uma importante praga de gado, *S. calcitrans* tem os bovinos considerados por alguns como seus hospedeiro preferencial (AXTEL, 1986). Contudo, esse ectoparasita é considerado oportunista, utilizando criações com muitos animais confinados, como fonte fácil e inesgotável de alimento e substrato para sua reprodução (JEANBOURQUIN, 2005).

Dessa maneira, no universo da pecuária, *S. calcitrans* é considerada uma praga, capaz de afetar significativamente diversos tipos de produção. Sua presença no ambiente acarreta alterações nas rotinas de criação, uma vez que sua saliva não contém componentes anestésicos, tornando sua picada dolorosa e estressante causando muito desconforto nos hospedeiros (CORTINAS, 2006), em alguns casos, causando até mesmo dermatites necróticas (YERUHAM, 1995). Seu local de repasto sanguíneo preferencial são os membros dos animais, fazendo com que seja frequente o comportamento de chutes e pisoteio (CORTINAS, 2006). Sua presença gera um comportamento defensivo dos hospedeiros diminuindo seu tempo de descanso conforme as populações da mosca crescem (MULLENS, 2006). A proporção de uma mosca por animal é o suficiente para reduzir a produção de leite em 0,7% (BRUCE e DECKER, 1958) e animais infestados podem ter redução de 19% no ganho de peso e diminuição de 40 a 60% da produção de leite (CAMPBELL, 2001). Nos Estados Unidos estima-se que o impacto econômico anual acarretado por infestações de *Stomoxys calcitrans* chegue ao valor de 2,2 bilhões de dólares (TAYLOR, 2012) e no Brasil o impacto econômico estimado seria de 340 milhões de dólares anualmente (GRISSI, 2014).

### **3.2. Estratégias de Controle de *Stomoxys calcitrans***

Considerando a Região Sudeste do nosso país, temos o estado de São Paulo como o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, apresentando uma safra de 341.819.940 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (2019/2020) o que correspondente a 51% da produção

nacional (IBGE, 2019). Já existe o conhecimento de que há uma correlação entre as populações de *S. calcitrans* e a disponibilidade de matéria orgânica presente nos ambientes, e não coincidentemente, São Paulo apresenta uma grande incidência de surtos da mosca-dos-estábulo em propriedades produtoras de derivados de cana-de-açúcar (CANÇADO, 2013), o que afeta, diretamente as produções pecuárias da região. Sendo assim, medidas de controle populacional são necessárias, e o que existe atualmente nesse âmbito são: medidas de manejo sanitário, como redução de substratos para o desenvolvimento das fases imaturas, através de uma rotina de remoção da matéria orgânica acumulada tanto em ambientes de criação, quanto na indústria sucroalcooleira (MARCONDES, 2001; BOWMAN, 2006) e o controle químico, através de inseticidas e larvicidas (DOMINGHETTI et al., 2017; BARROS et al., 2019).

Algumas ações técnicas já foram realizadas na tentativa de controle populacional dessa mosca, como: gerar moscas estéreis tratando as pupas com metepa, um agente quimioesterilizante, que foi eficiente somente para os machos (LABRECQUE et al., 1976), porém sua utilização foi suspensa devido ao conhecimento de efeitos carcinogênicos dessa substância. Testes com inseticidas também foram realizados, a princípio se mostrando eficientes com valores de LC50 como 0,037 ppm para diflubenzurano, 0,048 ppm para MK-933 (SCHIMIDT e KUNZ, 1980), no enquanto os mesmos não possuem especificidade para o grupo de insetos em questão, acarretando o aparecimento de populações resistentes ao tratamento com algumas dessas substâncias. Em insetos, vários mecanismos de desintoxicação evoluíram para permitir sua sobrevivência após a exposição a toxinas ambientais. Alguns genes são responsáveis pela desintoxicação metabólica, sendo os da família dos genes do citocromo P450 (CYP) um deles. Em artrópodes, os CYP's possuem papéis diversos em se tratando da fisiologia dos insetos, como ações na biossíntese de ecdisteróides e na desintoxicação de xenobióticos (SCHULER E BERENBAUM, 2013; NIWA e NIWA, 2014). Essa família de genes varia em tamanho nos indivíduos do grupo dos dípteros, possuindo variados arranjos. Nos integrantes dos gêneros *Musca*, *Drosophila* e *Glossina*, eles se apresentam nos números de 145, 86 e 77, respectivamente. Indivíduos adultos de *S. calcitrans* tiveram identificados 214 CYP's, a partir da análise do genoma, apresentando um aumento substancial em relação a outros genomas de dípteros sequenciados. Indivíduos do gênero *Stomoxys* possuem uma grande família de genes CYP, o que pode sugerir uma capacidade aprimorada de desintoxicação metabólica, facilitando o desenvolvimento de resistência desses organismos a substâncias químicas, como descrito por (OLAFSON et al., 2021).

Já existe também uma associação da resistência a inseticidas piretróides por *S.*

*calcitrans*, onde o mecanismo molecular de resistência ocorreu devido a uma mutação pontual nos genes dos canais de sódio. Esta foi observada na posição 1014 do transcrito, sendo caracterizada pela substituição de uma leucina por uma histidina, coincidente com mutações de resistência kdr em outros dípteros (OLAFSON *et al.* 2019)

Em se tratando de estratégias de controle biológico da mosca-dos-estábulo, existem estudos os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (que não afetou o desenvolvimento da mosca) (WATSON *et al.*, 1995) e *Metarhizium anisopliae* que mostrou resultados significativos na inibição dos ovos, mas não para larvas e pupas (MORAES *et al.*, 2008). O uso do ácaro *Macrocheles embersoni*, predador natural de *S. calcitrans* se mostrou como uma das formas mais efetivas no controle das formas imaturas (AZEVEDO *et al.*, 2018).

Diferentes estratégias de controle estão sendo utilizadas, porém, atualmente não existe nenhuma que se mostre eficiente por muito tempo, devido a alta adaptabilidade apresentada por *S. calcitrans*.

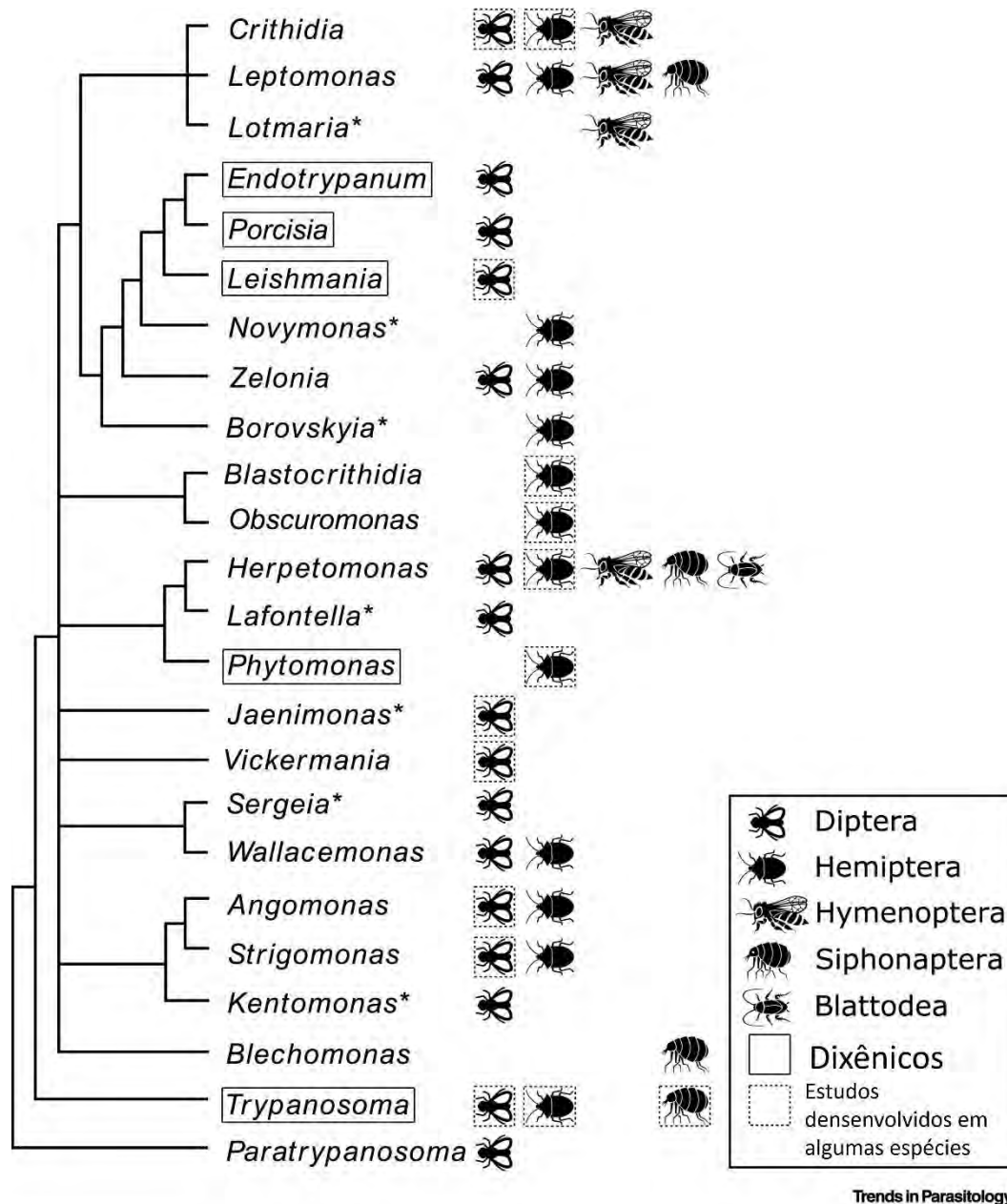
### 3.3. Os Tripanossomatídeos

Tripanossomatídeos é uma nomenclatura geral, utilizadas para remeter a organismos flagelados e parasitos obrigatórios pertencentes a família Trypanosomatidae. Seu parasitismo pode ocorrer em difentes hospedeiros (MASLOV *et al.*, 2019). Muitos integrantes desse grupo parasitam animais, porém existem exceções, como: o gênero *Phytomonas*, que em seu processo evolutivo adaptou-se ao parasitismo de plantas vasculares, sendo transmitido por percevejos fitófagos (JASKOWSKA *et al.*, 2015; CAMARGO, 1999); e algumas espécies que parasitam macronúcleos de ciliados (FOKIN *et al.*, 2014).

O estilo de vida desses parasitos afeta diretamente na sua classificação, onde as diferenças baseadas no seu ciclo de vida são tomadas como referência. Dessa forma, eles são unidos em dois grupos não taxonômicos: os flagelados monoxênicos que possuem desenvolvimento completo em um único hospedeiro (comumente esse sendo um inseto) inseto); e os dixênicos, que necessitam de dois hospedeiros distintos, para seu desenvolvimento completo. Normalmente nesse último, seu ciclo envolve um vetor (tipicamente um inseto) e um hospedeiro vertebrado ou uma planta (MASLOV *et al.*, 2013).

A classificação dos membros dessa família não é exata, havendo muitos organismos não monofiléticos, grupos com apenas um indivíduo e outras espécies que necessitam ser reisoladas para uma melhor classificação. Atualmente a família Trypanosomatidae reúne 24 gêneros, dos quais 19 são monoxenos (Fig. 3) (KOSTYGOV, 2021; ALEXANDER *et al.*; 2021).

Quando se trata dos hospedeiros que os membros desse grupo são capazes de infectar, seja sua transmissão ocorrendo por meio de fatores ambientais (espécies monoxênicas) ou diretamente entre dois hospedeiros diferentes (espécies dixênicas), sua forma evolutiva infectante pode afetar diferentes insetos. Mesmo sendo capaz de passar pelo organismo de vários insetos, o desenvolvimento do parasito no seu interior envolve uma relação parasito-hospedeiro mais específica, resultante da ação de forças coevolutivas (FROLOV, 2016).



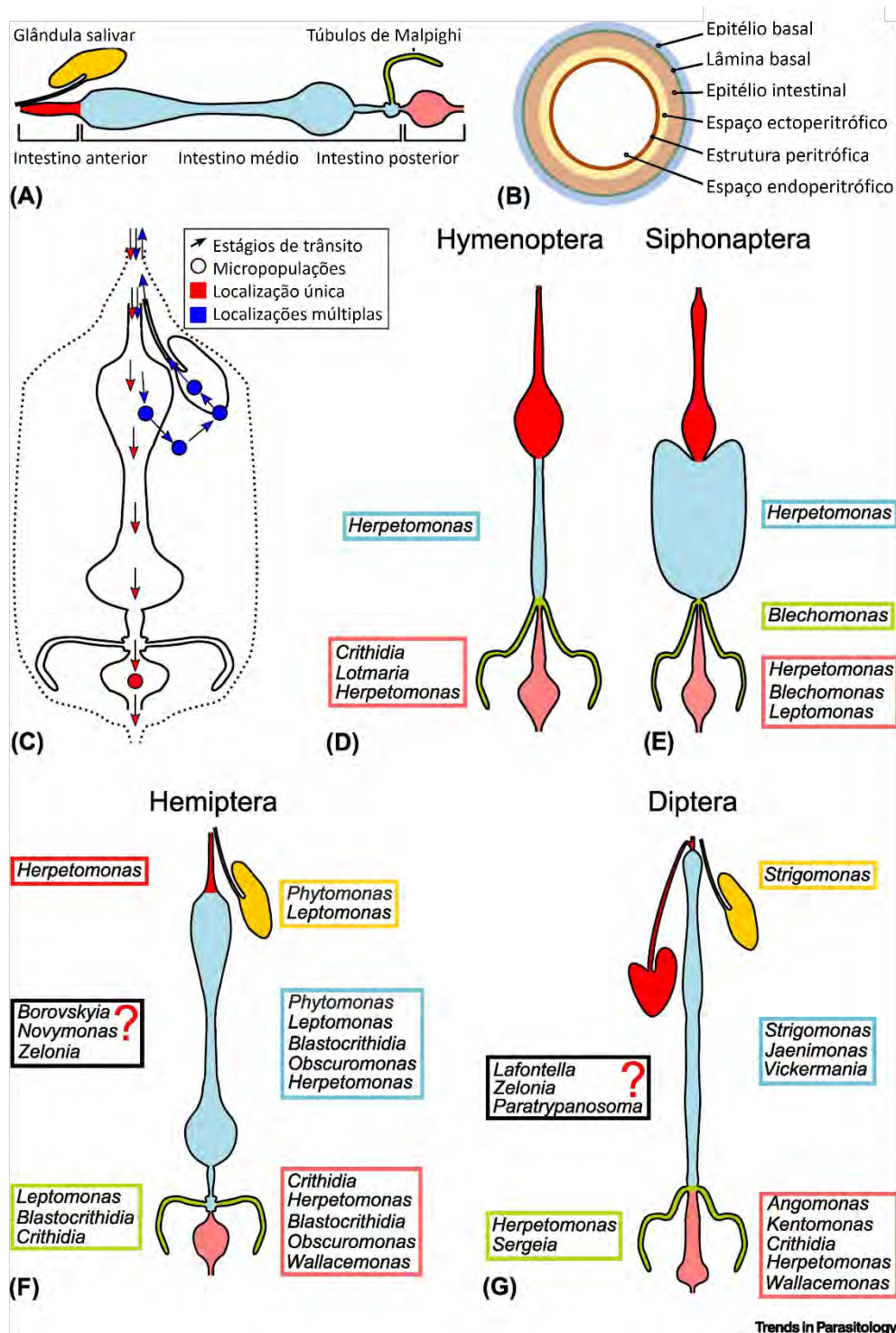
**Figura 3:** Árvore representativa da filogenia do grupo Trypanosomatidae, baseada em sequências de rRNA 18S. Grupos destacados em retângulos inteiros sendo dixênicos e grupos destacados em retângulos descontinuos sendo os de estudos em desenvolvimento. Fonte: FROLOV et al.; 2021.

As primeiras descrições de parasitos monoxênicos infectando insetos foi em dípteros, onde *Paratrypanosoma confusum* infectante de mosquitos representa o ramo mais antigo da árvore filogenética dos tripanossomatídeo (FLEGONTOV et al., 2013), além de os

tripanossomatídeos mais antigos encontrados terem sido detectados em mosquitos do Cretáceo Inferior (POINAR E POINAR JR, 2004; POINAR Jr., 2013). De todos os gêneros de tripanossomatídeos monoxênicos, Díptera possui relato de parasitismo por 13 gêneros (KOSTYGOV, 2021). Os dípteros juntamente com os hemipteros mais de 90% da diversidade familiar reconhecida para esses flagelados (LUKEŠ et al., 2018).

### **3.3.1. Localização de Tripanossomatídeos em Insetos**

A localização mais comum descrita desses flagelados em insetos consiste no seu trato digestivo. O intestino nesses organismos é organizado em três sessões, definidas como: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Figura 4A). As células e estruturas intestinais representam um papel importante na dinâmica das infecções, como as cutículas dos epitélios dos intestinos anteriores e posterior e as microvilosidades na superfície apical das células do intestino médio (MERZENDORFER, et al., 2016).



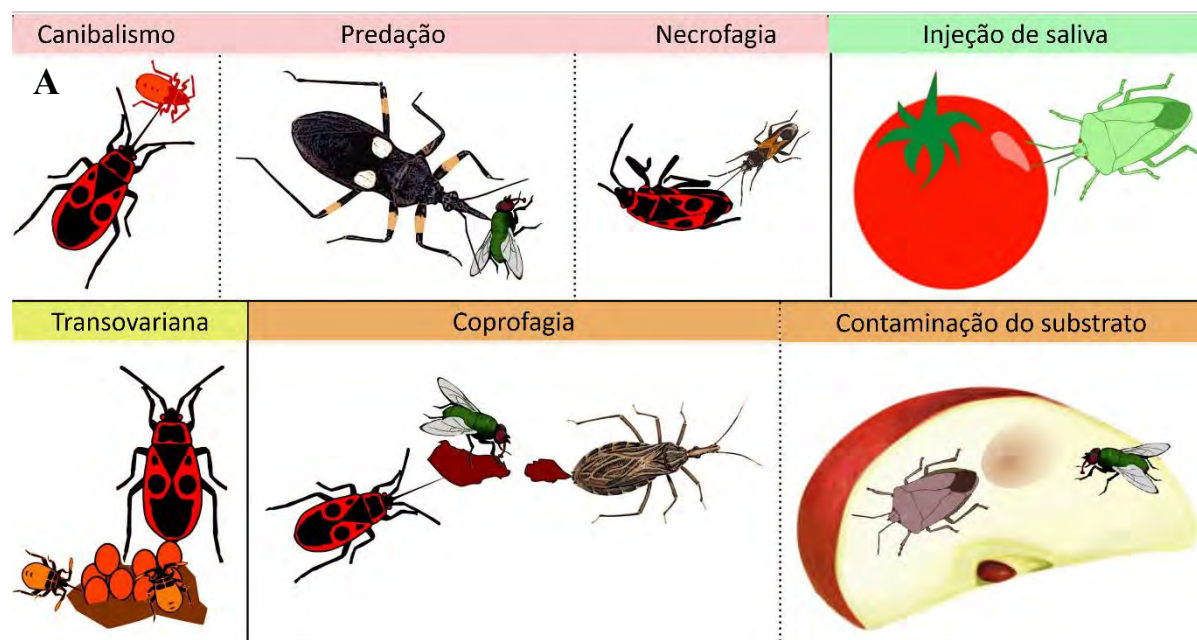
**Figura 4:** Distribuição de diferentes gêneros de tripanossomatídeos no trato digestivo dos insetos. **(A)** Esquematização do sistema digestivo dos insetos. **(B)** Corte transversal do intestino médio. **(C)** Exemplos de vias de desenvolvimento com localizações únicas e múltiplas. **(D–G)** Localização de tripanossomatídeos em diferentes ordens de insetos. ? - indicando localização desconhecida desses gêneros. Fonte: FROLOV et al.; 2021.

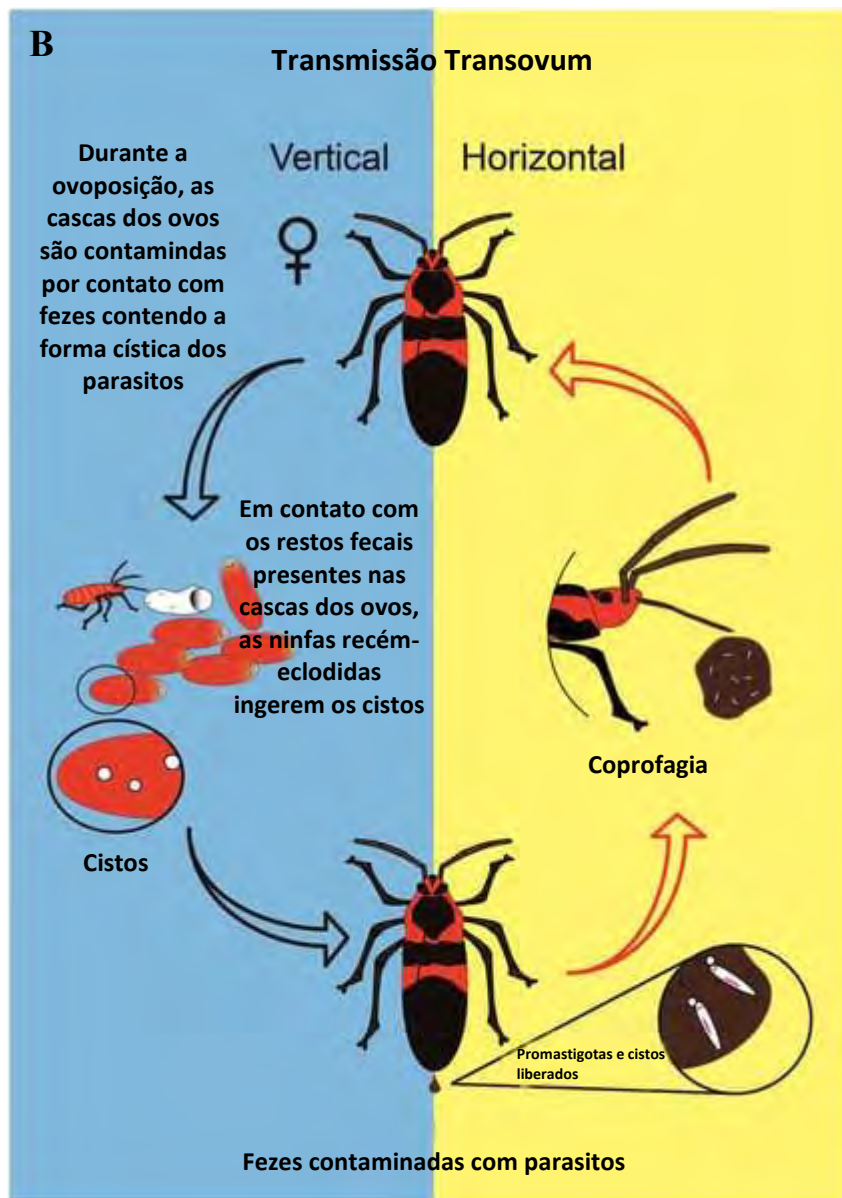
Ainda que o trato digestivo seja o principal alojamento dos parasitos monoxênicos em insetos, em alguns casos, eles podem habitar desse sistema, túbulos de Malpighi ou glândulas salivares, como esquematizado na figura acima (ROWTON et al., 1981; SCHAUB, 1988; FROLOV et al., 2018; FROLOV, MALYSHEVA, KOSTYGOV, 2014). Alguns são capazes



de vencer as barreiras intestinais e ultrapassar a parede do órgão, estabelencendo-se na lâmina basal (FROLOV et al., 2020; FAÚNDEZ E DAVID, 2017), ou atravessar até a hemolinfa (FROLOV et al., 2018). Definir a localização específica de cada gênero do flagelado nos diferentes grupos de inseto é difícil, porém a proliferação ativa e a presença de morfotipos específicos em um determinado órgão ou tecido podem servir como evidência (FROLOV et al.; 2021).

A transmissão de tripanossomatídeos monoxênicos tem algumas vias principais. Sendo comum sua presença no trato digestivo dos hospedeiros, a liberação dos estágios intestinais não especializados viáveis tornaria possível uma infecção por coprofagia e substratos contaminados (Fig. 5A). Outras possibilidades seriam as transmissões transovarianas e por predação, necrofagia e canibalismo de indivíduos contaminados. No caso de fitomonas, a transmissão através de injeção de saliva em plantas (Fig. 5A) também seria possível (KRÁLOVÁ et al., 2019; FROLOV et al., 2018; SCHAUB, 1994). Já para o grupo das *Leptomonas*, foi descrita uma nova forma de infecção, nomeada de Transovum (Fig. 5B), onde os cistos presentes nas cascas dos ovos postos pelo seu hospedeiro atuam como formas infecciosas que são transmitidas à prole do inseto. Ninfas recém-eclodidas livres de parasitas, se contaminam ao se alimentar de restos de casca de ovo contaminados com cistos (DIAS et al., 2014).





**Figura 5:** Mecanismos possíveis de transmissão de tripanossomatídeos monoxenos e fitomonas, entre insetos. **A** – Esquemática de canibalismo, predação, necrofagia, injeção de saliva, transovariana, coprofagia e contaminação de substrato; **B** – Esquemática da transmissão transovum. Fonte: Adaptado de FROLOV et al., 2021 e DIAS et al., 2014, respectivamente.

Já presentes no organismo dos hospedeiros, esses flagelados interagem com o mesmo, podendo afetá-lo ou não. Schaub (1994) estudou a relação parasito-hospedeiro de tripanossomatídeos, classificando-os de acordo com a intensidade dos efeitos sobre o inseto. A maioria dos tripanossomatídeos é classificada como apatogênico, onde sua infecção não afeta a sobrevivência do hospedeiro mesmo sob condições adversas. Alguns se encaixam na classificação de subpatogênicos, não afetando o tempo de vida do hospedeiro sob condições ótimas, mas prejudicando em condições adversas. E existem os classificados como patogênicos, sendo eles capazes de matar o inseto sob condições ideais.

### 3.4. Modelos de Estudo de Interação Parasito-Vetor

O gênero *Herpetomonas* se apresenta como um dos monoxênicos mais bem disseminados entre os insetos, ocorrendo em diferentes Ordens. Ele se caracteriza por um monofilético contendo 13 espécies, sendo elas principalmente encontrados em dípteros. Sua dispersão é ampla, com ocorrência na Europa, nas Américas, na Ásia e na África (TYC et al., 2013). Apesar de sendo definido como monoxênico e encontrado principalmente em insetos, indivíduos do gênero *Herpetomonas* também foram isolados de plantas (FIORINI et al., 2001; BARCLAY, MCGHEE E POSTELL, 2007; MARÍN et al., 2007). Sua natureza não é patogênica, porém espécies desse grupo podem ser usadas como modelos em estudos bioquímicos para avaliar a resposta parasita-hospedeiro, uma vez que possuem metabólitos e enzimas semelhantes a eucariotos superiores, e a outros membros da Família Trypanosomatidae (SOUTO-PADRÓN, 2002), conhecidamente patogênicos em mamíferos, como *Leishmania* sp, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Entamoeba histolitica* (FERREIRA et al., 2003). Além disso, já existe descrição em literatura de ocorrência de infecções por parasitos monoxênicos, no entanto, as infecções de vertebrados parecem ser oportunistas e apenas em indivíduos imunocomprometidos (PACHECO et al., 1998; CHICHARRO e ÁLVAR, 2003; MORIO et al., 2008).

Um ponto importante no estudo da relação inseto-flagelado monoxênico se deve ao fato de a partir do entendimento dessa relação, vários pontos também poderão ser esclarecidos na relação parasito-vetor dos grupos dixênicos. A importância desses é incontestável, pois causam doenças graves em humanos, animais domésticos e plantas economicamente importantes (SIMPSON, STEVENS e LUKEŠ, 2006). Um estudo do transcriptoma de *Herpetomonas* dentro de seu hospedeiro inseto, demonstrou que é possível traçar fortes paralelos com as respostas de promastigotas de *Leishmania* dentro do intestino de flebotomíneos. Ambos os parasitos apresentam aumento significativo de proteínas associadas a virulência de *Leishmania*, sendo importantes para o estabelecimento da infecção parasitária no intestino médio e, portanto, para a sua transmissão (INBAR et al., 2017; SLOAN et al., 2019).

### 3.5. Vetorização Mecânica por *Stomoxys calcitrans*

A transmissão mecânica de patógenos de um hospedeiro para outro é uma consequência da alimentação de insetos hematófagos, podendo ela ser tanto pela contaminação das partes bucais do vetor, como pela regurgitação do conteúdo do trato digestório (BALDACCHINO et al., 2013). Esse dano se faz difícil de mensurar, uma vez que a gama de possibilidades de transmissão é alta. *Stomoxys calcitrans* possui características

favoráveis para sua ação como vetora mecânica devido ao seu hábito alimentar persistente, com repastos sanguíneos de até quatro vezes por dia, e também a sua capacidade de dispersão, que pode chegar a 500 metros por dia (BAILEY et al., 1973). O fato de sua alimentação ser dolorosa para os hospedeiros também gera uma ação defensiva do mesmo, que pode dispersar as moscas em seu corpo, interrompendo a alimentação da mosca, que poderá sair para outro animal, iniciando uma nova alimentação com as partes bucais ainda contaminadas pelo sangue do hospedeiro anterior, carreando possíveis patógenos remanescentes (BALDACCHINO et al., 2013).

Diversos estudos já relataram a ocorrência de transmissão mecânica de patógenos por *S. calcitrans*, dentre eles, podemos citar: o vírus da febre do Nilo Ocidental (DOYLE et al., 2011), *Bacillus anthracis* (TURREL et al., 1987), *Anaplasma marginale* (SCOLES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011), *Trypanosoma vivax* (MIHOK et al., 1995; CUGLOVICI et al., 2010), *Habronema microstoma* (TRAVERSA et al., 2008) entre outros. Nosso grupo demonstrou, em 2019, pela primeira vez no Brasil, a presença de *A. marginales* em indivíduos adultos de *S. calcitrans* coletados no campus da UFRRJ, sugerindo que a mosca pode atuar na dinâmica de transmissão dessa bactéria (ARAÚJO et al., 2021).

Na interação de tripanosomatídeos monoxenos com insetos, essa mesma geralmente ocorre através da alimentação em local infectado, os parasitos ingeridos colonizam o intestino desses insetos e com a infecção uma vez estabelecida, eles podem cruzar o epitélio intestinal, ganhando a hemocèle, gerando uma infecção mais sistêmica (CAMARGO, 1999; LOPES et al., 2010). Como já citado no capítulo anterior, *S. calcitrans* é um reconhecido vetor mecânico de uma diversidade grande de patógenos, dentre eles, protozoários (LIÉNARD et al., 2013; BERBERIAN, 1938). Dessa forma, ser capaz de entender melhor a interação dessa mosca com integrantes dos grupos que ela pode vetorizar, abre portas para muitos estudos e especulações sobre o papel de *Stomoxys calcitrans* na dispersão de agente patogênicos desse.

Em 2019, nosso grupo isolou um tripanosomatídeo da hemolinfa de *Stomoxys calcitrans*. O mesmo foi cultivado e identificado nesse trabalho, assim como teve sua interação explorada experimentalmente, com a intenção de entender essa relação e traçar estratégias para experimentos utilizando ambos como modelo de relação parasito-vetor.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Isolamento do Tripanossomatídeo

Para o isolamento do tripanossomatídeo, a técnica utilizada para a coleta da hemolinfa foi a descrita no item 7.2. Esse isolamento foi realizado em moscas de colônia (Co) não sexadas e larvas, sendo o número exato de indivíduos para cada grupo de 30 e 12, respectivamente. O material coletado foi armazenado em microtubos separados, para posterior processamento.

O isolamento do tripanossomatídeo foi realizado em meio LIT suplementado com SBF, na presença de diferentes antibióticos: penicilina G (100 U/mL), garamicina (56 µg/mL), piperacilina (22 mg/50 µL) e estreptomicina (0,1 mg/mL); e de antifúngicos: fluconazol (4 µg/mL) e itraconazol (36 µg/mL). A partir do crescimento dos flagelados em cultura axênica, uma alíquota foi criopreservada e armazenada na Coleção de Protozoários da FIOCRUZ, sob os registros 925 e 926. (PEREIRA, 2019).

### 4.2. Identificação do Tripanossomatídeo

#### - Microscopia óptica de campo claro

Para a observação morfológica ao microscópio óptico, foram confeccionados esfregaços em lâminas. Os isolados foram corados por variações do protocolo Giemsa e pelo método comercial Panótico® (CARVALHO, 1973).

#### - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), foram realizadas utilizando dois pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados rotineiramente no barcoding de tripanossomatídeos (VOTYPKA *et al.*, 2015). Estes iniciadores flanqueiam parte das regiões do gene que codifica a enzima glicossomal Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) e da porção V7V8 da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU-rRNA) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Sequências dos oligonucleotídeos utilizadas neste estudo

Oligonucleotídeos iniciadores para Kinetoplastídeos	Alvos/Nome do iniciador/Referências
<b>Direto:</b> 5'-GGBCGCATGGTSTTCCAG-3' <b>Reverso:</b> 5'-CCCCACTCGTTTTCRTACC-3'	<b>gGAPDH</b> gGAPDHF/gGAPDHR (BORGHESAN <i>et al.</i> , 2013)

<b>Direto:</b> 5'-CACCCGCGGTAATTCCAGC-3' <b>Reverso:</b> 5'-CTGAGACTGTAACTCAA-3'	<b>SSUrRNA</b> V7V8 (BORGHESAN <i>et al.</i> , 2013)
---	--

As condições da PCR foram as seguintes: o volume final da PCR foi de 50 µL, contendo: tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl, 0,2 mM de cada nucleotídeo (dNTPs); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> 1 U de Taq DNA polimerase (DNA Platinum polimerase, Invitrogen Life Technologies, USA); 0,04% de albumina de soro bovino (BSA-Sigma Chem. Co., USA) e 3 uL do DNA extraído. As amplificações foram realizadas em 35 ciclos, com uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C/ 1 min, seguido de uma etapa de anelamento de 54 °C/ 2 min, e de extensão por 72 °C/ 2 min. Antes do primeiro ciclo, foi realizada uma etapa de desnaturação inicial por 95 °C por 5 min e, após o último ciclo uma etapa de extensão final de 72 °C por 7 min. Foi utilizado como branco da reação H<sub>2</sub>O MilliQ no lugar do DNA molde.

#### - Reação de sequenciamento, alinhamento e análises filogenéticas

Os produtos purificados foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit *Big Dye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, e posteriormente a reação foi enviada para a plataforma de sequenciamento PDTIS/ Fiocruz.

As sequências nucleotídicas obtidas em forma de cromatogramas foram analisadas no programa *DNASTAR SeqMan* (DNASTAR Inc., Madison, Wis WI) e editadas manualmente para a obtenção das sequências consenso. Foram realizadas análises no banco de dados público *Genbank* pelo servidor *BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool)* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) da Biblioteca Nacional de Medicina do NIH (*National Institute of Health*), Maryland, EUA ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) e alinhamento das sequências através do algoritmo CLUSTAL W disponível no pacote do programa MEGA 5.1.

Para avaliar o grau de relacionamento genético entre as sequências obtidas foi empregado o método estatístico probabilístico, Máxima Verossimilhança (ML). Os modelos de substituição nucleotídica foram determinados a partir o programa jModelTest 0.1.1 (POSADA, 2008) com aplicação do critério de correção de Akaike.

### 4.3. Interação *Stomoxys calcitrans* com *Herpetomonas muscarum*

#### 4.3.1. Meios de cultura utilizados

- *Liver Infusion Tryptose* (LIT): Composição 5,0 g/L, Tryptose 5,0 g/L, NaCl 4,0 g/L, KCl 0,4 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 4,26 g/L, D-Glicose + anidra 2,0 g/L e Hemina 0,01 g/L junto ao meio de cultivo, com pH de 7.2. Imediatamente após o preparo, o meio foi esterilizado por vapor úmido a 120 °C por 20 min. Suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)

- *Schneider's Insect Medium*: Schneider's Insect Medium com L-glutamina e bicarbonato de sódio, líquido, estéril, para cultura de células de inseto. Suplementado com 10% de soro fetal bovino.

#### 4.3.2. Parasitos

A cultura axênica de *Leishmania amazonensis* foi cultivada em meio de Schneider suplementado com soro bovino fetal inativado (10%) e mantida a 27°C em B.O.D.

A cultura axênica de *Herpetomonas muscarum* foi cultivada em meio LIT suplementado com soro bovino fetal inativado (10%) e mantida a 27° C em B.O.D.

#### 4.3.3. Insetos

Os insetos utilizados nos experimentos de interação foram retirados da colônia mantida na UFRRJ como descrito no capítulo anterior (FLORENCIO et al.,2020). Todos os indivíduos utilizados tinham idade de 2-3 dias pós-emergência.

#### 4.3.4. Curva de crescimento *Herpetomonas muscarum*

Avaliou-se a curva de crescimento a partir da contagem dos parasitos viáveis em câmara de Neubauer em cultura axenica, sendo a mesma realizada todos os dias até o 6º dia, acompanhando seu crescimento. A concentração inicial estabelecida para o primeiro dia foi de 2x10<sup>5</sup> parasitos/mL.

#### 4.3.5. Ensaios

##### Ensaios *ex vivo*

Para testes *ex vivo*, foram utilizadas 12 moscas de colônia com 2 a 3 dias após a emergência, por tratamento, alimentadas apenas com solução de sacarose (10%). Os intestinos foram dissecados em PBS com auxílio de pinças (Jewelers forceps, Dumont nº 5, Sigma-Aldrich) e uma agulha hipodérmica 13x0,45mm. Após a dissecação os epitélios intestinais foram cortados e expostos, sendo posteriormente, incubados em lâminas

escavadas na presença de *Herpetomonas muscarum* (no primeiro dia de crescimento em cultura) ou *Leishmania amazonensis* (no segundo dia de crescimento em cultura) na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL por 60 minutos. No caso de *H. muscarum* os intestinos foram incubados em uma solução com 500  $\mu$ L de LIT + 0,15 mM  $\text{CaCl}_2$  + 1 mM  $\text{MgCl}_2$  + 2% BSA; com *L. amazonensis*, os intestinos foram incubados em uma solução com 500  $\mu$ L de Schneider + 0,15 mM  $\text{CaCl}_2$  + 1 mM  $\text{MgCl}_2$  + 2% BSA. Os reagentes  $\text{MgCl}_2$  e BSA evitam a adesão inespecífica dos parasitos ao vidro da lâmina escavada (FAMPA et al., 2003). Após esse período, os intestinos foram lavados com PBS, adicionados separadamente a microtubos contendo 40  $\mu$ L de PBS e macerados com homogeneizador. Os parasitas que permaneceram ligados ao intestino foram contados em câmara de Neubauer. Os registros fotográficos foram realizados com a câmera Mícron Scientific, utilizando o software Capture 2.2.1, em microscópio óptico.

#### Ensaio *in vivo*

Para testes *in vivo*, foram utilizadas 24 moscas de colônia com 2 a 3 dias após a emergência, por ensaio, alimentadas apenas com solução de sacarose (10%). Após 12 horas de jejum, as moscas foram alimentadas por 2 horas em algodão embebido com solução de sacarose a 10%, contendo o parasito *Herpetomonas muscarum* na concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL. Após a alimentação os intestinos das moscas alimentadas foram dissecados em diferentes tempos, sendo eles: 3 – 6 – 24 horas. Os intestinos dissecados em PBS com auxílio de pinças (Jewelers forceps, Dumont n° 5, Sigma-Aldrich) foram adicionados separadamente, em microtubos contendo 40  $\mu$ L de PBS e macerados com homogeneizador. Os parasitas encontrados no trato digestivo das moscas em diferentes tempos após a alimentação foram contados em câmara de Neubauer.

#### Ensaio de desenvolvimento

Para a análise do desenvolvimento e reprodução de *S. calcitrans* infectada oralmente com *H. muscarum*, foram utilizadas 15 moscas com 2-3 dias após a emergência, na proporção de 9 fêmeas:6 machos, por grupo experimental. As moscas foram alimentadas somente com solução de sacarose anteriormente ao experimento. Após 12 horas de jejum, os indivíduos foram alimentados com solução de sacarose pura (controle) ou contendo o parasito na concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL. A alimentação foi mantida por 2 horas, sendo posteriormente substituída até o fim do experimento, pela alimentação sanguínea. As análises experimentais das gaiolas controle/infectada foram realizadas por 30 dias. A contabilização da produção de ovos foi realizada, tendo 100 ovos de cada grupo (no mesmo



período) sido recolhidos, depositados em dieta (alfafa fermentada) e acompanhados. As pupas produzidas nas dietas foram recolhidas e acompanhadas até a emergência dos adultos.

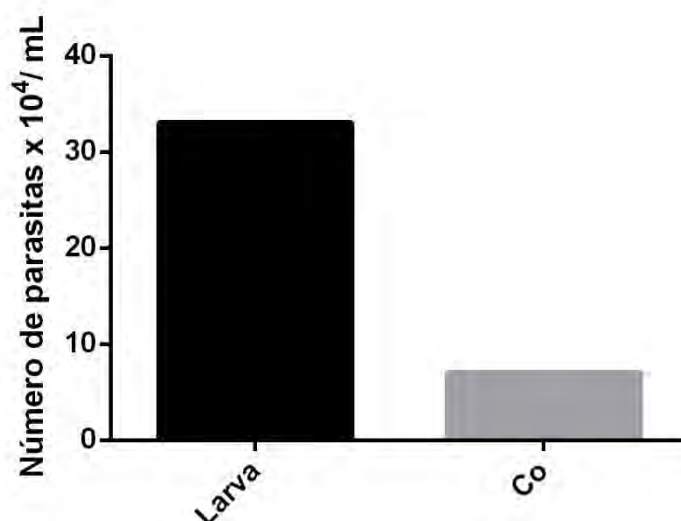
#### **4.3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das interações *ex vivo***

O ensaio para a MEV foi realizado, como descrito acima, com a diferença de que a concentração do parasito foi de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL. Após a etapa de interação entre parasito/intestino, 5 intestinos controle e 5 intestinos infectados foram fixados em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH = 7.2) com glutaraldeído 2%, sendo eles mantidos por 40 minutos em temperatura ambiente, seguido de armazenamento a 4° C. O material fixado foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0.1M três vezes. Após a lavagem, o material foi imerso em ósmio, misturado ao tampão cacodilato na proporção de 1:1. por 30 minutos. O ósmio foi retirado por lavagem com tampão (3 vezes). Seguida da lavagem, a imersão em série alcoólica foi realizada (álcool 30%, álcool 50%, álcool 70%, álcool 80%, álcool 95% e álcool 100%), por 10 minutos em cada etapa. Após a série alcoólica, o material passou pelo ponto crítico, sendo seco, para montagem dos stubs, que foram levados para metalização e processados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Detecção e Isolamento de *Herpetomonas muscarum* em *Stomoxys calcitrans*

A presença de um tripanossomatídeo flagelado na hemolinfa foi detectada por acaso através da observação em câmara de Neubauer. A primeira detecção ocorreu em indivíduos de campo, seguida da detecção em larvas e adultos de colônia. Para o isolamento e identificação, a hemolinfa de um pool de indivíduos foi coletada de duas fases evolutivas da mosca: em larvas e indivíduos adultos gerados em colônia (Co). A partir dessa observação, realizamos a contagem desses parasitos em câmara de Neubauer, onde concluímos as concentrações de  $3,3 \times 10^5$  parasitos/mL para as larvas e  $0,65 \times 10^5$  parasitos/mL em indivíduos gerados em colônia (Fig. 6). O material coletado foi preservado para posterior processamento para identificação do parasito

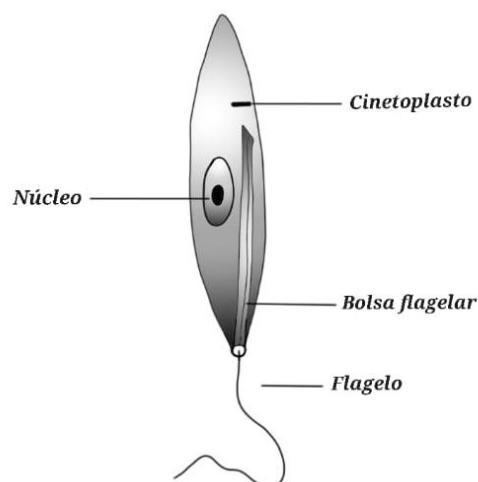


**Figura 6:** Concentração de parasitos encontrados nas diferentes formas evolutivas de *Stomoxys calcitrans* (larva e adulto de colônia) contados em câmara de Neubauer.

### 5.2. Microscopia óptica de campo claro *Herpetomonas muscarum*

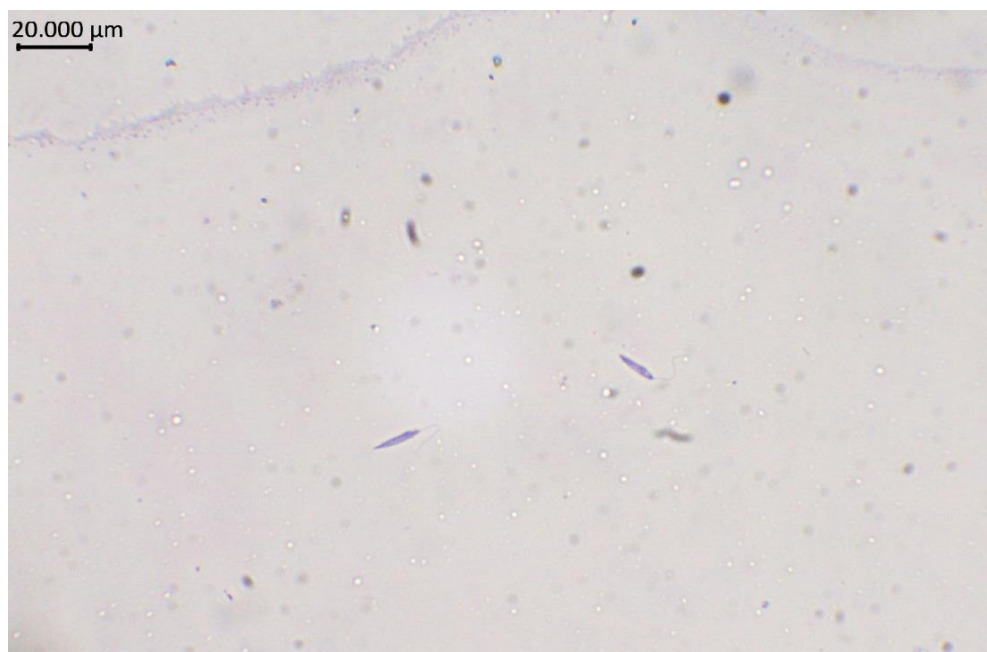
Os parasitos isolados da hemolinfa de larvas e adultos de *S. calcitrans* foram mantidos em meio de cultura na presença de antibióticos para estabelecimento de culturas axênicas do protozoário. Após essa etapa da cultura, os mesmos foram fixados em metanol e corados com Giemsa para observação por microscopia óptica de campo claro (Microscópio Biológico Trinocular Kasvi) (Fig. 8). O comportamento e as formas de desenvolvimento de tripanossomatídeos são muito importantes no momento da sua classificação. Através da observação desse parasito em cultura, uma forma evolutiva foi identificada, nomeada

opistomastigota (Fig. 7), que só está presente no gênero *Herpetomonas*. Dessa maneira foi possível chegar a nível de gênero na classificação.



**Figura 7:** Desenho esquemático da forma evolutiva Opimastigota, encontrada sob observação dos parasitos isolados da hemolinfa de *S. calcitrans*. Fonte: Autoria própria.

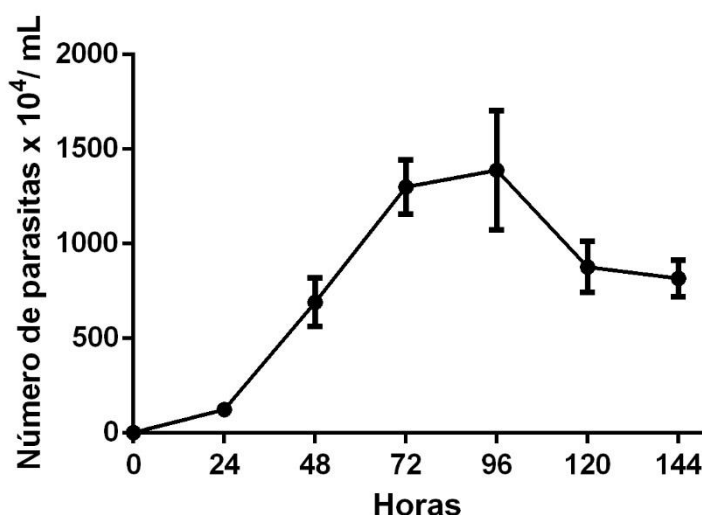
Para a classificação a nível de espécie, o material foi processado, tendo sua PCR realizada utilizando oligonucleotídeos iniciadores utilizados rotineiramente para a classificação de tripanossomatídeos (VOTYPKA *et al.*, 2015), sendo eles: gGAPDH e V7V8 como descrito na metodologia. O material obtido foi sequenciado e submetido as comparações em bancos de dados já bem estabelecidos, determinando a espécie *Herpetomonas muscarum*.



**Figura 8:** *Herpetomonas muscarum* isolada da hemolinfa de *Stomoxys calcitrans*. Visualização por microscopia óptica de campo claro, coloração em Giemsa. Escala 10 µm.

### 5.3. Curva de crescimento *Herpetomonas muscarum*

A partir do estabelecimento da cultura axênica e da identificação do tripanossomatídeo, para melhor conhecimento da biologia do parasito e estabelecimento dos melhores momentos para ensaios experimentais, uma curva de crescimento foi realizada. A curva foi avaliada por 144 horas, tendo as suas contagens sido realizadas em intervalos de 24 horas. A concentração inicial de parasitos no plaqueamento foi de  $20 \times 10^4$  parasitos/mL. A curva apresentou uma fase de crescimento logarítmica a partir das 24 horas de cultivo, tendendo a uma estabilização a partir das 72 horas, entrando em queda após 96 horas do plaqueamento inicial. As médias de contagem do primeiro ao sexto dia foram, respectivamente:  $0,129 \times 10^7$  parasitos/mL,  $0,691 \times 10^7$  parasitos/mL,  $1,3 \times 10^7$  parasitos/mL,  $1,389 \times 10^7$  parasitos/mL,  $0,878 \times 10^7$  parasitos/mL e  $0,817 \times 10^7$  parasitos/mL (Fig. 9). Foi estabelecido que os melhores momentos para os posteriores ensaios experimentais seria entre o primeiro e segundo dia após passagem (repique) do parasito.

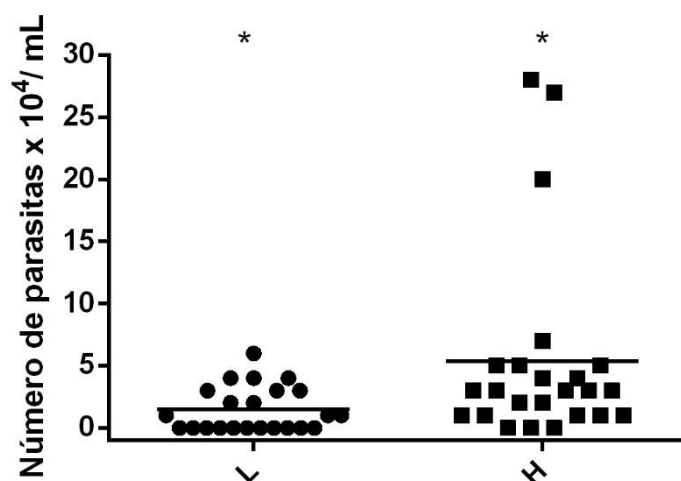


**Figura 9:** Curva de crescimento de *Herpetomonas muscarum* em cultura axênica. Contagens realizadas diariamente, durante 6 dias após plaqueamento com concentração inicial de  $2 \times 10^5$  parasitos/mL. Experimento realizado em triplicata experimental.

### 5.4. Ensaio de interação *ex vivo* de *Stomoxys calcitrans* com *Herpetomonas muscarum* e *Leishmania amazonensis*

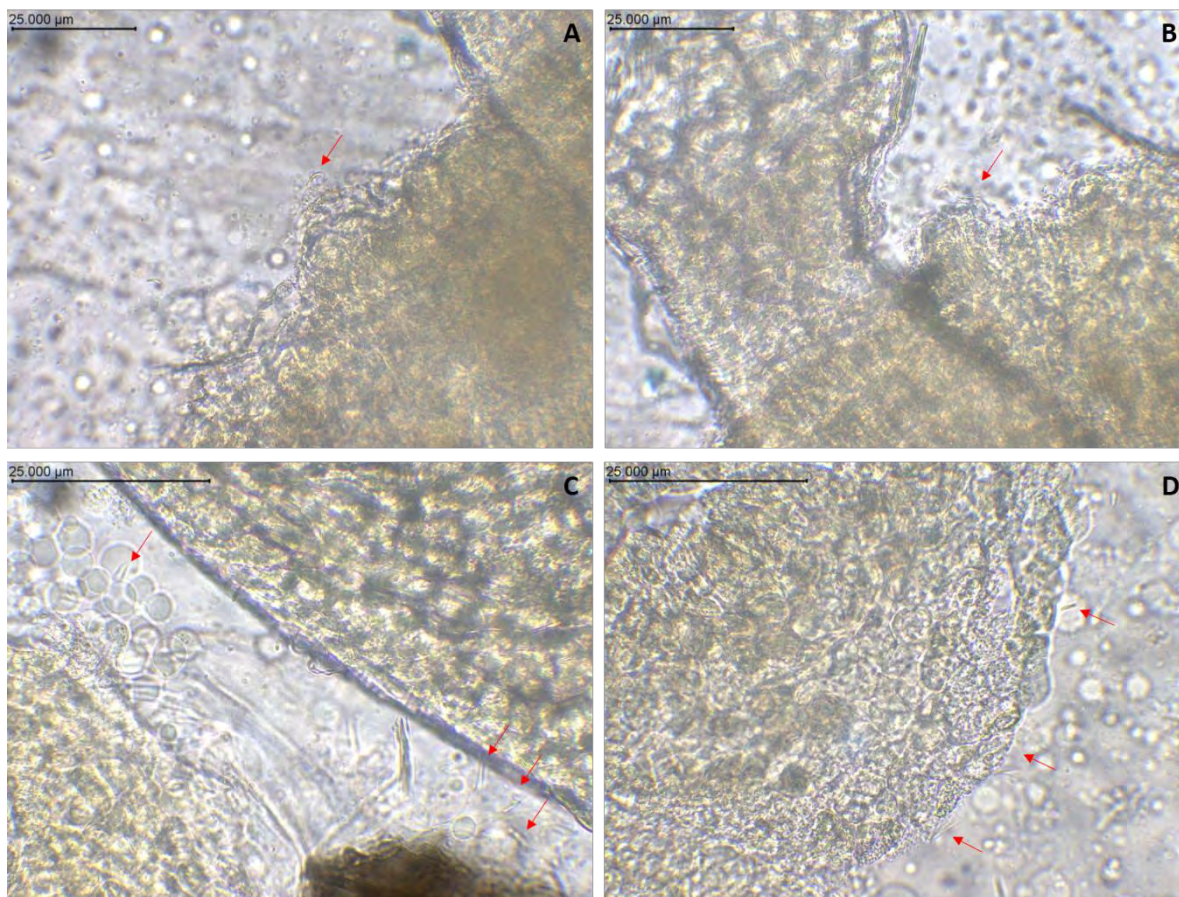
É sabido que para o sucesso no estabelecimento de uma infecção, o parasito deve ser capaz de interagir e responder aos processos ocorridos no organismo do hospedeiro. Dessa forma, uma importante barreira de controle de patógenos são os desafios presentes no trato intestinal dos insetos. Visando entender como ocorreria a interação *H. muscarum* com *S. calcitrans* a nível intestinal, ensaios *ex vivo* foram realizados, avaliando a capacidade de

interação do tripanossomatídeo com as células do epitélio intestinal da mosca. Utilizamos como base comparativa, outro tripanossomatídeo de interesse médico, porém sem nenhuma relação natural comprovada com *S. calcitrans*, denominado *Leishmania amazonensis*. A interação entre os parasitos e as células intestinais ocorreu, no entanto, foi possível observar uma maior interação entre os intestinos expostos a *H. muscarum* (Fig. 10). Nos testes com *L. amazonensis* o número de parasitos ligados ao intestino teve uma média de  $0,64 \times 10^4$  parasitos /intestino. Já a interação com *H. muscarum* apresentou média de  $5,8 \times 10^4$  parasitos/intestino.



**Figura 10:** Interação *ex vivo* de *S. calcitrans* com *H. muscarum* e *L. amazonensis*. Contagem realizada após uma hora de interação entre intestinos de *S. calcitrans* com os diferentes protozoários. \* $p < 0,05$  na comparação entre os grupos. Experimento realizado em triplicata experimental.

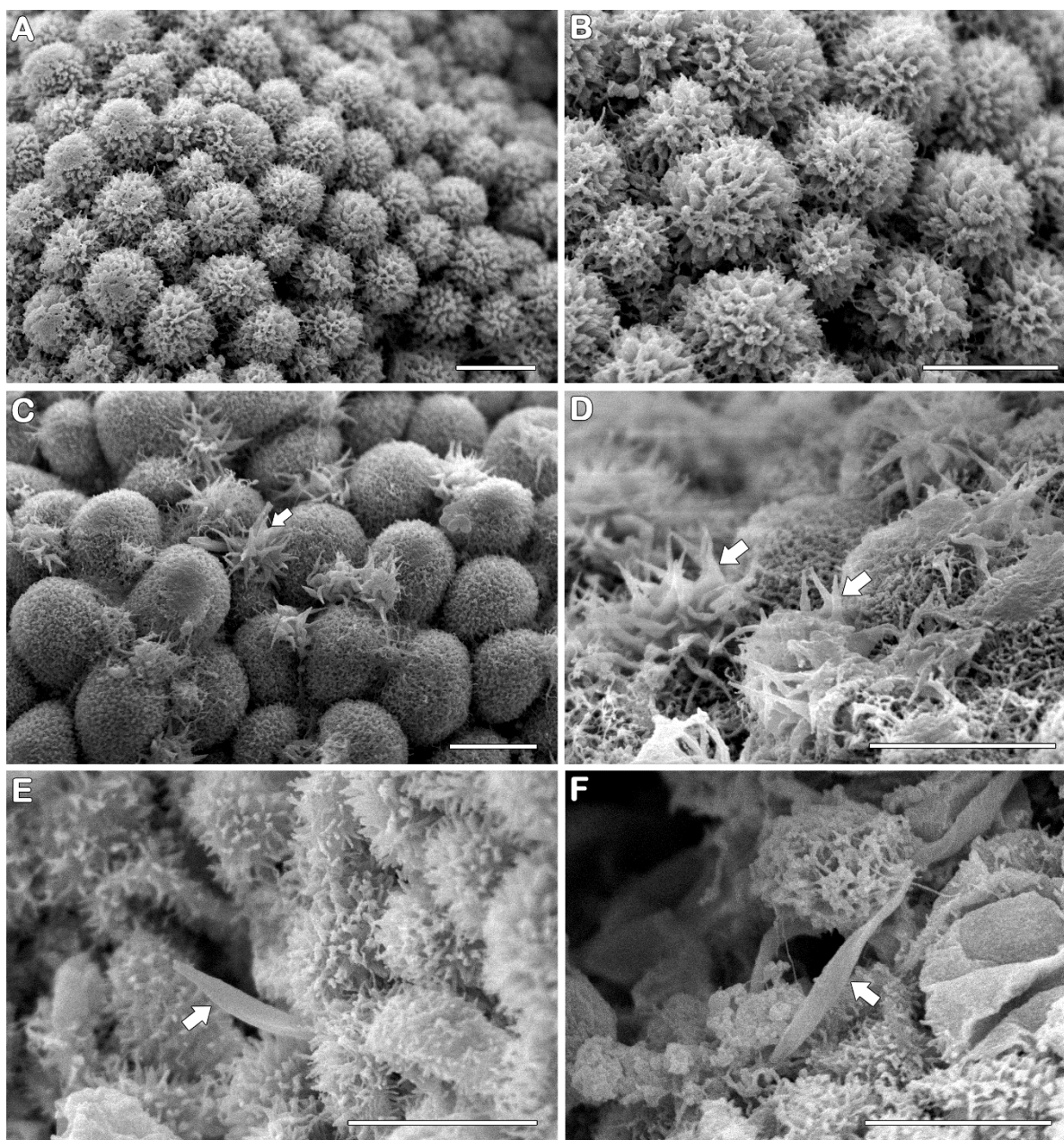
Os intestinos submetidos ao contato com os parasitos também foram observados a fresco por microscopia óptica de campo claro, logo após o tempo estipulado para os ensaios acima. Assim como na contagem em câmara de Neubauer, a microscopia nos revelou mais parasitos presos ao intestino nas interações com *H. muscarum* (Fig. 11C, 11D). em detrimento das com *L. amazonensis* (Fig. 11A, 11B).



**Figura 11 :** Microscopia de interação *ex vivo* entre *S. calcitrans* e *L. amazonensis* (A e B) e *S. calcitrans* e *Herpetomonas muscarum* (C e D). Setas vermelhas indicam parasitos.

A avaliação da interação de *H. muscarum* com as células do epitélio intestinal de *S. calcitrans* também foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura. Nas amostras controle, assim como nas tratadas é possível observar a morfologia das células intestinais, sendo elas arredondadas e com a presença de muitas microvilosidades. Nas amostras que sofreram a interação com o tripanossomatídeo, pudemos observar os mesmo interagindo com as células do epitélio intestinal em duas formas: individuais, onde o flagelo se apresentava inserido entre as células epiteliais; e em rosetas, distribuídas em várias regiões do epitélio intestinal (Fig. 12).

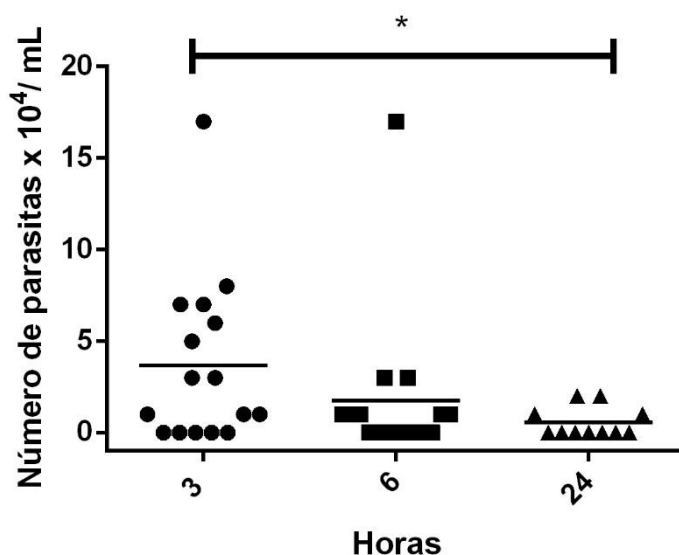




**Figura 12:** Análise ultraestrutural da interação *ex vivo* de *Stomoxys calcitrans* e *Herpetomonas muscarum* a nível intestinal, por microscopia eletrônica de varredura. **A-B** – Controle. Células do epitélio intestinal de *S. calcitrans*, com formato arredondado e presença de microvilosidades. **C-F** – Intestinos após a interação por uma hora com *H. muscarum*. **C-D** – Presença dos parasitos na conformação de rosetas, distribuídos sobre as células do epitélio intestinal (setas brancas); **E-F** – Parasitos isolados, com flagelos inseridos entre as células epiteliais (setas brancas).

### 5.5. Ensaio de interação *in vivo* de *Stomoxys calcitrans* com *Herpetomonas muscarum*

Sabendo que *H. muscarum* é capaz de interagir com as células do epitélio intestinal de *S. calcitrans* nos ensaios *ex vivo*, realizamos também, ensaios de interação *in vivo*, onde moscas foram alimentadas com o parasito e tiveram seu intestino dissecado e avaliado em diferentes tempos. Moscas com 2-3 dias após emergência, sem alimentação por 24 horas, foram alimentadas com uma solução de sacarose a 10% contendo uma concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL por 2 horas, sendo a alimentação retirada após esse tempo. Os intestinos dessas moscas foram dissecados, macerados individualmente, e avaliados em diferentes tempos. A média das concentrações de *H. muscarum* encontradas após 3, 6 e 24 horas da alimentação foram, respectivamente:  $3,7 \times 10^4$  parasitos/mL,  $1,7 \times 10^4$  parasitos/mL e  $0,54 \times 10^4$  parasitos/mL (Fig. 13).



**Figura 13:** Interação *in vivo* de *S. calcitrans* com *Herpetomonas muscarum* através de alimentação artificial em algodão embebido com solução de sacarose contendo os parasitos na concentração de  $1 \times 10^7$  parasitos/mL. Dissecção e contagem em diferentes tempos após a refeição. Experimento realizado em duplicata. \* $p < 0,05$  do grupo de 3 horas para o de 24 horas.

### 5.6. Ensaio de interação para avaliação do desenvolvimento de *Stomoxys calcitrans* frente a infecção por *Herpetomonas muscarum*

O enfrentamento de infecções afeta, direta ou indiretamente, o organismo dos hospedeiros. Visando entender quais seriam as alterações na biologia e desenvolvimento de *S. calcitrans*, moscas recém emergidas foram alimentadas com *H. muscarum* e tiveram seus parâmetros de desenvolvimento avaliados por 28 dias. Os parâmetros avaliados nesse experimento foram: longevidade, oviposição (fertilidade), fecundidade (ovos viáveis,

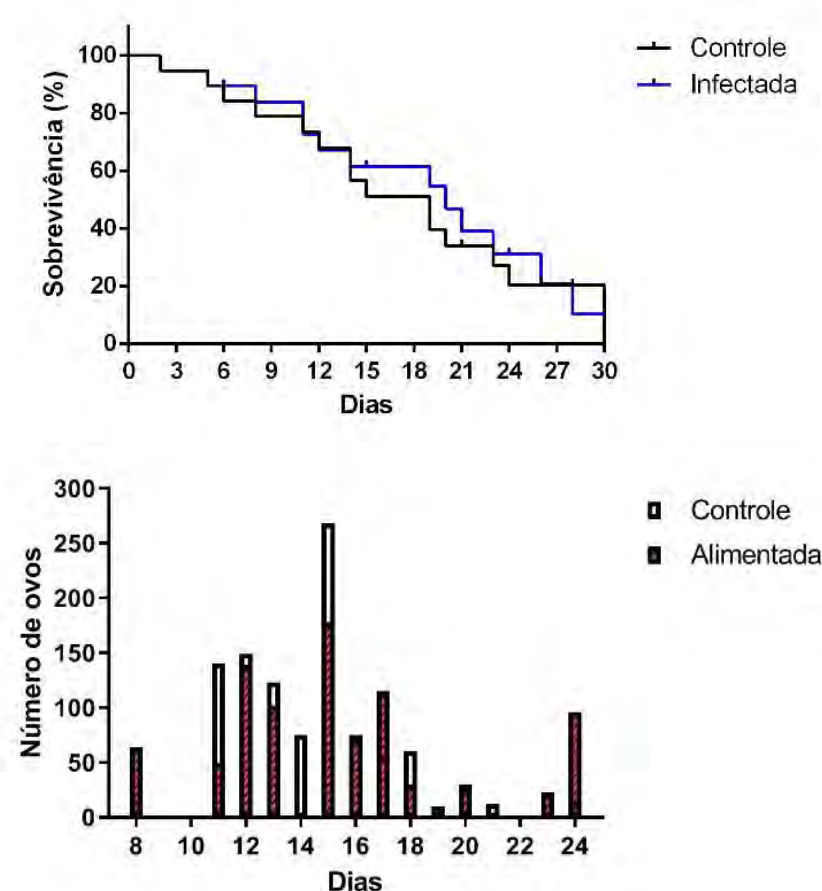


convertidos em pupas) e emergência. A longevidade das moscas infectadas e não infectadas não foi muito afetada, tendo os dois grupos mais ou menos a mesma sobrevivência (Fig. 14A).

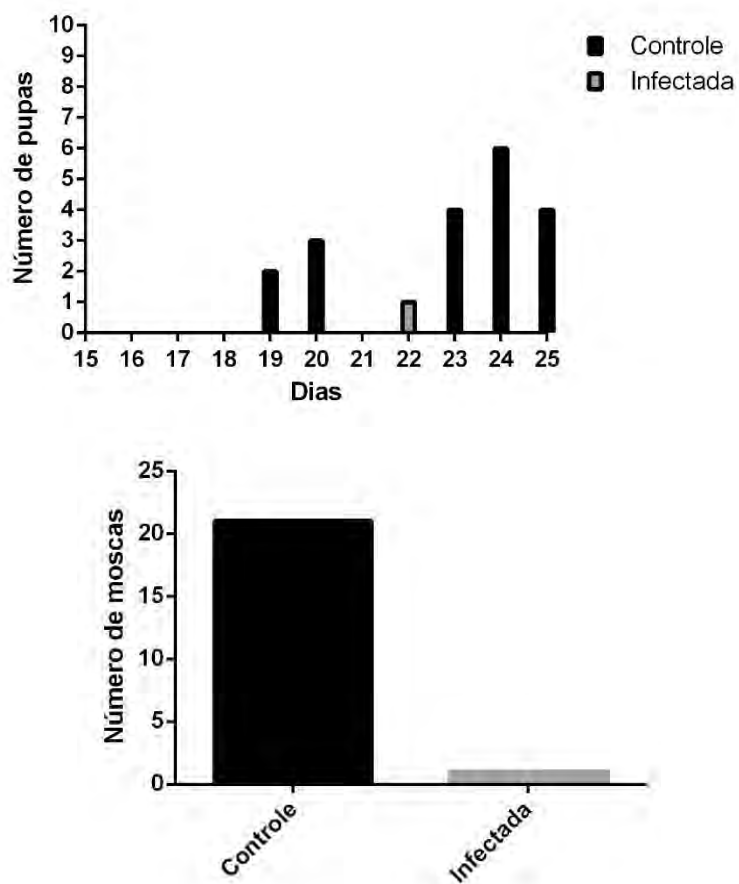
A oviposição foi levemente afetada no grupo infectado, onde em grande parte dos dias a oviposição do grupo não infectado sobrepôs a do infectado. O total de ovos do grupo controle nesses dias foi de 1017, enquanto no grupo infectado, ela foi de 924 (Fig. 14B).

Apesar da oviposição não ser significativamente alterada, a viabilidade dos ovos foi afetada, onde observamos que poucos ovos do grupo foram convertidos em pupas. Para isso, selecionamos 100 ovos de cada grupo estudado, no mesmo espaço de tempo. No grupo não infectado, o total de pupas foi de 25, enquanto no infectados foram somente 3 (Fig. 15A).

A conversão de pupas em indivíduos adultos se apresentou baixa no grupo infectado também, com apenas uma indivíduo gerado. No grupo controle 21 adultos emergiram (Fig. 15B).



**Figura 14:** Avaliação do desenvolvimento de *S. calcitrans* infectada oralmente com *H. muscarum*. **A** – Sobrevivência de indivíduos adultos de *S. calcitrans*. **B** - Oviposição de *S. calcitrans* nos grupos não infectado (barras brancas) e infectado (barras rachuradas). Experimento único.



**Figura 15:** Avaliação do desenvolvimento de *S. calcitrans* infectada oralmente com *H. muscarum*. **A** – Número de pupas gerado nos grupos não infectado (barras pretas) e infectado (barras cinzas); **B** – Emergência de adultos nos grupos não infectado (barra preta) e infectado (barra cinza). Experimento único.

## 6. DISCUSSÃO

A grande diversidade de insetos em todos os ambientes, em diferentes nichos ecológicos, interagindo com muitos outros organismos se torna uma porta de entrada para o estabelecimento de relações interespecie. Ao longo da evolução, muitos tripanossomatídeos coevoluíram com diversas espécies de insetos. O gênero *Herpetomonas* é um grupo monofilético, que possui integrantes em quase todos os continentes (TYC et al., 2013) e se relaciona com um grande número de indivíduos de diferentes classes de insetos, como dípteros, hemípteros, hymenopteros, siphonapteros e *Herpetomonas* spp. foi isolada de Blattodea (FROLOV et al.; 2021). Nesse presente trabalho, identificamos pela primeira vez a espécie *Herpetomonas muscarum*, presente na hemolinfa de *Stomoxys calcitrans*, em diferentes estágios de desenvolvimento. Os flagelados foram encontrados em indivíduos coletados em campo, diretamente de bovinos estabulados, de larvas mantidas em cultura e em indivíduos gerados em colônia. É comum que a infecção por esses parasitos seja iniciada por uma alimentação contaminada. O estágio de desenvolvimento de *S. calcitrans* que apresentou as maiores contagens do parasito isolado da hemolinfa foram as larvas. Atribuímos esse fato, ao ambiente e as condições de sobrevivência das mesmas. A literatura descreve que a coprofagia é uma das formas de transmissão de tripanossomatídeos monoxênicos, onde a sobrevivência de células não especializadas descarregadas nas com fezes acarretaria na infecção de novos hospedeiros, ou reinfecção de hospedeiros já parasitados (MALYSHEVA e FROLOV, 1993; CLARK et al., 1964). Esse tipo de transmissão é favorecido por substratos úmidos ou matéria orgânica em decomposição (FIORINI et al., 2001; HAMILTON et al., 2015; KOSTYGOV et al., 2020; MCGHEE E COSGROVE, 1980). Nossas larvas são mantidas em um substrato composto por alfafa fermentada, que é umidificada diariamente, proporcionando um ambiente muito propício a reinfecção larval por coprofagia, ou substrato contaminado. Os indivíduos adultos também poderiam se contaminar pelas mesmas vias, uma vez que sua alimentação é realizada em algodão embebido em sangue, tendo o mesmo contato com as patas, e podendo ser contaminado por fezes.

A localização de indivíduos do gênero *Herpetomonas* é variável, de acordo com o hospedeiro parasitado e a espécie que o atinge. No percevejo *Nabis flavomarginatus*, a espécie *H. nabiculae* coloniza, principalmente a válvula faríngea, no início do trato digestivo, o que não é um evento tão comum, já que os indivíduos pertencentes a esse gênero interagem com mais frequência com a parte posterior do intestino dos insetos que parasita (FROLOV e SKARLATO, 1995). Em *Musca domestica*, a espécie *Herpetomonas muscarum* é capaz de penetrar entre as duas camadas da membrana peritrófica (NAYDUCH, 2009). Apenas um

pequeno número de espécies de tripanossomatídeos foi descrito a partir da hemolinfa de insetos, como em nosso trabalho. No grupo dos dípteros, há a descrição de invasão da hemolinfa e penetração de glândulas salivares por *Strigomonas culicis*, em infecções experimentais de mosquitos (NASCIMENTO et al., 2010; CORRÊA-DA-SILVA, et al., 2006). Essa invasão da hemolinfa, pode estar associada à transmissão transfásica e/ou persistir durante a diapausa do hospedeiro, como descrito para *H. swainei* na vespa *Neodiprion swainei* (SMIRNOFF e LIPA, 1970).

Com o objetivo de entender melhor a relação parasito-hospedeiro desses dois organismos, realizamos ensaios laboratoriais envolvendo os intestinos *ex vivo*, avaliamos a capacidade de ligação de *H. muscarum* ao epitélio intestinal de *S. calcitrans*. Traçamos um comparativo com a espécie *Leishmania amazonensis*, que sabidamente é capaz de se ligar ao epitélio intestinal de flebotomíneos para manutenção do seu ciclo. Nossos testes demonstraram que indivíduos da espécie *H. muscarum* se ligam em maior número as células intestinais de *S. calcitrans* do que *L. amazonensis*. Nossas imagens de microscopia eletrônica geradas a partir dessas interações *ex vivo* nos permitiram visualizar a interação dos parasitos com o epitélio intestinal, tanto individualmente, quanto na forma de rosetas. A ligação aos tecidos do hospedeiros por cinetoplastídeos atualmente é conhecida com início através da interação do flagelo ou da região da bolsa flagelar com o epitélio. Após a fixação, essa célula aderida poderá se replicar, formando rosetas (ROWTON e BARCLAY, 1978; LIU, HU e LI, 2013; SVÄRD et al., 1998). Em *Leishmania* spp, o Lipofosfoglicano (LPG), é o principal glicoconjugado de superfície de promastigotas, e é um importante mediador da adesão do parasita ao intestino médio do flebotomíneos através de uma galectina de inseto (ROWTON e BARCLAY, 1978; BEVERLEY, 2003). Outro mediador também conhecido para *Leishmania* spp é o GP63s, também conhecidas como Leishmanolisinas, que consistem em metaloproteases de superfície ancoradas em GPI que estão envolvidas na adesão dos parasitos nas interações parasita-hospedeiro (KANGUSSU-MARCOLINO, 2013; DE PAIVA et al., 2015). Essa molécula possui importante ação no processo de evasão de *Leishmania* spp. do sistema imune de vertebrados, assim como auxilia na ligação e invasão da células de mamíferos pelo flagelado (DE PAIVA et al., 2015; FANKHAUSER e MÄSER, 2005; Darlyuk, I. et al., 2009). Já existe a descrição dessas proteínas em outras de cinetoplastídeos examinadas até o momento, como em *Phytomonas* (ZOLTNER et al., 2018) e *Crithidia fasciculada* (MARCHESE, L. et al., 2018). Para os tripanossomatídeos monoxênicos *C. deanei*, *C. guilhermei* e *Herpetomonas megaseliae*, essas proteínas possuem um papel na adesão aos tecidos de insetos, não sendo esse ainda muito esclarecido. Por serem proteases, existe a hipótese de que podem ajudar na remodelação de substratos ou tecidos

facilitando a adesão (CHEN et al., 1995; LYE et al., 2010).

Nas avaliações de interação *in vivo*, vimos que o parasito *H. muscarum* foi detectado até 24 horas nos intestinos das moscas alimentadas com o mesmo. Em avaliações ainda incompletas, acompanhamos as moscas até 72 horas após a infecção oral, tendo elas apresentado parasitos no seu intestino até 48 horas após a sua alimentação. Segundo Frolov e colaboradores (2021) o gênero *Herpetomonas* pode se alojar nos túbulos de Malpighi em dípteros. Em nossos ensaios, avaliamos somente o intestino, sendo interessante que os experimentos de infecção oral sejam repetidos, para avaliação de outros órgãos, como os túbulos de Malpighi e as glândulas salivares. Até as 24 horas após a alimentação infectada, não detectamos parasitos na hemolinfa das moscas expostas a infecção.

Ainda em testes *in vivo*, avaliamos os parâmetros de desenvolvimento de *S. calcitrans* após alimentação infectiva. Nesses ensaios, vimos que moscas alimentadas com o flagelado *H. muscarum* não tem sua longevidade afetada, assim como sua oviposição. Porém, a eclosão dos ovos e a conversão de larvas em pupas e de pupas em adultos foi reduzida nos grupos infectados. Em testes de *D. melanogaster* infectada com *H. muscarum*, a ovoposição também ficou inalterada (SLOAN, 2019). O fenômeno de fecundidade reduzida diante de infecções já é uma coisa bem estabelecida, onde existe uma realocação de recursos, onde o hospedeiro pode reduzir seu esforço reprodutivo para reunir recursos para a resolução da infecção. Isso pode até mesmo tornar os indivíduos infectados mais longevos em comparação aos não infectados, como em *D. melanogaster*, que infectado com *H. muscarum* teve uma extensão no seu tempo de vida útil (WANG, SLOAN e LIGOSYAKIS, 2019). Na prole dos indivíduos infectados em nossos experimentos, não foi detectada a presença do parasito nem em seus intestinos, nem em sua hemolinfa. Porém o experimento foi realizado somente uma vez, sendo necessárias mais repetições para corroborar nossos dados.

Nossos resultados demonstram que *H. muscarum* foi capaz de se fixar e sobreviver temporariamente no intestino de *S. calcitrans*. Existem descrições de tripanossomatídeos capazes de infectar insetos que não são seus hospedeiros naturais, como *Blatocrithidia culicis* na interação com *Aedes aegypti* (CORRÊA-DA-SILVA et al., 2006), o que demonstra novamente que a seletividade dos monoxênicos por seus hospedeiros pode ser baixa. Nossos resultados são animadores, demonstrando um grau de interação entre *Stomoxys calcitrans* e *Herpetomonas muscarum*. Do ponto de vista experimental, nossos resultados se tornam muito interessantes, quando visamos um modelo para estudos de relação parasito-vetor. Sloan e colaboradores (2019) demonstraram que o genoma e o transcriptoma de *H. muscarum*, quando em cultura e infectando o intestino de um hospedeiro natural, *D. melanogaster*, demonstraram similaridade com o genoma de *Leishmania*, onde no genoma a maior sintonia foi com *L. major*

e no transcriptoma, fortes paralelos com as respostas de promastigotas de *Leishmania* dentro do intestino de flebotomíneos foi mostrado. Nesse último caso ambos os parasitas mostrando aumento significativo de PSAs e GP63, que são proteínas associadas à virulência em *Leishmania*, sendo importantes para o estabelecimento da infecção parasitária no intestino médio de flebotomíneo e, portanto, sendo essencial no seu processo de transmissão. Com as similaridades atribuídas a *H. muscarum* em relação a *Leishmania* spp., o estabelecimento de infecção da mesma em *S. calcitrans* para estudos de interação seria muito interessante, podendo as avaliações feitas serem extrapoladas para outros grupos filogeneticamente relacionados.

Mais estudos são necessários para explorar e entender a relação entre esses dois organismos. Porém os resultados aqui encontrados corroboram com informações disponíveis na literatura e nos impulsionam para mais testes que possibilitem o estabelecimento de um modelo de estudo que possa forecer mais dados sobre a fisiologia desse inseto. Além de dos benefícios do modelo parasito-hospedeiro, o conhecimento das respostas de *S. calcitrans* frente a desafios, nos faz entender melhor sua biologia e fisiologia, auxiliando também no traçado de estratégias para o controle dessa mosca que é, até então, uma praga pecuária.

**CAPÍTULO II – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HEMÓCITOS  
CIRCULANTES DE *Stomoxys calcitrans***

## RESUMO

ROSA, Dayana Palmeira da Silva. ***Stomoxys calcitrans*: primeira identificação de infecção natural por *Herpetomonas muscarum*, aspectos de sua interação e caracterização de hemócitos circulantes**. 2022. 101 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Atualmente, a importância da espécie *Stomoxys calcitrans* dentro da produção pecuária é bem conhecida, uma vez que a espécie cosmopolita e hematófaga possui um hábito alimentar é agressivo e persistente, tendo como hospedeiros preferenciais espécies importantes para a pecuária mundial. Tendo isso em vista ela é caracterizada como uma praga, sendo capaz de reduzir o peso e produção de leite em criações. Além da relevância econômica, também podemos destacar sua atuação na disseminação de doenças, agindo como vetor mecânico de diversos patógenos. A melhor ferramenta no combate da disseminação de enfermidades é o conhecimento dos seus agentes efetores. Sendo assim, conhecer e compreender os componentes celulares do sistema imune dessa mosca e a relação do organismo de *S. calcitrans* com os patógenos que transmite é fundamental para esclarecer as vias envolvidas nessas interações, identificando os melhores alvos de pesquisa para desenvolvimento de técnicas de controle dessa praga pecuária. Dessa maneira, neste trabalho isolamos e contabilizamos o número de hemócitos circulantes em diferentes fases evolutivas dessa mosca, identificando maiores populações nos indivíduos de campo avaliados. A partir do isolamento, pudemos identificar e caracterizar esses hemócitos em quatro tipos, sendo eles: prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos e oenocitóides. Os prohemócitos foram as células em menor quantidade nas avaliações, e os plasmatócitos foram as células mais abundantes. Diante do enfrentamento de uma infecção experimental por *Herpetomonas muscarum*, o tempo de maior resposta hemocitária foi duas horas após a injeção do tripanossomatídeo. De maneira geral, as população dos diferentes tipos de hemócitos aumentaram pós infecção, com exceção dos prohemócitos, que sofreram uma baixa. Também foi avaliada a produção de ETs por *S. calcitrans* estimulada com LPS, onde foi possível identificar a liberação de DNA após estímulo. Mais avaliações devem ser realizadas, para maior entendimento das reações hemocitárias de *S. calcitrans*, mas esse trabalho já elucida tipos de hemócitos presentes na sua circulação e métodos de extração dos mesmos.

Palavras chave: vetores mecânicos, sistema imune, pecuária.



## ABSTRACT

ROSA, Dayana Palmeira da Silva. ***Stomoxys calcitrans*: first identification of natural infection by *Herpetomonas muscarum*, aspects of its interaction and characterization of circulating hemocytes**. 2022. 101 p. Thesis (Doctorate of Veterinary Science). Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Currently, the importance of the *Stomoxys calcitrans* species within livestock production is well known, since the cosmopolitan and hematophagous species has an aggressive and persistent feeding habit, having as preferred hosts important species for world livestock. With that in mind, it is characterized as a pest, being able to reduce weight and milk production in creations. In addition to its economic relevance, we can also highlight its role in the spread of diseases, acting as a mechanical vector of various pathogens. The best tool in combating the spread of diseases is knowledge of their effector agents. Therefore, knowing and understanding the cellular components of the immune system of this fly and the relationship between the *S. calcitrans* organism and the pathogens it transmits is essential to clarify the pathways involved in these interactions, identifying the best research targets for the development of control techniques of this livestock pest. Thus, in this work we isolated and counted the number of circulating hemocytes in different evolutionary stages of this fly, identifying larger populations in the evaluated field individuals. From the isolation, we were able to identify and characterize these hemocytes into four types, namely: prohemocytes, granulocytes, plasmatocytes and oenocytoids. Prohemocytes were the cells in the smallest amount in the evaluations, and plasmatocytes were the most abundant cells. When facing an experimental infection by *Herpetomonas muscarum*, the time of greatest hemocytic response was two hours after the trypanosomatid injection. In general, the population of different types of hemocytes increased after infection, with the exception of prohemocytes, which suffered a decrease. The production of ETs by *S. calcitrans* stimulated with LPS was also evaluated, where it was possible to identify the release of DNA after stimulation. More evaluations must be carried out, for a better understanding of the hemocyte reactions of *S. calcitrans*, but this work already elucidates types of hemocytes present in its circulation and methods of their extraction.

Keywords: mechanical vectors, immune system, livestock.

## 7. INTRODUÇÃO

No capítulo anterior abordamos a interação de *S. calcitrans* com o seu parasito *H. muscarum*. Como citado anteriormente, os hábitos alimentares dessa mosca são fundamentais para sua relevância econômica e epidemiológica. Em posse desse conhecimento, assim como a capacidade de dispersão de *S. calcitrans*, é possível inferir que as mesmas entram em contato com muitos microorganismos, culminando em diferentes respostas imunológicas perante a esses constantes desafios. Para a neutralização de possíveis infecções por diferentes microorganismos, a resposta mediada por componentes celulares conhecidos como hemócitos, desempenha um importante papel para a manutenção da vida dessa espécie. As vias de atuação dessas células podem ser através de mecanismos como fagocitose, encapsulação, nodulação e melanização.

Assim como os mamíferos, a população celular nos insetos se subdivide em grupos, com compartimentalização de funções e atuação junto a respostas humorais. Os tipos mais comuns de hemócitos relatados na literatura são prohemócitos, células granulares (granulócitos), plasmócitos, células de esférulas (esferulócitos) e oenocitóides.

Cada inseto possui peculiaridades morfológicas, de maneira que para cada espécie, métodos diferentes de extração de hemolinfa e isolamento de hemócitos são necessários. Nesse capítulo demonstraremos a técnica desenvolvida para a extração da hemolinfa de *S. calcitrans*, assim como para a fixação e visualização das suas células de defesa.

A classificação dos tipos de hemócitos em insetos ainda não atingiu um consenso, sendo baseada principalmente em características morfológicas. A mosca dos estábulos ainda não possui uma caracterização eficiente dessas células. Nesse trabalho, isolaremos e caracterizaremos os hemócitos circulantes de *S. calcitrans*, além de avaliá-los diante do estímulo infectivo a partir da inoculação de *H. muscarum*, isolado da sua hemolinfa no capítulo anterior.

O entendimento da fisiologia dos insetos dispersores de enfermidades é muito importante para conhecer a dinâmica dessas doenças e estabelecer estratégias de controle populacional de vetores. Sendo assim, a resposta imune de *S. calcitrans* frente a desafios ambientais e parasitológicos consiste numa biblioteca de conhecimentos essenciais para o combate e diminuição das suas populações em ambientes de criação.

## 8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 8.1. Sistema Imune em Insetos

Na natureza, os insetos estão expostos a uma gama de microrganismos, muitas vezes patogênicos, sejam eles oriundos do seu habitat ou da sua alimentação. Evolutivamente, estratégias de enfrentamento foram montadas, como mudanças na sua fisiologia, desenvolvimento e comportamento (MORET e MOREAU, 2012). Frente a essas modificações, somente uma parcela dos desafios encontrados são convertidos a uma enfermidade. Podemos exemplificar como uma primeira linha de defesa, as adaptações comportamentais, seguidas das barreiras corporais, como: o exoesqueleto, os epitélios traqueal e intestinal e a matriz peritrófica (PRADEEP *et al.*, 2013; HAINE, ROLFF, SIVA-JOTHY, 2007). Medidas profiláticas também são comuns na rotina de insetos, como afastamento de ambientes que possuam microrganismos nocivos, escolha de substratos para oviposição e alimentação (PRADEEP *et al.*, 2013; DZIEDZIECH, SHIVANKAR, THEOPOLD, 2020; DUSHAY, 2009). Quando todas as medidas preventivas falham e a infecção tem sucesso, uma resposta imune se faz necessária, através de respostas celulares e humorais (BIDLA *et al.*, 2005; DUDZIC, *et al.*, 2015). Essas duas respostas funcionam intimamente interconectadas, promovendo uma rápida identificação e destruição ou imobilização dos patógenos invasores (VILMOS E KURUCZ, 1998). Dividir a resposta imune de insetos em humoral e celular é um pouco arbitrário, uma vez que são ações muitas vezes complementares, com fatores humorais afetando a função dos hemócitos e hemócitos produzindo importantes moléculas humorais.

A ativação do sistema imunológico de insetos é realizada a partir do reconhecimento de padrões por uma variedade de receptores de reconhecimento, desencadeando as vias de sinalização Toll, IMD e JAK/STAT, para a produção de moléculas efetoras, podendo ser elas: peptídeos antimicrobianos (AMPs), proteínas do tipo complemento, óxido nítrico e componentes da cascata pró-fenoloxidase (BARTHOLOMAY e MICHEL, 2018).

Inicialmente, a resposta imunológica partirá do reconhecimento de moléculas externas, que ocorre geralmente, através do reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pela ligação aos receptores de reconhecimento de padrões derivados do hospedeiro (PPRs). Esses irão reconhecer os motivos conservados presentes em microrganismos, mas ausentes nos insetos. Pode-se citar como exemplo de PAMPs os peptidoglicanos bacterianos e  $\beta$ -1,3 glucanos fúngicos (HILLYER, 2016).

Uma das vias de sinalização já citadas aqui, consiste na via Toll, que está envolvida

evolutivamente tanto no desenvolvimento dos insetos, quanto na sua imunidade (CAO et al., 2015 ; CLAYTON et al., 2014 ; LINDSAY e WASSERMAN, 2014). Em se tratando de imunidade, a via Toll é iniciada quando os PRR's ativam uma citocina extracelular chamada Spätzle, que irá se ligar ao receptor celular Toll. A transdução de sinal resultante dessa ativação levará a translocação nuclear de fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, que por sua vez, ativarão a transcrição de AMPs e de outros genes efetores imunes. Essa via é eficiente, principalmente no combate a bactérias Gram(+), vírus, fungos e, no caso de mosquitos, alguns plasmódios (HILLYER, 2016).

Já a via Imd é ativada no momento em que um PAMP se liga ao receptor extracelular PGPR-LC. A partir daí, assim como na via Toll, a sinalização desencadeada leva à translocação nuclear de fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e conseqüentemente, à ativação transcricional de peptídeos antimicrobianos e outros genes efetores imunes. Essa via é eficiente, principalmente no combate a bactérias Gram(-), vírus e de alguns plasmódios em mosquitos.

A via Jak/Stat também está envolvida tanto no desenvolvimento dos insetos, quanto na sua resposta imunológica. Sua inicialização ocorre através da ativação da citocina extracelular Unpaired (Upd) se liga ao receptor celular Domeless (Dome), que por sua vez, será fosforilado por Hopscotch (Hop), recrutando Stat. Stat será dimerizado, translocado para o núcleo, ativando a transcrição de genes antimicrobianos, como a sintase do óxido nítrico. Essa via é eficiente em respostas antibacterianas e antivirais. (CAO et al., 2015 ; CLAYTON et al., 2014 ; KLEINO e SILVERMAN, 2014 ; SIM et al., 2014 ; XU E CHERRY, 2014).

Todas essas vias são reguladas por reguladores negativos intracelulares (moléculas de sinalização intracelular), que funcionam mantendo-as sob controle, sendo eles: Cactus, Caspar e Socs/Pias, regulando Toll, Imd e Jak/Stat, respectivamente (KLEINO e SILVERMAN, 2014; MYLLYMAKI e RAMET, 2014; CLAYTON et al., 2014 ; LINDSAY E WASSERMAN, 2014).

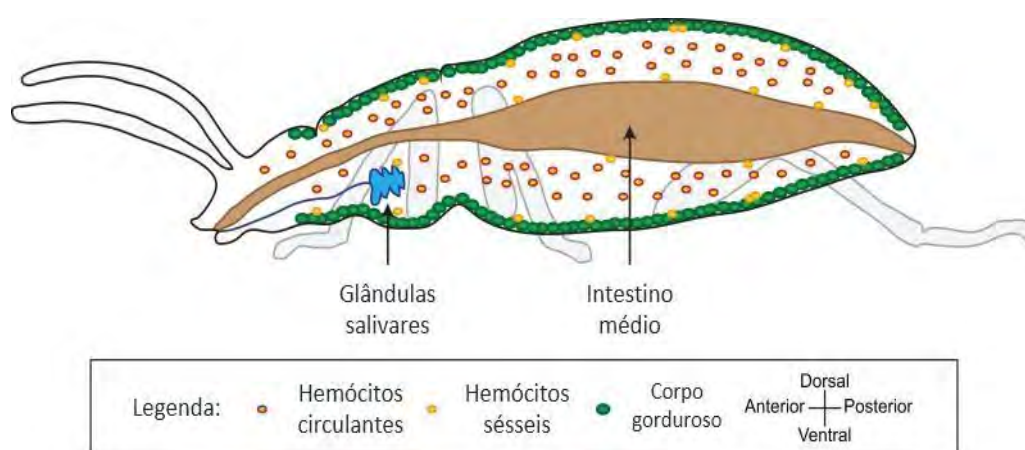
Após o reconhecimento e ativação das vias imunológicas, a produção de AMPs é iniciada. Nesse contexto, o corpo gorduroso, que funcionalmente equivalente ao fígado e tecido adiposo de mamíferos (HOSHIZAKI, 2005) se apresenta como o principal responsável pela síntese de AMPs (BUCHON, SILVERMAN e CHERRY, 2014). Porém, outros tecidos como hemócitos, túbulos de Malpighi e células epiteliais do intestino médio e da traqueia, também podem sintetizar AMPs, principalmente em respostas mais localizadas (DAVIS E ENGSTRÖM, 2012; RUSSELL E DUNN, 1996; GILLESPIE, KANOST e TRENCZEK

1997). As classes de AMPs secretados são baseadas na composição das suas sequências peptídicas ou em suas estruturas secundárias, como por exemplo: AMPs alfa-helicoidais lineares como as cecropinas (DING et al., 2020), defensinas (CONTRERAS et al., 2020) e os AMPs ricos em prolina e glicina (YANG et al., 2018).

Em se tratando de imunidade adaptativa, os insetos não possuem mecanismos como os descritos para vertebrados, com respostas mediadas por anticorpos. Entretanto, alguns insetos apresentam um processo definido como imunopriming, onde ao sofrer uma infecção prévia de uma dose não letal de patógeno, ou alguma parte derivada de um patógeno, seu sofrerá uma elevação na resposta imune, tornando o inseto resistente a uma posterior infecção letal. Essa elevação se deve ao aumento no número de hemócitos circulantes e no aumento da produção de peptídeos antimicrobianos (SHEEHAN, FARRELL E KAVANAGH, 2020).

### 8.1.1. Células imunes em Insetos

Nomeamos as células imunes em insetos como hemócitos (HILLYER e STRAND, 2014). Essas células se encontram na hemocèle dos insetos e podem ser divididas em populações, sendo elas sob o critério de localização espacial (Fig. 16) e sob suas propriedades funcionais. Em se tratando de distribuição espacial podemos classificá-los como: circulantes, que são os hemócitos livres na hemolinfa; e sésseis, que são os hemócitos ligados a tecidos (HILLYER e STRAND, 2014 ; STRAND, 2008). Essa classificação não é considerada fixa, uma vez que os hemócitos livres podem se tornar sésseis ou vice-versa (KING e HILLYER, 2012 ; MARKUS et al., 2009 ; SIGLE e HILLYER, 2016).



**Figura 16:** Distribuição dos hemócitos em insetos. Hemócitos circulantes e sésseis e suas districuições ao longo do corpo do inseto. Fonte: HILLYER, 2016.

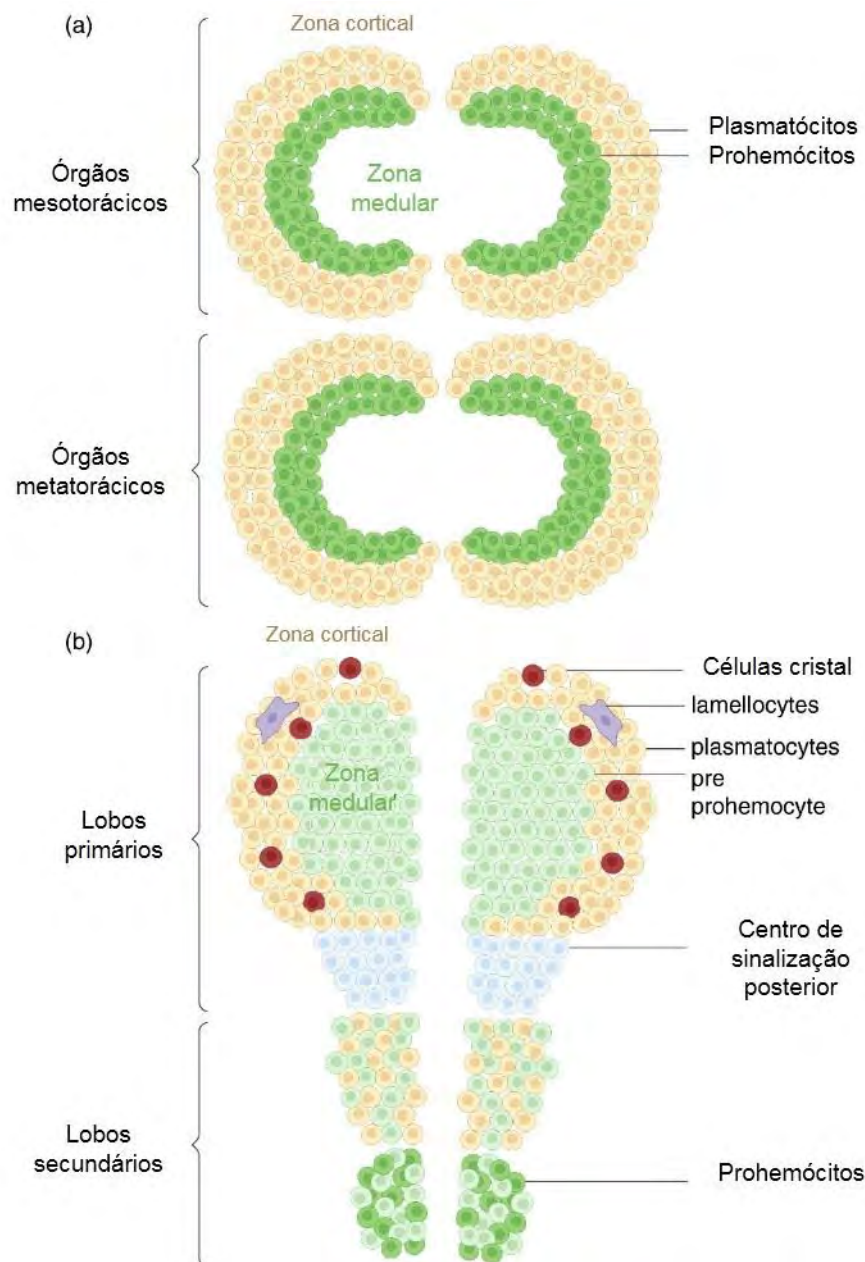
Em se tratando das suas propriedades funcionais, a maioria dos insetos possui diversas subpopulações de hemócitos, morfológica e funcionalmente distintas, porém a definição

dessas classes não é normalizada dentro do grupo Insecta, diferindo muitas vezes de ordem para ordem ou até mesmo de espécie para espécie. Os tipos de hemócitos mais comumente conhecidos para insetos são: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, oenocitóides, esferulócitos, coagulócitos e adipohemócitos (Fig. 17). Porém, nem todo inseto possui todos os tipos, havendo diferentes populações dentro de diferentes grupos. Dentro da classificação, eles são descritos como: pró-hemócitos, que são células pequenas e arredondadas com uma alta proporção núcleo:citoplasma, não possuindo organelas citoplasmáticas especializadas; plasmatócitos, possuindo mais citoplasma que os pró-hemócitos, podendo sua membrana plasmática formar filopódios; granulócitos, contendo grânulos acidófilos eletrodensos, de tamanho regular, em quantidades variáveis; oenocitóides, que são células grandes e ovais, com citoplasma contendo aglomerados de material cristalino e/ou microtúbulos; esferulócitos ou adipohemócitos, que são células com grânulos basofílicos, de tamanho e formato variáveis (HILLYER, 2016; ELEFThERIANOS et al., 2021).

A hematopoiese dessas células não é bem esclarecida nos diferentes grupos dentro da classe Insecta. Em *Drosophila melanogaster*, os hemócitos surgem durante o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário (BANERJEE et al., 2019; LEITÃO e SUCENA, 2015; MAKHIJANI et al., 2011). Na embriogênese, uma primeira população de hemócitos é produzida a partir do mesoderma cefálico ou dorsal, e durante o desenvolvimento pós-embrionário, uma segunda população é produzida em órgãos hematopoiéticos derivados da mesoderme, onde ocorre a maior parte da proliferação e diferenciação celular. Em alguns casos, células sanguíneas maduras circulantes possuem a capacidade de se dividir (GRIGORIAN e HARTENSTEIN, 2013). Esses órgãos fornecem o ambiente celular e molecular adequado para o controle da proliferação e diferenciação celular, nos chamados nichos de células-tronco (MARTINEZ-AGOSTO et al., 2007). Esses os órgãos hematopoiéticos são as glândulas linfáticas. Cada glândula linfática parece possuir um lobo primário anterior e lobos secundários posteriores (Fig. 17b). O lobo primário se subdivide em (1) um centro desinização posterior (PSC) com uma população única de células e (2) duas zonas anteriores: uma zona medular com uma população de pró-hemócitos pluripotentes (que podem ser denominadas células-tronco); uma zona cortical com plasmatócitos, células cristalinas e lamelócitos (JUNG et al., 2005). Já os lobos secundários contêm pré-pro-hemócitos, pró-hemócitos e alguns plasmatócitos. O equilíbrio entre pró-hemócitos e células sanguíneas diferenciadas é moderado pelo PSC (MANDAL et al., 2007). Em larvas de *Drosophila* o desenvolvimento dos hemócitos envolvem duas fases. Na primeira (denominada primitiva ou linhagem embrionária) os hemócitos se desenvolvem a partir do mesoderma

inicial da cabeça do embrião, com a diferenciação em plasmatócitos capazes de se proliferar na circulação durante o estágio larval. Nessa linhagem células cristalinas e lamelócitos podem ser produzidos diante de estímulo. Esses plasmatócitos e células cristalinas são foram também aglomerados residentes (sésseis) em locais subepidérmicos, chamados de ‘bolsas sésseis’ ou ‘bolsas hematopoiéticas’ (LEITÃO e SUCENA, 2015; TEPASS et al., 1994; DE VELASCO et al., 2006). Na segunda fase (linhagem da glândula linfática) se originarão os hemócitos adultos, produzidos na glândula linfática. Nela os pró-hemócitos podem dar origem a todos os hemócitos maduros (KURUCZ et al., 2007; BANERJEE et al, 2019; MANDAL et al., 2007; SINENKO et al., 2009).

Em lepidópteros, os órgãos hematopoiéticos são estruturas unilobadas (Fig. 17a), localizadas como órgãos pareados em cada um dos meso e metatórax (HINKS e ARNOLD, 1977; NARDI et al., 2003). Os pró-hemócitos e os plasmatócitos são os principais tipos de célula encontrados na região medular do órgão hematopoiético. Sugestivamente, pode-se inferir que os plasmatócitos de lepidópteros são derivados basicamente de células progenitoras de órgãos hematopoiéticos, enquanto a maior parte dos granulócitos, oenocitóides e esferulócitos é derivada de hemócitos circulante com capacidade de proliferação (STRAND, 2008).



**Figura 17:** Órgão hematopoiéticos em Lepidópteros e em *Drosophila melanogaster*. (a) Órgãos hematopoiéticos do 6º instar *Spodoptera frugiperda*. (b) Gânglio linfático larval de *Drosophila melanogaster*.

### 8.1.2. Respostas imunes celulares

Essas respostas se referem as ações mediadas por componentes celulares, que integram parte fundamental do sistema imune dos insetos, sendo fortemente conservado nesse grupo (LAVINE; STRAND, 2002). Nesse processo, as células de defesa, conhecidas como hemócitos, englobam os microrganismos, sendo esta a resposta inicial ao contato com os agentes patológicos, como bactérias, fungos, protozoários e vírus (BARILLAS-MURY *et al.*, 2004). E eles também são responsáveis pela produção de moléculas importantes nas defesas imunes humorais, como os peptídeos (AMPs) e proteínas antimicrobianas (lisozimas,



transferrinas, lectinas do tipo C, proteínas de reconhecimento de peptidoglicano – PGRPs - proteínas de reconhecimento de  $\beta$ -1,3-glucano –  $\beta$ GRPs - e galectinas – GALE's, que são liberados na hemolinfa após uma invasão ou dano tecidual (ELEFThERIANOS et al., 2021). Dentre as mais variadas funções imunológicas dos hemócitos, as mais reconhecidas são: a fagocitose, a nodulação e o encapsulamento (Fig. 18).

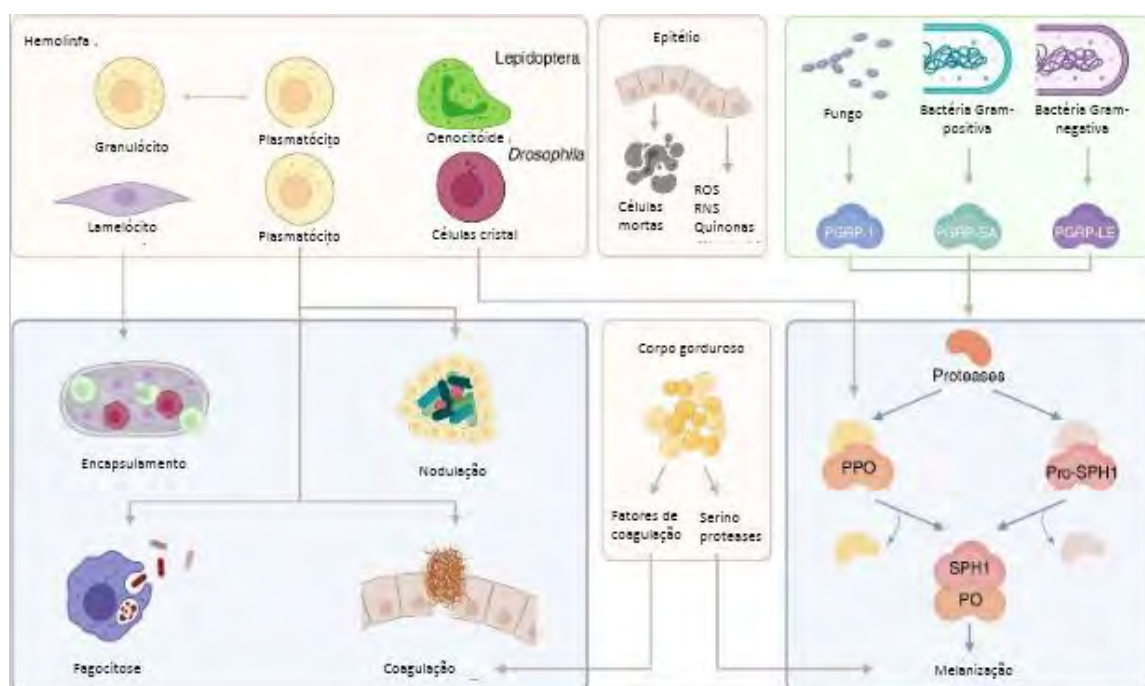
A fagocitose é uma resposta de defesa imune e consiste na internalização de patógenos invasores e de células apoptóticas (MELCARNE, LEMAITRE e KURANT, 2019). Em Lepidoptera granulócitos e plasmatócitos são responsáveis por essa função, já em *Drosophila*, os plasmatócitos são responsáveis por ela (MELCARNE et al., 2019). O reconhecimento do microorganismo é direto, através da ligação do hemócito à sua superfície ou possui mediadores opsônicos, responsáveis por marcar o objeto a ser fagocitado (RITTIG et al., 1996).

O processo de nodulação envolve o aprisionamento de bactérias ou objetos estranhos no coágulo, que é formado pelos grânulos liberados por granulócitos, podendo passar por uma posterior melanização por conta de hemócitos necróticos. Esses nódulos consistem em agregados de hemócitos recrutados até o local infectado, para o aprisionamento do maior número de bactérias ou esporos de fungos possível (SATYAVATHI, MINZ e NAGARAJU, 2014). Essa indução nodular pode ocorrer pela identificação de PAMPs do invasor (DUBOVSKIY et al., 2016). As células envolvidas nessas estruturas são os granulócitos e plasmócitos, podendo esses agregados aderirem aos tecidos do hospedeiro, com nódulos maiores sendo encapsulados (RATCLIFFE E GAGEN, 1977; TOKURA et al., 2014).

Quando objetos invasores são muito grandes e não podem ser fagocitados, o processo de encapsulamento é iniciado. Nesse mesmo múltiplas camadas de hemócitos e/ou um revestimento de melanina são depositados o invasor (BROWNE, HEELAN e KAVANAGH, 2013; DUBOVSKIY et al., 2016). São reconhecidos dois tipos de encapsulamento em insetos: o celular, descrito principalmente em Lepidoptera, e o humoral melanótico, mais comum dípteros. No encapsulamento celular, o processo pode acontecer com ou sem sinal de melanização. Já o melanótico envolve atividade de fenoloxidase (PO) e podendo ocorrer com ou sem participação de hemócitos. No encapsulamento celular, granulócitos e plasmatócitos de Lepidoptera, e plasmatócitos e lamelócitos de *Drosophila*, são os principais tipos de hemócitos envolvidos. Outros hemócitos podem estar envolvidos nesse processo também, como células cristalinas em *Drosophila* e oenocitóides em outros insetos também desempenhando um papel na melanização da cápsula (MORTIMER et al., 2012; ONU et al., 2020). A melanização fornece substâncias tóxicas como quinonas e outros produtos

intermediários de curto período, que darão origem a melanina. O processo de melanização tem início com o sistema da pro-fenoloxidase, com a ativação da mesma sendo modulada por serina inibidores de proteases (Serpinas), visando sempre um equilíbrio para evitar os efeitos deletérios oriundos dos intermediários tóxicos da melanização (SILVA, 2002; MEEKINS, KANOST e MICHEL, 2017).

Diante de uma ruptura ou dano tecidual, a hemolinfa coagula na área lesada (HAINE, ROLFF e SIVA-JOTHY, 2007; DZIEDZIECH, SHIVANKAR e THEOPOLD, 2020). Esse processo de coagulação parte das citocinas quimiotáticas liberadas pelas células epiteliais danificadas (como a hemocinina), que podem ser moléculas sinalizadoras e/ou peptídeos de adesão que irão induzir a agregação rápida de hemócitos (NAKATOGAWA et al., 2009). A partir daí, ocorrerá a agregação de hemócitos como plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides. Os granulócitos sofrerão uma ruptura e degranulação na hemolinfa, liberando uma matriz extracelular que formará um coágulo mole para selar o tecido lesado (DUSHAY, 2009; APRELEV et al., 2019). Posteriormente, a cascata/transglutaminase da profenoloxidase (PPO) será ativada, para a melanização do coágulo, formando o coágulo duro.



**Figura 18:** Respostas imunes celulares. Processos envolvendo hemócitos em representação esquemática. Fonte: ELEFTHERIANOS et al., 2021.

Um importante mecanismo mediado por células do sistema imune também foi descrito primeiramente em humanos, denominado NETosis, onde neutrófilos são capazes de liberar de armadilhas extracelulares (NETs). Nessa reação, a cromatina descondensada de neutrófilos, que está associada a algumas moléculas encontradas em seus grânulos e citoplasma, é liberada para o meio extracelular, sendo capaz de capturar e matar

microrganismos (BRINKMANN et al., 2004; FUCHS et al., 2007). Como outros tipos celulares também são capazes de realizar essa liberação, o processo foi renomeado como ‘armadilhas extracelulares’ (extracellular traps - ETs). Essas mesmas consistem em estruturas semelhantes a teias compostas de DNA e histonas, e ao capturarem microrganismos, evitam sua disseminação, concentrando moléculas antimicrobianas, facilitando a eliminação dos microrganismos patogênicos (NASCIMENTO et al., 2018).

Com o conhecimento dos mecanismos de defesa de um organismo, podemos traçar estratégias mais eficientes de controle e manipulação do mesmo. O sistema imune dos insetos é um importante fator interativo desse grupo com o ambiente e os microrganismos que o compõem. Em posse dos componentes desse sistema, podemos inferir melhores medidas de controle populacional de *S. calcitrans*, assim como, conseguimos interpretar melhor o seu papel epidemiológico diante da disseminação de patógenos. Sendo assim, esse trabalho visa isolar, identificar e caracterizar os hemócitos circulante de *S. calcitrans*.

## 9. MATERIAIS E MÉTODOS

### 9.1. Insetos e Protozoário

#### 9.1.1. Insetos

As moscas adultas utilizadas nos experimentos foram obtidas em duas situações: 1. Moscas do campo (C) coletadas em animais da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz da UFRRJ; 2. Moscas provenientes da colônia (Co) de *Stomoxys calcitrans* (FLORÊNCIO et al., 2020 adaptado – ANEXO I), mantida no laboratório de Parasitos e Vetores, coordenados pela Professora Patrícia Fampa (Fig.19).

As moscas do campo são previamente selecionadas e triadas antes de serem introduzidas na colônia, ou utilizadas experimentalmente (FLORÊNCIO et al., 2020 adaptado).



**Figura 19:** A- Coleta de moscas no campus da UFRRJ; B- Colônia de *Stomoxys calcitrans*, ICBS/UFRRJ.

#### 9.1.2. Protozoário

O protozoário *Herpetomonas muscarum* foi isolado de hemolinfa de *S. calcitrans* como parte do presente trabalho e depositado na Coleção de Protozoários da Fiocruz. Entretanto, sua caracterização está descrita no Capítulo II da tese. Para os experimentos, foi obtido da Coleção de Protozoários da FIOCRUZ, sob os registros 925 e 926. Sua cultura axênica foi cultivada em meio LIT suplementado com soro bovino fetal inativado (10%) e mantida a 27° C em B.O.D.

### 9.2. Coleta de Hemolinfa

Para a coleta de hemolinfa em moscas adultas do campo de ambos os sexos ou recém-emergidas foram adormecidas em gelo por cerca de 1 a 2 minutos; em seguida, com auxílio de uma microseringa, através de uma perfusão na região torácica dorsal do inseto, foram

inoculados 3 $\mu$ L de uma solução de PBS + anticoagulante (98 mM NaOH, 145 mM NaCl, 1,7 mM e EDTA e 41 mM de Ácido Cítrico) na proporção de 6:1 (Figura 7). Para a coleta da hemolinfa em larvas no último estágio de desenvolvimento, as mesmas foram fixadas em isopor com alfinetes em suas duas extremidades. A hemolinfa externalizada pelos furos foi lavada com solução de PBS + anticoagulante (98 mM NaOH, 145 mM NaCl, 1,7 mM e EDTA e 41 mM de Ácido Cítrico) na proporção de 6:1 e recolhida com a auxílio de uma microseringa (Fig. 20).



**Figura 20:** Procedimento de coleta de hemolinfa em *Stomoxys calcitrans*.

### 9.3. Caracterização Morfológica dos Tipos de Hemócitos Livres

Moscas adultas de campo e de colônia não sexadas foram anestesiadas e tiveram sua hemolinfa coletada conforme descrito no item 7.2. Após a coleta, uma gota de hemolinfa foi transferida para uma lâmina de vidro limpa, sendo então realizada a técnica da gota espessa, com a secagem em câmara úmida por 30 minutos para melhor adesão dos hemócitos à lâmina. Decorrido esse tempo, a fixação do material foi feita em Metanol (por 3 minutos), a coloração com solução Giemsa (Merck Millipore, MA, USA) por 10 minutos. A observação celular foi realizada por microscopia óptica de campo claro (Microscópio Biológico Trinocular Kasvi), com captura de imagens por câmara Mícron Scientific, pelo software Capture 2.2.1.

### 9.4. Contagem Diferencial e Medição dos Hemócitos Circulantes de *Stomoxys calcitrans*

A hemolinfa foi coletada e processada conforme o item 7.3 de moscas de colônia

adultas não sexadas. Cada indivíduo foi analisado isoladamente, tendo seus hemócitos aderidos em lâmina lisa. Todas as células aderidas foram contabilizadas em cada indivíduo, utilizando a classificação obtida nesse trabalho. As mesmas foram medidas através do software Capture 2.2.1.

### **9.5. Análise do Perfil Hemocitário de *Stomoxys calcitrans* Desafiada Com Patógeno**

Moscas recém emergidas (1-3 dias), alimentadas com sangue foram inoculadas com 0,4 µL solução de PBS com (infectadas) ou sem (controle) o parasito *Herpetomonas muscarum* na concentração de  $5 \times 10^4$ . Após 2, 4 e 6 horas de infecção sua hemolinfa como descrito acima e avaliada conforme o item 7.2. Todas as células fixadas e coradas em lâmina foram contabilizadas.

### **9.6. Análise Por Citometria de Fluxo**

A hemolinfa de um pool de 20 moscas de colônia, não sexadas, foi coletada, mantida em PBS, tendo seus hemócitos imediatamente analisados quanto ao seu tamanho e granulosidade. Após a aquisição dos perfis dos hemócitos circulantes, estes foram analisados através do *software* BD CellQuest™.

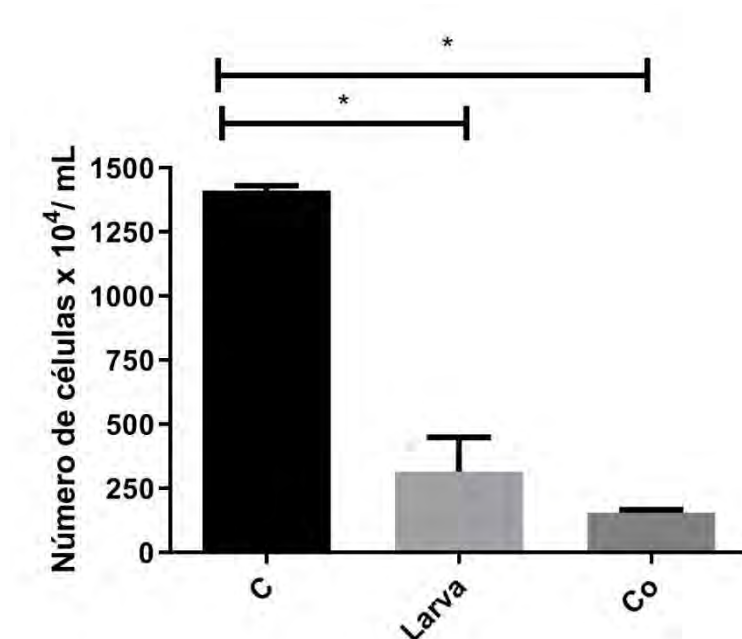
### **9.7. Quantificação de Armadilhas Extracelulares (ETs)**

A hemolinfa de grupos de 10 moscas foi coletada para cada condição realizada conforme descrito anteriormente, sendo adicionada a placas de 96 poços estéreis, deixadas por 40 min., para que os hemócitos pudessem aderir ao fundo dos poços. Após esse tempo, a hemolinfa foi retirada, de maneira a deixar somente os hemócitos aderidos ao poço, configurando os hemócitos agrupados (que não possuem a presença de hemolinfa). Esses foram estimulados por 1 h com lipopolissacarídeo inteiro (LPS; de *Escherichia coli*; 0111:B4-Sigma-Aldrich, MO, USA) nas concentrações de 1 e 5 µg/mL em 100 µL de PBS. Após 1 h de incubação, as amostras foram centrifugadas a  $200 \times g$  por 10 min para sedimentar os hemócitos, e os sobrenadantes foram centrifugados novamente a 10.000 rpm por 10 min. Os ETs nos sobrenadantes foram quantificados usando o kit Picogreen dsDNA (Invitrogen, MA, USA), conforme descrito (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009). As concentrações de DNA foram calculadas usando DNA de arenque (Sigma-Aldrich) como padrão.

## 10. RESULTADOS

### 10.1. Contagem Absoluta de Hemócitos Circulantes de *Stomoxys calcitrans*

A análise dos hemócitos circulantes nos diferentes estágios de desenvolvimento de *S. calcitrans* foi realizada com a coleta de material de 15 moscas do campo (C) não sexadas, 12 larvas e 15 moscas de colônia não sexadas (Co). Os valores encontrados na contagem em câmara de Neubauer foram, respectivamente  $1,4 \times 10^7$  células/mL,  $0,63 \times 10^7$  células/mL e  $0,164 \times 10^7$  células/mL (Fig.21).



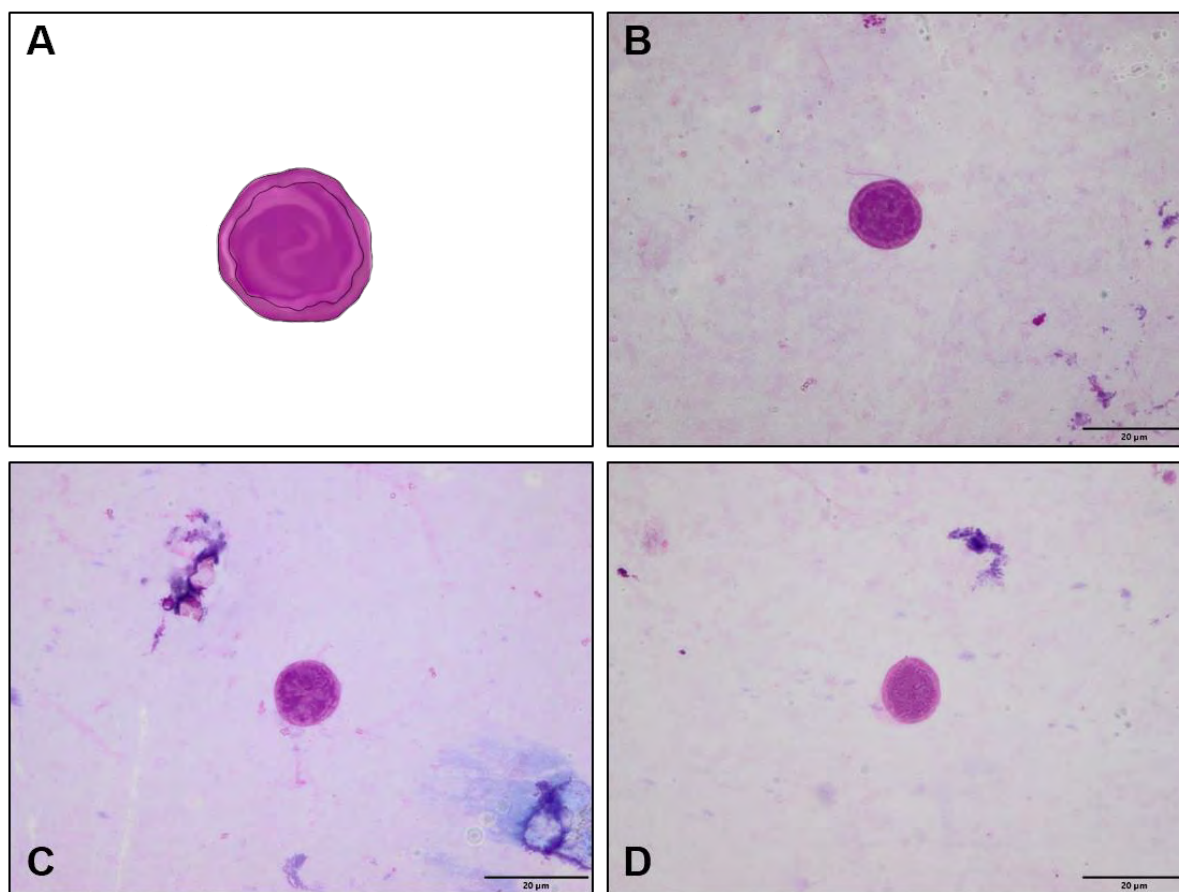
**Figura 21:** Contagem absoluta de hemócitos circulantes de *S. calcitrans* avaliados a fresco por microscopia de campo claro, em câmara de Neubauer. A- Indivíduos do campo adultos (C); B- Larvas provenientes de colônia; C- Indivíduos adultos de colônia (Co). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle. Experimento realizado em duplicata experimental.

### 10.2. Caracterização dos Tipos Celulares

Após a extração da hemolinfa de indivíduos adultos, a mesma foi processada como descrito na metodologia, sendo os hemócitos fixados e corados com Giemsa. Quatro tipos de hemócitos foram identificados e classificados tendo como base os parâmetros de: tamanho, morfologia e propriedades de coloração. Os tipos celulares classificados foram:

**Prohemócitos** – são células arredondadas ou ovais, que possuem núcleos centrais e volumosos, com uma proporção alta de núcleo:citoplasma. É o menor tipo celular encontrado, tendo em média  $8,026 \pm 1,08 \mu\text{m}$  de diâmetro. São o tipo celular menos observado (Fig. 22).

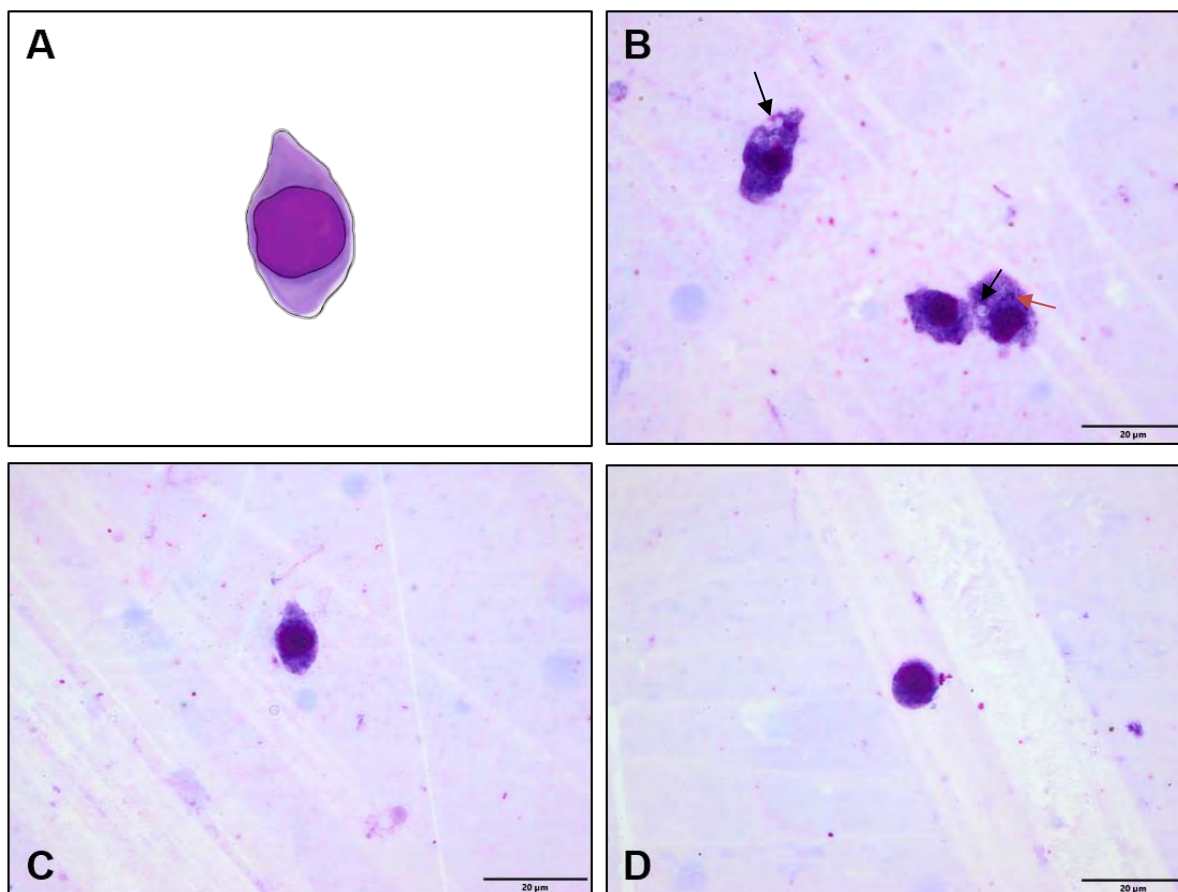




**Figura 22:** Prohemócitos circulantes de *Stomoxys calcitrans*. **A** – Caracterizaçõesquemática do tipo celular. **B-D** – Prohemócitos isolados da hemolinfa, fixados com Metanol, corados com Giemsa e analisados por microscopia de campo claro. Escala 20 µm.

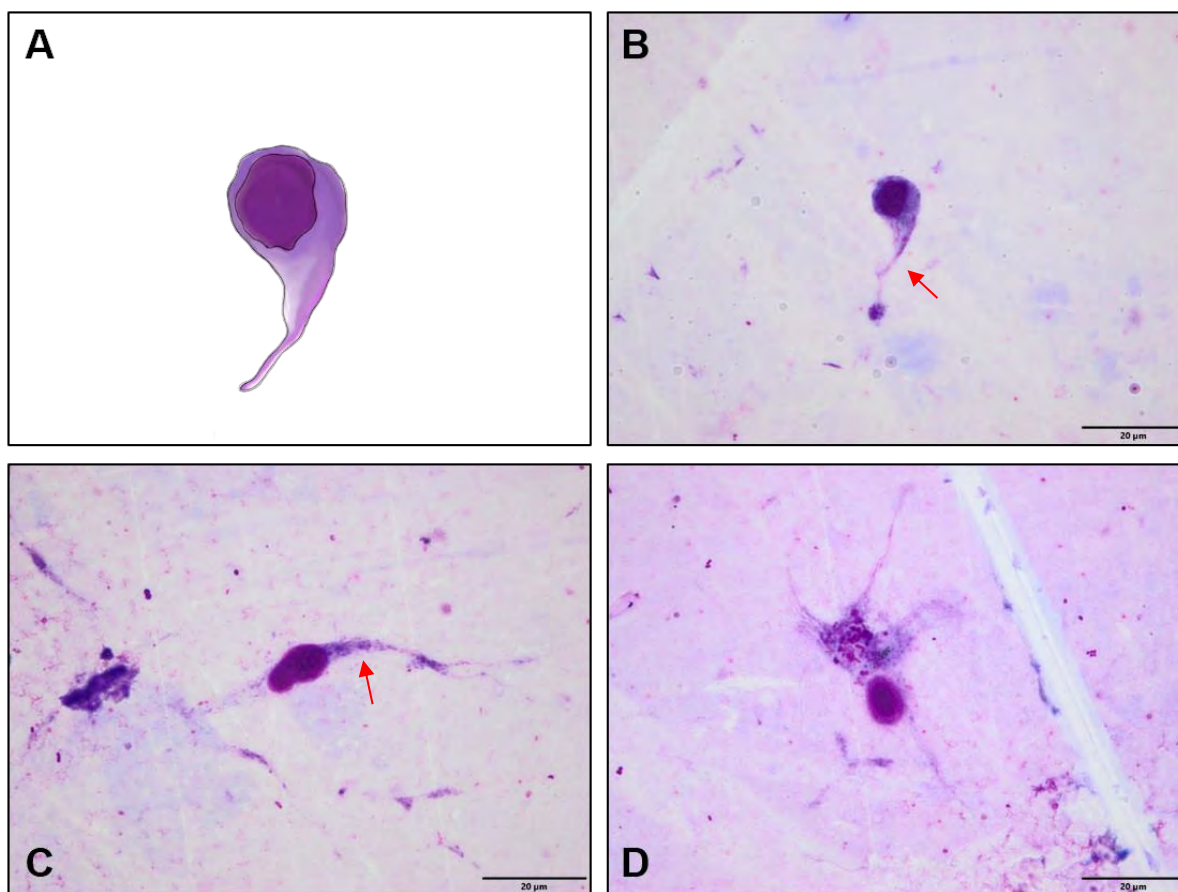
**Granulócitos** – são células arredondadas ou ovais, com a membrana plasmática irregular, podendo ter pequenas projeções. Foi detectada a presença de grânulos em pequena quantidade com coloração roxo escuro ou rosa em seu citoplasma (Fig. 23B, seta vermelha). Também foi observada a presença de vacúolos no interior do seu citoplasma (Fig. 23B, seta preta). Os núcleos geralmente se encontravam na periferia das membranas, raramente centrais. Seu tamanho era, em média, de  $11,810 \pm 1,25 \mu\text{m}$ .





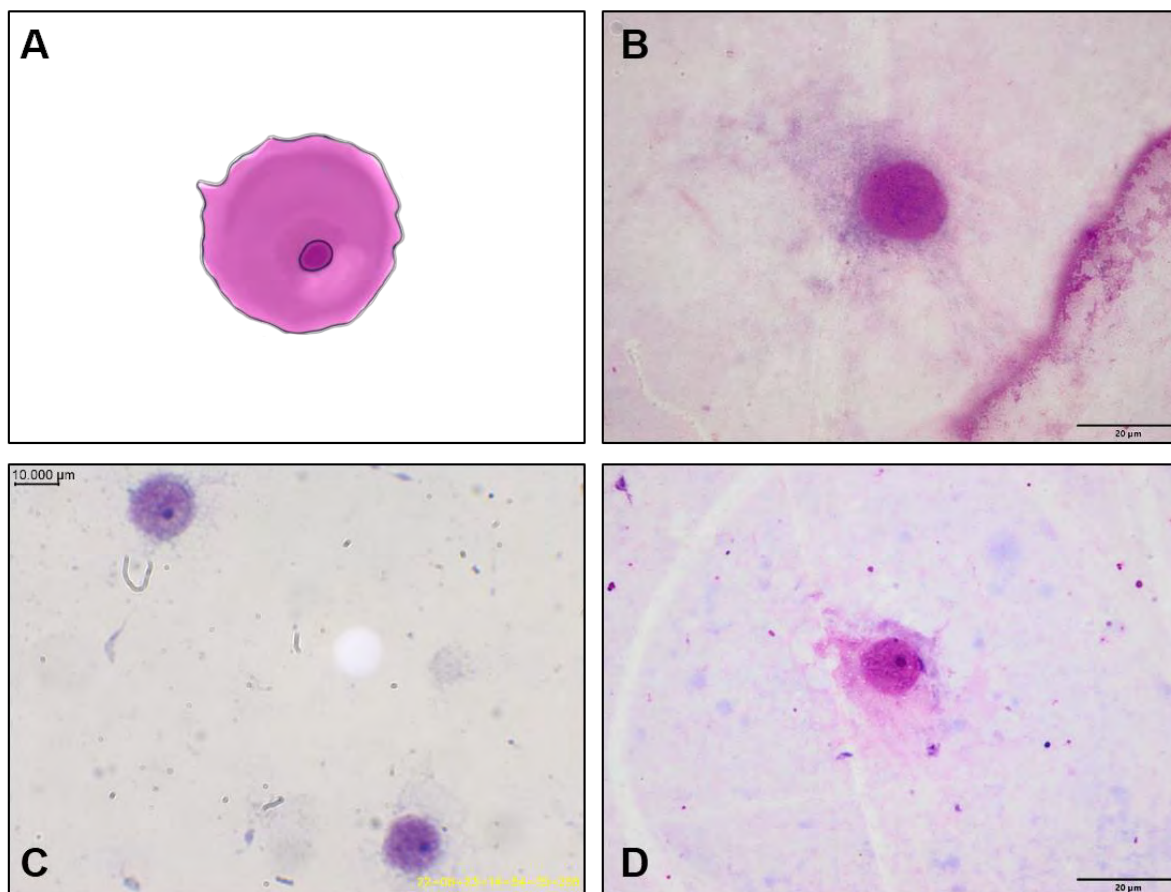
**Figura 23:** Granulócitos circulantes de *Stomoxys calcitrans*. **A** – Caracterização esquemática do tipo celular. **B-D** – Granulócitos isolados da hemolinfa, fixados com Metanol, corados com Giemsa e analisados por microscopia de campo claro. Setas pretas indicando a presença de vacúolos no citoplasma. Setas vermelhas indicando a presença de grânulos no citoplasma. Escala 20 µm.

**Plamatócitos** – são células de tamanho e formatos variados, sendo comum encontrá-los em formato de fuso, com núcleos centralizados. Possuem várias projeções de membrana (Fig. 24B e 24C, setas vermelhas) e podem ser encontrados em aglomerados celulares. É o tipo celular mais abundante. Sua medida depende diretamente das suas projeções citoplasmáticas, sendo elas em média de  $13,156 \pm 1,95 \mu\text{m}$ .

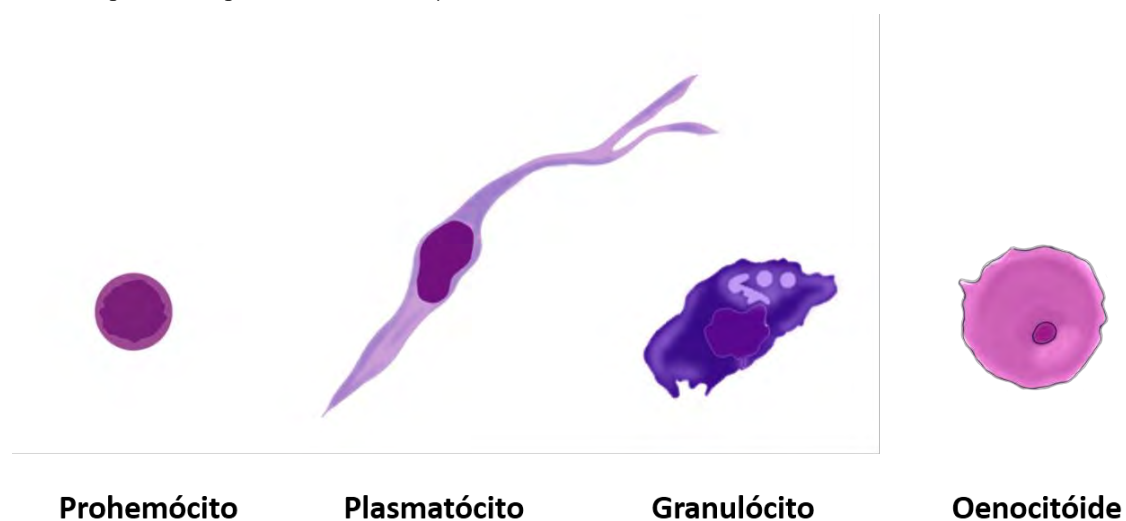


**Figura 24:** Plasmatócitos circulantes de *Stomoxys calcitrans*. **A** – Caracterização esquemática do tipo celular. **B-D** – Plasmatócitos isolados da hemolinfa, fixados com Metanol, corados com Giemsa e analisados por microscopia de campo claro. Setas vermelhas indicando as projeções de membrana. Escala 20 µm.

**Oenocitóides** – são células arredondadas, caracterizadas por possuírem um núcleo pouco desenvolvido, geralmente localizado lateralizado. São as maiores células circulantes de *S. calcitrans*, medindo em média  $14,734 \pm 2,22$  µm, podendo as células chegar a até 25,658 µm de diâmetro (Fig. 25).



**Figura 25:** Oenocitóides circulantes de *Stomoxys calcitrans*. **A** – Caracterização esquemática do tipo celular. **B-D** – Oenocitóides isolados da hemolinfa, fixados com Metanol, corados com Giemsa e analisados por microscopia de campo claro. Escala 20 µm.

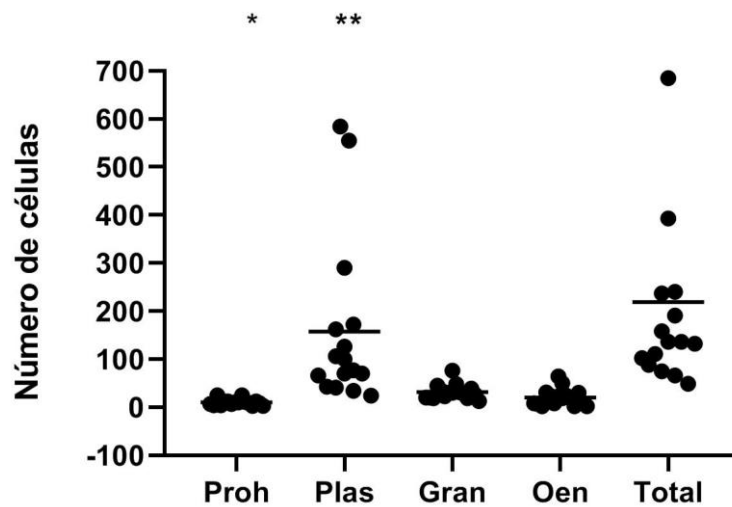


**Figura 26:** Esquema demonstrativo dos tipos celulares identificados na hemolinfa de *S. calcitrans*., sendo eles: prohemócitos; plasmatócitos; granulócito; oenocitóide. Fonte: autoria própria.

### 10.3. Contagem Diferencial e Medição de Hemócitos Circulantes de *Stomoxys calcitrans*

A análise diferencial dos hemócitos circulantes de *S. calcitrans* foi realizada com a coleta individual de 16 moscas de colônia não sexadas, com 1 após a emergência (Co). No

total foram contadas  $\pm 219$  cél/indivíduo (Fig. 27) . As células encontradas em maior número foram os plasmatócitos ( $\pm 158$  células), seguidos dos granulócitos ( $\pm 31$  células), oenocitóides ( $\pm 20$  células) e prohemócitos ( $\pm 10$  células) por indivíduo.



**Figura 27:** Contagem diferencial dos hemócitos circulantes de indivíduos adultos de colônia de *Stomoxys calcitrans*, fixados em Metanol, corados com Giemsa e contados em microscopia de campo claro. \* $p < 0,05$  em relação a todos os grupos. \*\* $p < 0,05$  em relação a todos os grupos.

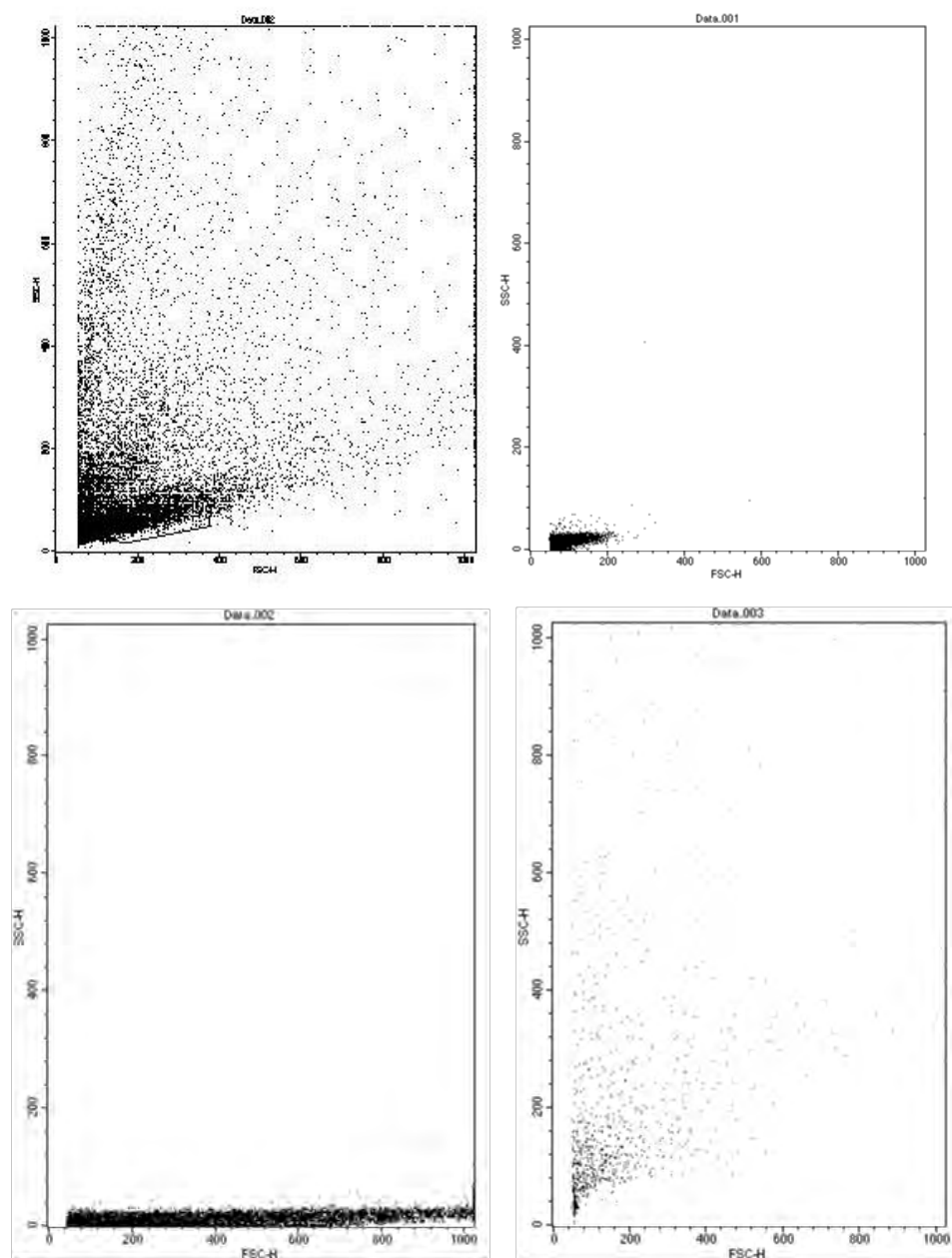
Outro parâmetro utilizado para a caracterização dos hemócitos foi a medição de cada tipo celular identificado, sendo as medidas consideradas: maior e menor comprimento; maior e menor largura; e tamanho total celular. Os prohemócitos apresentam o menor tamanho entre todos os tipos celulares, tendo a média de comprimento de  $8,026 \pm 1,08$  e de largura de  $7,403 \pm 1,24$  e os oenocitóides apresentam o maior, tendo a média de comprimento de  $14,734 \pm 2,22$  e de largura de  $12,492 \pm 2,23$  (Tabela 2).

**Tabela 2:** Medição dos diferentes tipos celulares encontrados na hemolinfa de *Stomoxys calcitrans*.

Tipos de célula	> compr. ( $\mu\text{m}$ )	< compr. ( $\mu\text{m}$ )	Média compr. ( $\mu\text{m}$ )	> largura ( $\mu\text{m}$ )	< largura ( $\mu\text{m}$ )	Média largura ( $\mu\text{m}$ )	> tamanho ( $\mu\text{m}$ )	< tamanho ( $\mu\text{m}^2$ )	Média tamanho ( $\mu\text{m}^2$ )
Prohemócitos	9,919	5,124	$8,026 \pm 1,08$	9,917	4,959	$7,403 \pm 1,24$	98,367	25,41	<b><math>61,129 \pm 16,816</math></b>
Plasmatócitos	19,676	9,617	$13,156 \pm 1,95$	14,621	5,003	$8,252 \pm 1,79$	243,264	60,404	$108,776 \pm 25,12$
Granulócitos	16,102	8,762	$11,810 \pm 1,25$	14,193	6,809	$9,847 \pm 1,25$	218,53	68,281	$118,009 \pm 25,04$
Oenocitóides	25,658	10,253	$14,734 \pm 2,22$	21,976	7,25	$12,492 \pm 2,23$	563,86	89,907	<b><math>192,302 \pm 63,267</math></b>

Outra maneira de analisar os tipos celulares para sua classificação é através da citometria de fluxo. Nesse sentido, buscamos traçar a melhor estratégia para coleta e análise

das células por essa técnica. Nessa avaliação, utilizamos um conjunto de 20 moscas adultas provenientes de colônia. Os gráficos não demonstraram diferenças relevantes para separação de populações celulares, baseadas nos seus tamanhos e granulosidade (Fig.28).

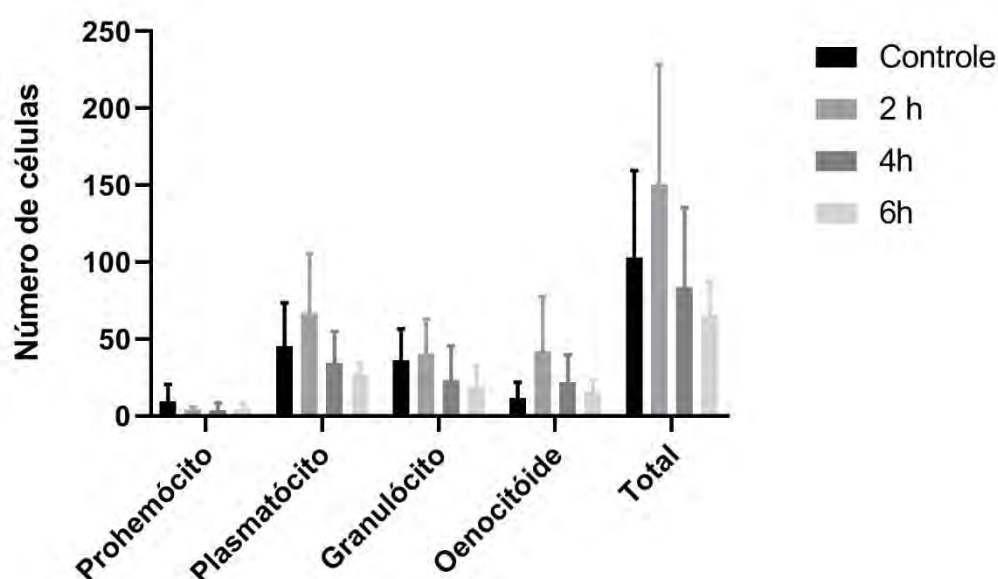


**Figura 28:** Análise dos hemócitos circulantes de *S. calcitrans* por citometria de fluxo. FSC-H representa o tamanho das células e SSC-H representa a granulosidade. Experimento realizado em duplicata.

#### 10.4. Análise da Resposta Hemocitária de *Stomoxys calcitrans* Desafiada Com *Herpetomonas muscarum*

Moscas adultas de colônia, não sexadas tiveram seu perfil hemocitário analisado frente ao desafio com o protozoário monóxico *Herpetomonas muscarum*. Indivíduos do controle foram inoculados somente com 0,4  $\mu$ L de PBS, enquanto os desafiados foram inoculados com

PBS contendo do parasito na concentração de  $5 \times 10^4$  parasitos/mL. Através da contagem diferencial, foi possível perceber que o tempo mais relevante de resposta hemocitária se deu após 2 horas da inoculação, com um aumento no número de células presentes na hemolinfa, onde o controle apresentou em média 105 células e o infectado apresentou 167 células. A célula presente em maior quantidade em todas as lâminas observadas foi o plasmatócito, representando  $\pm 45\%$  da população total de hemócitos. No controle, os prohemócitos representavam  $\pm 13\%$  da população total, tendo sua porcentagem diminuída para  $\pm 4\%$  em todos os tempos monitorados pós inoculação. A população de oenocitóides foi aumentada de  $\pm 13\%$  do controle, para  $\pm 27\%$  do total de celulas contadas (Fig. 29).

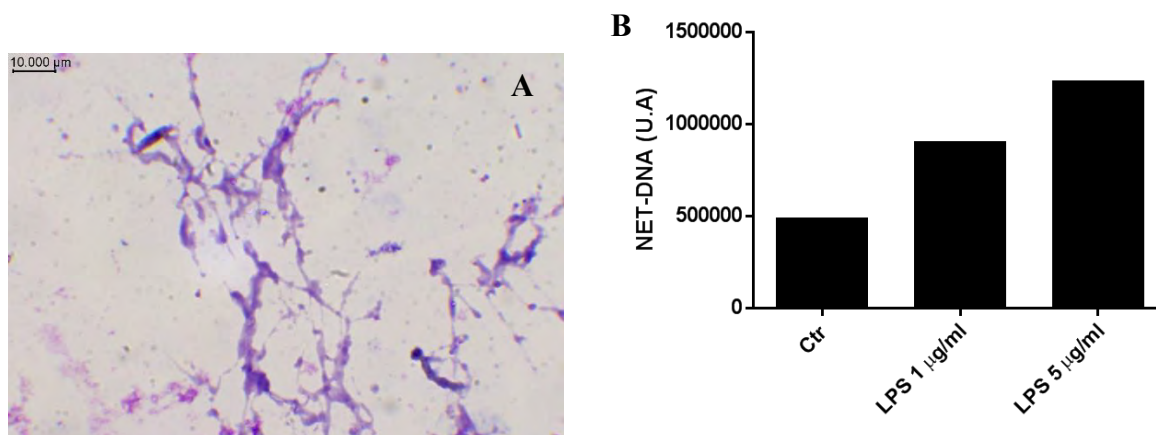


**Figura 29:** Contagem diferencial dos hemócitos de *S. calcitrans* desafiada com seu parasito *Herpetomonas muscarum*. Controle inoculado somente com PBS, infectados inoculados com a concentração de  $5 \times 10^4$  parasitos/mL em PBS. Avaliação realizada nos tempos de 2, 4 e 6 horas após inoculação. Experimento realizado em duplicata.

### 10.5. Hemócitos de *Stomoxys calcitrans* liberam ETs clássicos

Ao realizarmos os ensaios de avaliação dos hemócitos após injeção com *H. muscarum*, a presença de estruturas filamentosas entre as células nos chamou atenção (Fig. 30A). Para verificar a liberação de ET pelas células das moscas, hemócitos agrupados foram incubados com diferentes concentrações de LPS. Nossos resultados mostram que o LPS induziu à liberação de ET pelos hemócitos isolados de *S. calcitrans* (Fig. 30B) de maneira dependente da concentração.





**Figura 30:** Lipopolissacarídeo e protozoário *H. muscarum* desencadeiam a liberação de ET. A – Microscopia óptica de campo claro de estruturas filamentosas observadas em lâminas de interação de hemócitos de *S. calcitrans* com o protozoário *H. muscarum*. Hemócitos isolados de adultos de *S. calcitrans* foram incubadas com as concentrações indicadas de LPS e  $2 \times 10^7$  parasitos/mL de *H. muscarum*. As ETs foram quantificadas por DNA liberado em sobrenadantes de cultura pelo ensaio Picogreen dsDNA. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de 1 experimento independente.

## 11. DISCUSSÃO

Conhecer melhor o funcionamento do sistema imune de um organismo é fundamental para o estabelecimento de estratégias eficazes, sejam elas para controle populacional de uma praga rural ou para melhor avaliação da relação de um hospedeiro com seu parasito em condições laboratorias.

Visando melhor entender a fisiologia de *S. calcitrans*, caracterizamos as células de defesa presentes em sua hemolinfa. Encontramos diferentes tipos celulares, que foram classificados de acordo com sua morfologia, tamanho celular, tamanho do nuclear, projeções de membrana citoplasmática e presença de grânulos (BRAYNE *et al.* 2005).

O estabelecimento do protocolo para realizar a coleta de hemolinfa de indivíduos adultos de *S. calcitrans* foi nosso primeiro desafio. Iniciamos protocolos baseados nas descrições encontradas em levantamentos bibliográficos. Em alguns casos descritos, a coleta era possível através de um corte nos membros ou torax dos organismos, seguido da coleta da hemolinfa expelida naquele ponto com o auxílio de microcapilares, como em *Ectemnaspis rorotaense* e *Ectemnaspis trombetense* (SILVA *et al.*, 2015), na espécie de cupim *Reticulitermes speratus* (HONG, HWANG e CHO, 2018), ou através de microinjetores (HILLYER *et al.*, 2003) entre outros. Porém essa metodologia não funcionou com *S. calcitrans*, devido ao seu tamanho reduzido. A utilização de microinjetores também é comum (HILLYER *et al.*, 2003). Nosso protocolo foi melhor estabelecido quando utilizamos microseringas, para injetar solução tampão (PBS) misturada a uma solução anticoagulante, com recuperação da mesma em seguida. Para nós, também foi necessário um tempo de aderência das células, em câmara úmida, para seu posterior processamento. Diferentes tempos de fixação e coloração foram testados.

Em contagens absolutas dos hemócitos encontrados nas diferentes fases do ciclo de vida de *S. caltritrans*, foi possível perceber uma diferença grande entre a quantidade de células encontrada em cada fase. As moscas do campo possuem um número muito superior em relação as larvas e as moscas emergidas em laboratório. Nos estágios larvais de insetos, eles continuam capazes de produzir hemócitos, a partir da divisão de células-tronco em órgãos hematopoiéticos ou pela divisão contínua de hemócitos já em circulação (LAVIGNE e STRAND, 2002). Gardiner e Strand (2000) determinaram que tanto células presentes nos órgãos hematopoiéticos, quanto células em circulação (tendo exceção os oenocitóides) são capazes de se dividir ativamente. No processos laboratorial de criação de *S. calcitrans* os ovos são colocados em uma dieta fermentada, composta por muitos nutrientes que fica exposta ao ar (com telas que impedem a entrada de outros insetos). Além de estarem nesse substrato rico,



a fase larval representa uma etapa importante na formação das células de defesa. Isso explicaria o maior número de células circulantes em relação aos indivíduos de colônia. Já para os indivíduos retirados dos campo o aumento de hemócitos circulantes pode ser consequência da exposição diária dessas moscas a diversos fatores.

A classificação dos hemócitos comumente é feita com base comparativa ao que já está disponível em literatura, para outros organismos, baseando-se principalmente, das suas características morfológicas. Tendo isso em mente, tomamos como base comparativa classificações adotadas para outros insetos (POTTS et al., 2020; HONG et al., 2018; YU et al., 2016; KWONG et al., 2014; KADOTA et al., 2003; HERNANDEZ et al., 1999). Quatro tipos de hemócitos foram caracterizados por nós em *S. calcitrans*, sendo eles: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides.

Além do número de células circulantes na hemolinfa, as populações dos diferentes hemócitos também é variável. Dentre os hemócitos circulantes de *S. calcitrans*, em condições normais, as menores populações eram as de prohemócitos e oenocitóides. Os prohemócitos são muito citados e conhecidos como potenciais células progenitoras, se diferenciando principalmente em plasmatócitos, porém podendo se diferenciar em outros tipos celulares (ELEFThERIANOS et al., 2021). Em *Drosophila*, os prohemócitos se encontram principalmente na glândula linfática, estando em baixo número na circulação (CROZATIER e MEISTER, 2007). Já em mosquitos, o processo de hematopoiese não é bem esclarecido, acreditando-se que os prohemócitos sejam a principal célula progenitora, representado uma pequena parte da população circulante também (HILLYER e STRAND, 2014). Os oenocitóides são células não aderentes, que expressam fenoloxidase (PO) constitutivamente. Em *Drosophila* as células cristal são comparáveis aos oenocitóides de outros insetos e ambas possuem um importante papel na melanização no processo de encapsulamento (DUBOVSKIY et al, 2016; LETOURNEAU et al., 2016). Em lepidópteros, os oenocitóides são identificados como o tipo de célula produtora de profenoloxidase (PPO) (LIU et al., 2013). Em mosquitos os oenocitóides também são responsáveis por essa produção em conjunto com os granulócitos (HILLYER e CHRISTENSEN, 2002). Essas células podem sofrer lise para a liberação de PPO frente a estímulos após injúria ou infecção, ou apenas para manter a estabilidade dessa molécula no plasma (CERENIUS et al., 2010). Dessa maneira, os oenocitóides estão envolvidos direta ou indiretamente ao processo de melanização.

Nossas contagens diferenciais revelaram os plasmatócitos como as células mais abundantes, seguidas pelos granulócitos. Esses dois hemócitos partilham funções dentro do organismo dos insetos, dependendo do grupo ao qual eles pertencem. Em lepidópteros, os

granulócitos são encontrados em maior número na circulação e desempenha importante papel na fagocitose. Uma forte característica dessa célula é visível morfológicamente, que é a presença de grânulos em seu citoplasma. Já os plasmatócitos são descritos como células maiores, com forte capacidade aderente, espalhando-se em diferentes superfícies. Além de sua capacidade fagocítica, eles também integram papel importante no processo de formação de cápsulas ao redor de patógenos (LIU et al., 2013; HOROHOV e DUNN, 1982). Em *Drosophila*, os plasmatócitos representam uma alta porcentagem entre os hemócitos, sendo ela de 90%-95% dentre as células circulantes, desempenhando importante função fagocítica, além de estar envolvido no processo de diferenciação de origem de novos hemócitos (WILLIAMS, 2007, BANERJEE et al., 2019). Em mosquitos, esses dois tipos celulares também estão entre os mais abundantes, compreendendo em torno de 80% a 95% da população de hemócitos circulantes (HILLYER e STRAND, 2014; HILLYER e CHRISTENSEN, 2002) .

Ao avaliarmos a resposta hemocitária de *S. calcitrans* frente a uma infecção com o tripanossomatídeo monoxeno *H. muscarum*, comumente descrito em insetos, pudemos avaliar (*ex vivo*) a dinâmica da população de hemócitos em tempos diferentes após a infecção. Observamos que somente os prohemócitos tiveram sua quantidade diminuída na circulação de *S. calcitrans*, enquanto todos os outros tipos celulares aumentaram. O tempo que apresentou o maior número de células circulantes foi o de 2 horas após a inoculação do parasito, seguido de queda no número de células nos tempos subsequentes. Como visto em nossos resultados, os hemócitos da mosca-dos-estabúlos apresentam um tamanho pequeno, tendo como média da sua maior célula  $14,734 \pm 2,22 \mu\text{m}$  (oenocitóides). Acima, discutimos um pouco da participação dos granulócitos e plasmatócitos no processo de fagocitose como enfrentamento a infecções. Porém, em comparação ao tamanho das células circulantes de *S. calcitrans*, o tripanossomatídeo representa um desafio de tamanho elevado. Em *Oncopeltos fasciatus* foi descrito que ao ser infectado com o tripanossomatídeo *Phytomonas serpens* dois tipos de respostas foram observadas: nodulação e fagocitose (ALVES e SILVA et al., 2013). Na infecção de *Rhodnius prolixus* com *Trypanosoma rangeli* as respostas hemocitárias foram induzidas, resultando no aumento das contagens de hemócitos. Tanto para infecções com *T. rangeli* quanto para infecções com *T. cruzi*, esse trabalho descreveu uma interação desses tripanossomas com o sistema ativador de profenoloxidase (PPO), onde a produção de fenoloxidase (PO) foi ativada, sendo a quantidade de *T. cruzi* na hemolinfa diretamente correlacionada aos níveis de PO. A eliminação desse ultimo da hemolinfa correspondeu à formação de nódulos como resposta celular (MELLO et al., 1995).

É comum que na presença de parasitos muito grandes para serem fagocitados, as células migrem para respostas como o encapsulamento desses organismos, através da deposição de múltiplas camadas de hemócitos e/ou um revestimento de melanina (BROWNE, HEELAN e KAVANAGH, 2013; DUBOVSKIY et al, 2016). Esse processo pode acontecer sem a presença de melanização. As células envolvidas nesse processo são os plasmatócitos e granulócitos, onde os mesmos se organizam em camadas sob a partícula invasora (TAKAHASHI e ENOMOTO, 1995) É comum a presença de células cristalinas em *Drosophila* e dos oenocitóides em outros insetos, que desempenhariam um papel importante na melanização da cápsula. (DUBOVSKIY et al, 2016; LETOURNEAU et al., 2016). Mais estudos precisam ser realizados frente a infecção de *S. calcitrans* por *H. muscarum*, assim como análises das suas respostas celulares. Acreditamos que o aumento de células envolvidas no processo de encapsulamento e melanização detectado por nossos ensaios possa inferir uma ação dessas células dentro dessa frente de defesa.

A citometria de fluxo realizada nesse trabalho é um dado bem inicial, com estabelecimento de protocolo para a melhor forma de tratar os hemócitos para esse tipo de análise. Não foi possível diferenciar populações celulares nesse ensaio, mesmo utilizando diferentes parâmetros. Repetiremos esse experimento com marcadores celulares para melhor observar as diferenças de granulometria e populações.

Ao avaliarmos as lâminas para contagem diferencial dos hemócitos desafiados com *H. muscarum*, notamos estruturas semelhantes a redes filamentosas. Em diferentes organismos existe um mecanismo, que inicialmente foi denominado NETose, onde neutrófilos ativados por reconhecimento de antígenos ou patógenos sofre uma descondensação da cromatina, desintegrando o envelope nuclear e rompendo a membrana citoplasmática, culminando na liberação de cromatina em forma de armadilhas. Nesse processo, antes do rompimento celular, o DNA que compõe a cromatina se associa a grânulos que contém enzimas e peptídeos antimicrobianos. Essa combinação dá origem as Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs), que irão agir no combate a patógenos (BRINKMANN et al., 2004; BRINKMANN e ZYCHLINSKY, 2012; ROMERO, NOVOA e FIGUERAS, 2020). Porém, esse evento foi descrito sendo realizados por outras células, que não os neutrófilos. Dessa maneira, o mecanismo foi renomeado, passando a se designar ETosis. Em Arthropodes, alguns hemócitos são capazes de liberar ETs, quando estimulados (POIRIER et al., 2014; NEUMANN, BROGDEN E VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, 2020). No camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) visualizam Ets foram visualizadas 30 min após estimulação com PMA, LPS e *E. coli*, sendo capazes de aprisionar e potencialmente matar *E.*

*coli* (NG et al., 2013). Um estudo *ex vivo* mostrou que hemócitos do camarão kuruma (artrópodes) também liberam ETs quando estimulados com LPS, sendo capazes de aprisionar bactérias (KOIWA et al., 2016). Também foi descrito que em baratas (*Periplaneta americana*) tanto d-LPS foi capaz de induzir a liberação de ETs pela hemolinfa e por hemócitos isolados de maneira dependente da concentração. Estimulados com LPS somente hemócitos isolados foram capazes de liberar ETs na concentração mais alta testada. Tanto hemócitos isolados quanto hemolinfa da barata liberaram ETs quando estimuladas *S. aureus* (NASCIMENTO et al., 2018). Nossos ensaios preliminares demonstram, que assim como esses estudos, que os hemócitos de *S. calcitrans*, quando estimulados com LPS em baixas concentrações, são capazes de liberar ETs. Como a presença de armadilhas extracelulares foi observada após o estímulo com *H. muscarum*, já iniciamos testes para avaliar a produção de ETs frente ao desafio com o tripanossomatídeo.

O campo de estudo dentro das células de defesa de insetos e todas as respostas mediadas por elas é muito amplo. Esse trabalho objetiva abrir horizontes para o estudo de hemócitos de *S. calcitrans* buscando entender melhor sua fisiologia e interação com ambiente e patógenos.

## 12. CONCLUSÕES

O tripanossomatídeo *Herpetomonas muscarum* foi identificado pela primeira vez em *Stomoxys calcitrans*, tendo sido encontrado na hemolinfa da mesma, o que se apresenta como uma localização atípica das que possuem descrição em literatura.

Em interações da mosca *S. calcitrans* com seu parasito *H. muscarum* foi possível identificar a capacidade de ligação do parasito as células epiteliais intestinais, necessitando de mais esclarecimento da relação entre essa interação e capacidade infectiva do tripanossomatídeo sobre seu hospedeiro.

A nível de análises imunológicas, quatro tipos de hemócitos circulantes foram identificados e caracterizados em *Stomoxys calcitrans*, sendo eles: prohemócitos, granulócitos, plasmatócitos e oenocitóides; os mesmos foram avaliados diante da infecção da mosca por *H. muscarum*, com aumento no número dessas células efectoras, além da presença de estruturas filamentosas nos momentos da infecção, que poderiam ser classificadas como ETs, o que foi corroborado pela análise da presença de DNA nas amostras infectadas.

Além dos aspectos imunológicos, os parâmetros de desenvolvimento da mosca em colônia foram avaliados diante da infecção por *H. muscarum*, onde foi possível observar uma queda na conversão de ovos a larvas, e das mesmas a pupas. A taxa de emergência, em consequencia também foi afetada, com baixa geração de novos indivíduos adultos. Tudo isso nos leva a crer que a presença do tripanossomatídeo no organismo da mosca afeta sua capacidade reprodutiva, e consequentemente seu desenvolvimento.

### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES E SILVA, T. L.; VASCONCELLOS, L. R. C.; LOPES, A. H.; SOUTO-PADRÓN, T. A Resposta imunológica de hemócitos do inseto *Oncopeltus fasciatus* contra o flagelado *Phytomonas serpens*. PLoS ONE. 2013; 8(8): e72076.
- APRELEV, P.; BRUCE, T. F.; BEARD, C. E.; ADLER, P. H.; KORNEV, K. G. Nucleation and formation of a primary clot in insect blood. *Sci Rep*. 2019; 9: 3451.
- AXTELL, R. C. 1986. Fly Control in Confined Livestock and Poultry Production. Technical Monograph, p. 1–59. Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC.
- 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. 2018; 123, p. 1–8.
- BABCOCK, D. T.; BROCK, A. R.; FISH, G. S.; WANG, Y.; PERRIN, L.; KRASNOW, M. A.; GALKO, M. J. As células sanguíneas circulantes funcionam como um sistema de vigilância para tecidos danificados em larvas de *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2008; 105:10017–10022.
- BALDACCHINO, F; MUENWORN, V; DESQUESNES, M; DESOLI, F; CHAROENVIRIYAPHAP, T; DUVALLET, G. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*. 2013; 20, p. 26.
- BALEBA, S. B., TORTO, B., MASIGA, D., WELDON, C. W., GETAHUN, M. N. 2019. Egg-laying decisions based on olfactory cues enhance offspring fitness in *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-13.
- BANERJEE, U.; GIRARD, J. R.; GOINS, L. M.; SPRATFORD, C. M. *Drosophila* as a genetic model for hematopoiesis. *Genetics*. 2019; 211: 367– 417.
- BARBERIAN, D. A. Successful Transmission of Cutaneous Leishmaniasis by the Bites of *Stomoxys calcitrans*, 1938.
- BARCLAY MCGHEE, R. AND POSTELL, F. J. Axenic Cultivation of *Phytomonas davidi* Lafont (Trypanosomatidae), a Symbiote of Laticiferous Plants (Euphorbiaceae). *The Journal of Protozoology*, 23(2); 2007. p. 238–241.
- BARRILLAS-MURY, C., PASKEWITZ, S., KANOST, M. R. Immune response of vectors in MARQUARDT, W. C. (Ed.) *Biology of disease of vectors*. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004. c. 27, p. 363-376
- BARROS, A. T. M. et al. Resistance of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), to cypermethrin in outbreak areas in Midwestern Brazil. *Rev Bras. Parasitol. Vet.*, v. 28, n. 4, p. 802-806, 2019.
- BARTHOLOMAY, L. C.; MICHEL K. Imunobiologia do Mosquito: A Interseção da Saúde do Vetor e Competência do Vetor. *Annu Rev Entomol*. 2018; 63 :145-67.

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, n. 2, p. 189 – 193, 1975.

BEVERLEY, S.M. Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nature Reviews Genetics*, 4(1); 2003. p.11.

BIDLA, G.; LINDGREN, M.; THEOPOLD, U. e DUSHAY, M. S. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev Comp Immunol*. 2005; 2005: 669– 79.

BORGHESEAN, T. C.; FERREIRA, R. C.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; BORDA, C. C.; PAIVA, F.; Milder, R. V.; TEXEIRA, M. M. G.; CAMARGO, E. P. Molecular Phylogenetic Redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a Genus of Insect Parasites Associated with Flies. *Annals of Anatomy*. 2013; 164: 129-152.

BOUTROS, M.; AGAISSE, H.; PERRIMON, N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell* 2002; 3, 711– 722.

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

BRAYNER, F.A.; ARAÚJO, H.R.C.; CAVALCANTI, M.G.S.; ALVES, L.C.; PEIXOTO, C.A. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Micron*. Oxford. 2005; 36(4): 359-367.

BREHELIN, M., ZACHARY, D. Insect haemocytes: a new classification to rule out controversy. In: Brehelin, M. (Ed.), *Immunity in Invertebrates*. Springer Verlag. 1986; Berlin, p. 36–48.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D.S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303, 1532–1535.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Armadilhas extracelulares de neutrófilos: A imunidade é a segunda função da cromatina? *J. Cell Biol*. 2012; 198, 773-783.

BRITO, L. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R.; BARBIERI, F. S.; SILVA-NETO, F. G.; CHAGAS, A. C. S.; CELESTINO, O. O. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteros de interesse veterinário em laboratório. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2008. 25 p.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*. 2013; 1: 597– 603.

BRUCE, W. N; DECKER, G. C. The relationship of stable fly abundance to milk production in Dairy Cattle. *Journal of Economic Entomology*. 1958; 51, Issue 3, 1, 10 p. 269–274.

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* 2014;14: 796– 810.

CAMARGO, E. P. (1999) *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol* 42: 29–112.

CAMARGO, E. P. *Phytomonas* e outros tripanossomatídeos parasitas de plantas e frutas

Av. Parasitol. 1999; 42, p. 29-112.

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

CANÇADO, P. H. D. et al. Uso da queima profilática no controle emergencial e prevenção de surtos pela mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) em propriedades produtoras de cana-de-açúcar. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2013.

CANÇADO, P. H. D; DE LEÓN, A. A. P; PEREIRA, J. B; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal*. 2014; v. 23, n. 2, p. 150-156.

CAO, X; HE, Y.; HU, Y.; WANG, Y.; CHEN, Y. R.; BRYANT, B.; CLEM, R. J.; SCHWARTZ, L. M.; BLISSARD, G.; JIANG, H. As vias de sinalização imune de *Manduca sexta*. *Inseto Biochem Mol Biol*. 2015; 62 :64-74.

CARVALHO, A. L. M. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *VeT. Pat. Trop*. 1973; 2: 223-274.

CERENIUS, L.; KAWABATA, S.; LEE, B. L.; NONAKA, M.; SÖDERHÄLL, K. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem Sci*. 2010; 35: 575– 83.

CHEN, J.; RAUCH, C. A.; WHITE, J. H.; ENGLUND, P. T.; COZZARELLI, N. R. The topology of the kinetoplast DNA network. *Cell*, 80(1); 1995. p. 61–69.

CHICHARRO, C.; ALVAR, J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients', *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. Taylor & Francis, 97(sup1); 2003. p. 75–78.

CLARK, T.B.; KELLEN, W. R.; LINDEGREN, J. E.; SMITH, T. A. A transmissão de *Crithidia fasciculata* Leger 1902 em *Culiseta incidens* (Thomson). *The Journal of Protozoology*, 11 (3); 1964. 400-402.

CLAYTON, A. M.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. O sistema imune inato *Anopheles* na defesa contra a infecção da malária. *J Inato Immun*. 2014; 6 :169-181.

CONTRERAS, G.; SHIRDEL, I.; BRAUN, M. S.; WINK, M. Defensins: transcriptional regulation and function beyond antimicrobial activity. *Dev Comp Immunol*. 2020; 104:103556.

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

CORONADO, A., BUTLER, J. F., BECNEL, J., HOGSETTE, J. 2004. Artificial feeding in the stable fly *Stomoxys calcitrans* and their relationship with the blood meal destination. Proceedings of the 1st international symposium and 2nd national symposium on Haemoparasites and their vectors, Simon Bolivar University (USB), Caracas, Venezuela, 2004; p. 14-16.



CORTINAS, R.; JONES, C. J. Ectoparasites of cattle and small ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v. 22, n. 3, p. 673-693. Christmas, P. E., 1970. Laboratory rearing the biting fly *Stomoxys calcitrans*. *New Zealand Entomologist*. 2006; v. 4, n. 4, p. 45-49.

CROZATIER, M.; MEISTER, M. *Drosophila* haematopoiesis. *Cell Microbiol*. 2007; 9: 1117–26.

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*, 169, 320–326, 2010.

DARLYUK, I. ET AL. Arginine homeostasis and transport in the human pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(30); 2009. pp.19800–19807.

DAVIS, M. M.; ENGSTRÖM, Y. Immune response in the barrier epithelia: lessons from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *J Innate Immun* 2012; 4, 273–283.

DE PAIVA, R. M. C.; GRAZIELLE-SILVA, V.; CARDOSO, M. S.; NAKAGAKI, B. N.; MENDONÇA-NETO, R. P. Amastin knockdown in *Leishmania braziliensis* affects Parasite-macrophage interaction and results in impaired viability of intracellular amastigotes. *PLOS Pathogens* 11(12); 2015.

DE VELASCO, B.; MANDAL, L.; MKRTCHYAN, M.; HARTENSTEIN, V. Subdivision and developmental fate of the head mesoderm in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol*. 2006; 216: 39–51.

DIAS, F. D. A.; VASCONCELLOS, L. R. D. C.; ROMEIRO, A.; ATTIAS, M.; SOUTO-PADRÓN, T. C.; LOPES, A. H. Transmissão Transovum de Cistos Tripanosomatídeos no Inseto Asclépias, *Oncopeltus fasciatus*. *PLoS ONE* 2014; 9(9):e108746.

DING, J. L.; HOU, J.; FENG, M. G. e YING, S. H. Transcriptomic analyses reveal comprehensive responses of insect hemocytes to mycopathogen *Beauveria bassiana*, and fungal virulence-related cell wall protein assists pathogen to evade host cellular defense. *Virulence*. 2020; 11: 1352–65.

DOMINGHETTI, T. F. S. Dinâmica populacional e surtos de *Stomoxys calcitrans* em usina sucroalcooleira e propriedades pecuárias adjacentes. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2017. 89p.

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*, 48, 656–668, 2011.

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*. 2011; 48, 656–668.

DUBOVSKIY, I. M.; KRYUKOVA, N. A.; GLUPOV, V. V.; RATCLIFFE, N. A. Encapsulation and nodulation in insects. *Invertbr Surv J*. 2016; 13: 229–46.

DUDZIC, J. P.; KONDO, S.; UEDA, R.; BERGMAN, C. M. e LEMAITRE, B. *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biol.* 2015; 13: 81.

DUSHAY, M. S. Insect hemolymph clotting. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66: 2643–50.

DZIEDZIECH, A.; SHIVANKAR, S. e THEOPOLD, U. *Drosophila melanogaster* responses against entomopathogenic nematodes: focus on hemolymph clots. *Insects.* 2020; 11:62.

ELEFThERIANOS, I.; HERYANTO, C.; BASSAL, T.;ZHANG, W.; TETTAMANTI, G. E MOHAMED, I. Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. *Immunology*, 2021;164:401–432.

*esculentum*) in southern Spain. *Experimental Parasitology.* Academic Press, 116(1); 2007. p. 88–90.

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

FANKHAUSER, N.; MÄSER, P. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics.* 21(9); 2005.p. 1846–1852.

FAÚNDEZ, E. I.; RIDER, D. A. "The brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Stål, 1855)(Heteroptera: Pentatomidae) in Chile." *Arquivos Entomolóxicos* 17; 2017. 305-307.

FERENC, S. A., RAYMOND, H. L., LANCELOT, R., COURTNEY, C. H. Mechanical transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the tabanid *Cryptotylus unicolor*. *Proceedings of the 18th international congress of entomology*, University of Florida: Gainesville. 1988; p. 295, 16p.

FIORINI, J. E. *et al.* 'Morphological, Biochemical and Molecular Characterization of *Herpetomonas samuelpessoai camargoi* n. subsp., a Trypanosomatid Isolated from the Flower of the Squash *Cucurbita moschata*' *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(1). 2001. p. 62–69.

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

FLEGONTOV, P.; VOTÝPKA, J.; SKALICKÝ, T.; LOGACHEVA, M. D.; PENIN, A. A.; TANIFUJI, G.; LUKEŠ, J. *Paratrypanosoma* é um novo tripanossomatídeo de ramificação precoce. *Current Biology*, 23 (18); 2013. 1787-1793.

FLORENCIO, M., ROSA, D., DE ARAÚJO LIMA, K. R., DA COSTA, G. A., GUEDES, K. V. G., FAMPA, P. Estabelecimento e medida quantitativa da produção de colônias de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) no Rio de Janeiro, Brasil. *Parasitologia Veterinária: Estudos e Relatórios Regionais.* 2020; 21, 100434.

FOIL, L. D., HOGSETTE, J. A. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies.

Revue scientifique et technique de l'Office international des epizooties. 1994; 13, 1125–1158.

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

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

FRIESEN, K., CHEN, H., ZHU, J.; TAYLOR, D. B. External morphology of stable fly (Diptera: Muscidae) larvae. Journal of medical entomology. 2015; v. 52, n. 4, p. 626-637.

FROLOV, A. O. Tripanossomatídeos (Kinetoplastea: Trypanosomatida) e insetos (Insecta): padrões de coevolução e diversificação dos sistemas hospedeiro-parasita Proc. Zool. Inst. RAS, 320; 2016. p. 16-75.

FROLOV, A. O.; MALYSHEVA, M. N.; GANYUKOVA, A. I.; SPODAREVA, V. V.; KRÁLOVÁ, J.; YURCHENKO, V.; KOSTYGOV, A. Y. Se o hospedeiro for refratário, o parasita insistente enlouquece: Trypanosomatid *Blastocrithidia raabei* no percevejo *Coreus marginatus*. *Plos One*, 15 (1); 2020. e0227832.

FROLOV, A. O.; MALYSHEVA, M. N.; GANYUKOVA, A. I.; SPODAREVA, V. V.; YURCHENKO, V.; KOSTYGOV, A. Y. Desenvolvimento de *Phytomonas lipae* sp. n.(Kinetoplastea: Trypanosomatidae) no percevejo verdadeiro *Coreus marginatus* (Heteroptera: Coreidae) e insights sobre a evolução dos ciclos de vida no gênero *Phytomonas*. *Plos One*, 14 (4); 2018. e0214484.

FROLOV, A. O.; MALYSHEVA, M. N.; GANYUKOVA, A. I.; YURCHENKO, V.; KOSTYGOV, A. Y. Desenvolvimento obrigatório de *Blastocrithidia papi* (Trypanosomatidae) nos túbulos de Malpighi de *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera) e coordenação dos ciclos de vida hospedeiro-parasita. *Plos One*, 13 (9); 2018 e0204467.

FROLOV, A. O.; MALYSHEVA, M. N.; YU, A.; KOSTYGOV, A. Y. "Tripanossomatídeos homoxenos de insetos verdadeiros *Pyrrhocoris apterus* (L.) no norte da região de Pskov." *Parazitologia* 48.6; 2014. 461-471.

FROLOV, A. O.; SKARLATO, S. O. Estrutura fina e mecanismos de adaptação de tripanossomatídeos inferiores em Hemiptera Tsitologiya , 37;1995. p . 539-560.

FROLOV, A.; KOSTYGOV, A.; YURCHENKO, Y. Development of Monoxenous Trypanosomatids and Phytomonads in Insects, Trends in Parasitology, Volume 37, Issue 6, 2021, Pages 538-551.

FUCHS, T. A.; ABED, U.; GOOSMANN, C.; HURWITZ, R.; SCHULZE, I.; WAHN, V.; WEINRAUCH, Y.; BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, V. Novo programa de morte celular leva a armadilhas extracelulares de neutrófilos J. Cell Biol., 176; 2007, p. 231-241

GARDINER, E.; STRAND, M. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2000; 43: 147– 64.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. *Annu RevEntomol.* 1997; 42: 611– 643.

GRIGORIAN, M.; HARTENSTEIN, V. Hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods. *DevGenes Evol.* 2013; 223: 103– 15.

GRISSI, L.; LEITE, R. C; MARTINS, J. R. S; DE BARROS, A. T. M; ANDREOTTI, R;

GUIMARÃES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T.; FROMENT, G. S.; SOARES, R. P.; MORGADO, F. N.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SARAIVA, E. M. *Promastigotas de Leishmania amazonensis* induzem e são mortas por armadilhas extracelulares de neutrófilos. *Proc. Nacional Acad. Sci. EUA* ,106. 2009. p. 6748-6753.

GUPTA, A. P. Cellular elements in hemolymph. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford. 1985; v3, p. 401– 451.

HAINE, E. R.; ROLFF, J.; SIVA-JOTHY, M. T. Functional consequences of blood clotting in insects. *Dev CompImmunol.*2007;31:456–64.

HAMILTON, P. T.; VOTÝPKA, J.; DOSTÁLOVÁ, A.; YURCHENKO, V.; BIRD, N. H.; LUKEŠ, J.; PERLMAN, S. J. Dinâmica da infecção e resposta imune em uma associação *Drosophila-tripanosomatídeo* recentemente descrita. *MBio* , 6 (5); 2015.

HILLYER, J. F. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol.* 2016 May;58:102-18.

HILLYER, J. F.; CHRISTENSEN, B. M. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Histochem Cell Biol.* 2002; 117: 431– 40.

HILLYER, J. F.; STRAND, M. R. Mosquito hemocyte-mediated immune responses. *Curr Opin Insect Sci.*2014; 3: 14– 21.

HINKS, C.; ARNOLD, J. Haemopoiesis in Lepidoptera. II. The role of the haemopoietic organs. *Can JZool.* 1977; 55: 1740– 55.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates:a new terminology. *Nature.* 1966; 212: 1385-1386.

HONG, M.; HWANG, D.; CHO, S. Hemocyte Morphology and Cellular Immune Response in Termite (*Reticulitermes speratus*) *Journal of Insect Science*, (2018) 18(2): 46; 1–6

HOROHOV, D. W.; DUNN, P. E. Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta*larvae following injection of bacteria. *J Invertebr Pathol.* 1982; 40: 327– 39.

HOSHIZAKI, D. K. Fat-cell development. *Compr Mol Insect Sci* 2005;2, 315– 345. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>.

INBAR, E.; HUGHITT, V. K.; DILLON, L. A. L.; GHOSH, K.; EL-SAYED, N. M.; SACKS, D. L. The Transcriptome of *Leishmania major* Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector, *mBio*, 8(2); 2017.

JASKOWSKA, E.; BUTLER, C.; PRESTON, G.; KELLY, S. Phytomonas: tripanossomatídeos adaptados a ambientes vegetais. *Patógenos PLoS*, 11 (1); 2015. e1004484.

JEANBOURQUIN, P. The Role of Odour Perception in the Sensory Ecology of the Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* L. PhD dissertation, Université de Neuchâtel, 2005.

JONES, C. J., MOLNE, 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*. 1992; v. 21, n. 1, p. 141-147.

JUNG, S. H.; EVANS, C. J.; UEMURA, C.; BANERJEE, U. The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development*. 2005; 2005: 2521– 33.

JÚNIOR, M. A. L. VILELA, T. S. BITTECOURT, A. J., SANTOS, H. A., PATRICIA FAMPA, P. First report of the presence of *Anaplasma marginale* in different tissues of the stable-fly *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) in Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2021. v 23, 100515, ISSN 2405-9390.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; DE PAIVA, R. M. C.; ARAÚJO, P. R.; DE MENDONÇA-NETO, R. P.; LEMOS, L.; BARTHOLOMEU, D. C.; MORTARA, R. A.; DA ROCHA, W. D.; TEIXEIRA, S. M. R. Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiology*, 13(1); 2013. p. 10.

KLEINO, A.; SILVERMAN, N. A via *Drosophila* IMD na ativação da resposta imune humoral. *Dev Comp Immunol*. 2014; 42 :25-35.

KOIWAI, K.; ALANTON, R. R. R.; KONDO, H.; HIRONO, I. A formação de armadilhas extracelulares em hemócitos de camarão kuruma (*Marsupenaeus japonicus*) é acoplada com lisozima tipo-c. *Peixe Marisco Immunol*. 2016; 52 , 206-209.

KOSTYGOV, A. Y.; FROLOV, A. O.; MALYSHEVA, M. N.; GANYUKOVA, A. I.; CHISTYAKOVA, L. V.; TASHYREVA, D.; YURCHENKO, V. *Vickermania* gen. nov., tripanossomatídeos que usam dois flagelos unidos para resistir ao fluxo peristáltico do intestino médio dentro da mosca hospedeira. *BMC biology* , 18 (1); 2020. 1-16.

KOSTYGOV, Y. Euglenozoa: taxonomia, diversidade e ecologia, simbioses e vírus. *Abra Biol*, 11; 2021. Artigo 200407.

KRÁLOVÁ, J.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; VOTÝPKA, J.; NOVOTNÝ, V.; KMENT, P.; LUKEŠ, J.; KOSTYGOV, A. Y. Tripanossomatídeos de insetos em Papua Nova Guiné: alto endemismo e diversidade. *Revista Internacional de Parasitologia*, 49 (13-14); 2019. 1075-1086.

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

KURUCZ, E.; VÁCZI, B.; MÁRKUS, R.; LAURINYECH, B.; VILMOS, P.; ZSÁMBOKI, J. Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta Biol Hung*. 2007; 58(Suppl): 95– 111.

LABRECQUE, G. C.; MEIFERT, D. W.; RYE, J. Experimental Control of Stable Flies, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), by Releases of Chemosterilized Adults. The Canadian Entomologist. 1976; v. 104, Issue 6, p. 885-887.

LANGE C. E.; SENHOR, J. Protistan entomopatogênicos. Insect Patologia, 2 ed, Amsterdam: Elsevier. 2012; 367-394.

LAVINE, M. D. STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol. 2002; v. 32, n. 10, p. 1295-1309.

LEIMAITRE, B., HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annu Rev Immunol. 2007. v. 25, p. 697-743.

LEITÃO, A. B.; SUCENA, É. *Drosophila* sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. *Elife*. 2015; 4:e06166.

LETOURNEAU, M.; LAPRAZ, F.; SHARMA, A.; VANZO, N.; WALTZER, L.; CROZATIER, M. *Drosophila* hematopoiesis under normal conditions and in response to immune stress. *FEBS Lett*. 2016; 590: 4034– 51.

LINDSAY, S. A.; WASSERMAN, S. A. Sinalização de pedágio de *Drosophila* convencional e não convencional. *Dev Comp Immunol*. 2014; 42 :16-24.

LIU, F.; XU, Q.; ZHANG, Q.; LU, A.; BEERNTSEN, B. T.; LING, E. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Invertebr Surviv J*. 2013; 10: 102– 9.

LIU, Y.; HU, H.; LI, Z. The cooperative roles of PHO80-like cyclins in regulating the G1/S transition and posterior cytoskeletal morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. Molecular Microbiology. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 90(1); 2013. p. 130–146.

LOPES, A. H.; SOUTO-PADRÓN, T.; DIAS, F. A.; GOMES, M. T.; RODRIGUES, G. C. et al. (2010) Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. *Open Parasitol J* 4: 30–59.

LUKEŠ, J.; BUTENKO, A.; HASHIMI, H.; MASLOV, D. A.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V. Os tripanossomatídeos são muito mais do que apenas tripanossomas: pistas da árvore genealógica expandida. *Trends in parasitology*, 34 (6); 2018. 466-480.

LYE, L. F.; OWENS, K.; SHI, H.; MURTA, S. M. F.; VIEIRA, A. C.; TURCO, S. J.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. Retention and Loss of RNA Interference Pathways in Trypanosomatid Protozoans. *PLOS Pathogens*, 6(10); 2010.

MAKHJANI, K.; ALEXANDER, B.; TANAKA, T.; RULIFSON, E.; BRÜCKNER, K. The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. *Development*. 2011; 138: 5379– 91.

MALYSHEVA, M. N.; FROLOV, A. O. Free-living disseminating stages of trypanosomatids from water insects. *Parazitologiya*, 27; 1993. p. 296-302

MANDAL, L.; MARTINEZ-AGOSTO, J. A.; EVANS, C. J.; HARTENSTEIN, V.; BANERJEE, U. A. Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature*. 2007;446: 320– 4.

MARCHESE, L. et al. The uptake and metabolism of amino acids, and their unique role in

the biology of pathogenic Trypanosomatids', Pathogens. 2018.

MARCONDES, C. B. Entomologia Médica veterinária. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

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

MARKUS, R.; LAURINYECH, B.; KURUCZ, E.; HONTI, V.; BAJUSZ, I.; SIPOS, B.; SOMOGYI, K.; KRONHAMN, J.; HULTMARK, D., ANDO, I. Hemócitos sésseis como um compartimento hematopoiético em *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2009; 106:4805–4809.

MARQUARDT, W. C. Biology of disease vectors. Burlington. Elsevier Academic Press. 2004.

MARTINEZ-AGOSTO, J. A.; MIKKOLA, H. K.; HARTENSTEIN, V.; BANERJEE, U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev*. 2007; 21: 3044– 60.

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

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

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

MEEKINS, D. A.; KANOST, M. R.; MICHEL, K. Serpins in arthropod biology. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; 62:105-19.

MELCARNE, C.; LEMAITRE, B.; KURANT, E. Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochem Mol Biol*. 2019; 109: 1– 12.

MELCARNE, C.; RAMOND, E.; DUDZIC, J.; BRETSCHER, A. J.; KURUCZ, É.; ANDÓ, I.; Two Nimrod receptors, NimC1 and Eater, synergistically contribute to bacterial phagocytosis in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J*. 2019; 286: 2670– 91.

MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1995; 65:3, 261-268.

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

MIHOK, S., MARAMBA, O., MUNYOKI, E., KAGOIYA, J., 1995. Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxyinae (Diptera: Muscidae). *Tropical Medicine and Parasitology*, v. 46; 1995. n. 2, p. 103-105.

MORAES, A. P. R. *Stomoxys calcitrans*: Estabelecimento de colônia e efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos, 2007. Dissertação (Mestrado em ciências) – Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

MORAES, A. P. R.; ANGELO, I. C.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; 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.* 2008; 1149: 384–387.

MORET, Y. e MOREAU, J. The immune role of the arthropod exoskeleton. *Invertebr Surviv J.* 2012;9:200–6.

MORIO, F. *et al.* Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11); 2008. p. 3845–3847.

MORTIMER, N. T.; KACSOH, B. Z.; KEEBAUGH, E. S.; SCHLENKE, T. A. Mgat1-dependent N-glycosylation of membrane components primes *Drosophila melanogaster* blood cells for the cellular encapsulation response. *PLoS Pathog.* 2012; 8:e1002819.

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*. 2006; n. 20, p. 122–137.

MWANGI, W.; DE FIGUEIREDO, P. E. CRISCITIELLO, M. F. (2016) One Health: Addressing global challenges at the nexus of human, animal, and environmental health. *PLoS Pathog* 12: e1005731.

MYLLYMAKI, H.; VIA RAMET, M. JAK/STAT na imunidade de *Drosophila*. *Scand J Immunol.* 2014; 79 :377-385.

NAKATOGAWA, S.; ODA, Y.; KAMIYA, M.; KAMIJIMA, T.; AIZAWA, T.; CLARK K. D. A novel peptide mediates aggregation and migration of hemocytes from an insect. *Curr Biol.* 2009; 19: 779– 85.

NARDI, J. B.; PILAS, B.; UJHELYI, E.; GARSHA, K.; KANOST, M. R. Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Dev Genes Evol.* 2003; 213: 477– 91.

NASCIMENTO, M. T. C.; SILVA, K.P.; GARCIA, M.C.F.; MEDEIROS, M.N.; MACHADO, E.A.; NASCIMENTO, S.B.; SARAIVA, E.M. DNA extracellular traps are part of the immune repertoire of *Periplaneta americana*. *Developmental & Comparative Immunology*, 84; 2018, 62-70.

NAYDUCH, D. Temporal progression of *Herpetomonas muscarum* Leidy (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the midgut of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *J. Entomol. Sci.*, 44; 2009. pp. 141-148.

NEUMANN, A.; BROGDEN, G.; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. Armadilhas Extracelulares: Uma antiga arma de vários reinos. *Biologia* 2020; 9, 34.

NG, T. H.; CHANG, S. H.; WU, M. H.; WANG, H. C. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 2013; 41, 644–651.

NIWA, R. e NIWA, Y. S. Enzimas para a biossíntese de ecdisteróides: suas funções biológicas em insetos e além. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78:1283–92.



OLAFSON, P. U. et al. Frequency of *kdr* and *kdr-his* alleles in Stable Fly (Diptera: Muscidae) populations from the United States, Costa Rica, France, and Thailand. *J. Med. Entomol.*, v. 20, n. 1, p. 1-5, 2019 (a).

OLAFSON, P. U., AKSOY, S., ATTARDO, G. M. et al. The genome of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, reveals potential mechanisms underlying reproduction, host interactions, and novel targets for pest control. *BMC Biol* 19,41 (2021).

ONO, M.; ARIMATSU, C.; KAKINOKI, A.; MATSUNAGA, K.; YOSHIGA, T. Comparison of cellular encapsulation with nematodes in two lepidopteran insects. *Appl Entomol Zool.* 2020; 55: 337– 44.

PACHECO, R. S, MARZOCHI, M. C. A., PIRES, M. Q, BRITO, C. M. M., MADEIRA, DE F. M.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O. Parasita genotipicamente relacionado a um tripanossomatídeo monoxeno de pulga de cão causando infecção oportunista em um paciente HIV positivo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1998; 93(4), 531-537.

PACHECO, R. S.; MARZOCHI, M. C.; PIRES, M. Q.; BRITO, C. M.; MADEIRA, M. D. F.; BARBOSA-SANTOS, E. G. Parasita genotipicamente relacionado a um tripanossomatídeo monoxeno da pulga do cão causando infecção oportunista em paciente HIV positivo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93; 1998. 531-537.

PEREIRA, S. M. S. Elaboração de protocolos para padronização e sistematização dos procedimentos para recebimento de depósito de novas amostras na coleção de protozoários da FIOCRUZ. Dissertação (mestrado) – UFRJ / IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica, 2019. 270f. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

POINAR JR, G. *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera:Reduviidae: Triatominae), um novo fóssil de triatomíneo em âmbar dominicano, com evidência de flagelados intestinais. *Paleodiversidade*, 6; 2013. p. 1-8.

POINAR JR, G.; POINAR, R. Evidência de doenças transmitidas por vetores de répteis do Cretáceo Inferior. *Zoológico de Borne Vettori*. Este, 4; 2004. p. 101-1 281 – 284.

POIRIER, A. C.; SCHMITT, P.; ROSA, R. D.; VANHOVE, A. S.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; RUBIO, T. P.; CHARRIERE, G. M.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. Histonas antimicrobianas e armadilhas de DNA na imunidade de invertebrados: Evidências em *Crassostrea gigas*. *J. Biol. Química* 2014; 289, 24821-24831.

POSADA, D. ModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 25:1253-1256.

PRADEEP, A. N.; ANITHA, J.; AWASTHI, A. K.; BABU, M. A.; GEETHA, M. N.; ARUN, H. K. Activation of autophagic programmed cell death and innate immune gene expression reveals immuno-competence of integumental epithelium in *Bombyx mori* infected by a dipteran parasitoid. *Cell Tissue Res.* 2013;352:371–85.

RATCLIFFE, N. A.; GAGEN, S. J. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell.* 1977; 9: 73– 85.

REI, J. G.; HILLYER, J. F. Interação induzida por infecção entre os sistemas circulatório e imunológico do mosquito. *PLoS Pathog.* 2012; 8:e1003058.

RITTIG, M. G.; KUHN, K. H.; DECHANT, C. A.; GAUCKLER, A.; MODOLELL, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Phagocytes from both vertebrate and invertebrate species use “coiling” phagocytosis. *Dev Comp Immunol.* 1996; 20: 393– 406.

ROMERO, A.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Armadilhas extracelulares (ETosis) podem ser ativadas através de mecanismos dependentes e independentes de NADPH em moluscos bivalves. *Dev. Comp. Immunol.* 2020; 106 , 103585.

ROWTON, E. D.; BARCLAY, M. R. Dinâmica da População de *Herpetomonas ampelophilae*, com uma Nota sobre a Sistemática de *Herpetomonas de Drosophila spp.* The Journal of Protozoology. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 25(2), 1978. p. 232-235.

ROWTON, EDGAR D., WILLIAM B. LUSHBAUGH e R. BARCLAY McGHEE. "Ultraestrutura do aparelho flagelar e fixação de *Herpetomonas ampelophilae* no intestino e túbulos de Malpighi de *Drosophila melanogaster* 1." *The Journal of Protozoology* 28.3; 1981. 297-301.

RUSSELL, V.; DUNN, P. E. Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *J Insect Physiol* 1996; 42, 65– 71.

SATYAVATHI, V. V.; MINZ, A.; NAGARAJU, J. Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell Signal.* 2014; 26: 1753– 63.

SCHAUB, G. A. Inter -relações parasita-hospedeiro de *Blastocrithidia triatomae* e triatomíneos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83; 1988. p. 622-632.

SCHAUB, G. A. Patogenicidade de tripanossomatídeos em insetos. Parasitologia Hoje, v. 10, n. 12; 1994. p. 463-468.

SCHIMIDT, C. D; KUNZ, S. E. Testing Immature Laboratory-reared Stable Flies and Horn Flies for Susceptibility to Insecticides. Journal of Economic Entomology. 1980; v. 73.

SCHULER, M. A. e BERENBAUM, M. R. Estrutura e função do citocromo P450S na adaptação de insetos a toxinas naturais e sintéticas: insights obtidos com modelagem molecular. J Chem Eco. 2013;39:1232–45.

SCOLES, G. A., BROCE, A. B., LYSYK, T. J., PALMER, G. H., 2005. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). Journal of medical entomology, v. 42, n. 4, p. 668-675.

SHEEHAN, G.; FARRELL, G.; KAVANAGH, K. Imune priming: the secret gun of the insect world, Virulence, 2020; 11:1, 238-246.

SIGLE, L. T.; HILLYER, J. F. Os hemócitos dos mosquitos agregam e fagocitam patógenos preferencialmente nas regiões periostiais do coração que experimentam o maior fluxo de hemolinfa. *Dev Comp Immunol.* 2016; 55:90-101.

SILVA, C. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 2002;4(24):68-72.

SILVA, J. C, PESSOA, F. A. C.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M.; ARAÚJO, H. R. C.; FEITOSA, A. P. S.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F. A.; MEDEIROS, J. F. Morphological Characterization of Hemocytes in *Ectemnaspis rorotaense* (Floch & Abonnenc) and *Ectemnaspis trombetense* (Hamada, Py-Daniel & Adler) (Diptera: Simuliidae). *EntomoBrasilis*, 2015; 8 (3): 209-213.

SIM, S.; JUPATANAKUL, N.; DIMOPOULOS, G. Imunidade do mosquito contra arbovírus. *Vírus*. 2014; 6 :4479-4504.

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

SINENKO, S. A.; MANDAL, L.; MARTINEZ-AGOSTO, J. A.; BANERJEE, U. Dual role of wingless signaling in stem-like hematopoietic precursor maintenance in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2009; 16: 756– 63.

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

SMIRNOFF, W. A.; LIPA, J. J. *Herpetomonas swainei* sp. n., a new flagellate parasite of *Neodiprion swainei* (Hymenoptera: Tenthredinidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 16; 1970. p. 187-195

STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. In: N Beckage, editor. *Insect immunology*. San Diego: Academic Press; 2008. p. 25– 47.

SVÄRD, S. G. et al. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular Microbiology*. John Wiley& Sons, Ltd (10.1111), 30(5); 1998.p. 979–989.

TAKAHASHI, S.; ENOMOTO, G. The initial phase of encapsulation of silicone oil injected in *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera, Saturniidae): The innermost structure of the developing capsule. *ZoolSci*. 1995; 12: 303– 9.

TATTIKOTA, S. G.; CHO, B.; LIU, Y.; HU, Y.; BARRERA, V.; STEINBAUGH, M. J. A single-cell survey of *Drosophila* blood. *Elife*. 2020; 9:e54818.

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*. 2012.

TEPASS, U.; FESSLER, L. I.; AZIZ, A.; HARTENSTEIN, V. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development*. 1994; 120: 1829– 37.

TOKURA, A.; FU, G. S.; SAKAMOTO, M.; ENDO, H.; TANAKA, S.; KIKUTA, S.; Factors functioning in nodule melanization of insects and their mechanisms of accumulation in nodules. *J Insect Physiol*. 2014;60: 40– 9.

TRAVERSA, D; OTRANTO, D; IORIO, R. CARLUCCIO, A. CONTRI, A; PAOLETTI, B;

BARTOLINI, R.; GIANGASPERO, A. *Identification of the intermediate hosts of Habronema microstoma and Habronema muscae under field conditions*. Medical and Veterinary Entomology, 22, 283–287, 2008.

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, 55, 1859–1861, 1987.

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

VEGA, F. E. & KAYA, H. K. Insect Patologia. Imprensa Acadêmica. Amsterdã (Holanda) e Boston (Massachusetts). Elsevier. ISBN: 978-0-12- 384984-7. 2 ed, 2012.

VILMOS, P.; KURUCZ, É. Imunidade a insetos: raízes evolutivas do sistema imunológico inato de mamíferos. *ImmunolLett*. 1998; 62 :59-66.

VOTYPKA J.; AVILA-LEVY C. M.; GRELLIER, P.; MASLOV, D. A.; LUKES, J.; YURCHENKO, V. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. Trends Parasitol. 2015; 31: 460-469.

WANG, L.; SLOAN, M. A.; LIGOXYGAKIS, P. Intestinal NF-κB and STAT

WATSON, D. W; GEDEN, C. J; LONG, S. J; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera:Muscidae). Biological Control. 1995; v. 5, p. 405 – 411, 1995.

WILLIAMS, M. J. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol*. 2007; 178: 4711– 6.

XU, J.; CHERRY, S. Vírus e imunidade antiviral em *Drosophila*. *Dev Comp Immunol*. 2014; 42 :67-84.

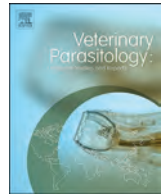
YANG, L. L.; ZHAN, M. Y.; ZHUO, Y. L.; PAN, Y. M.; XU, Y.; ZHOU, X. H. Antimicrobial activities of a proline-rich proprotein from *Spodoptera litura*. *Dev Comp Immunol*. 2018; 87: 137– 46.

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. 1995; v. 48, N° 4.

ZOLTNER, M.; KRIENITZ, N.; FIELD, M. C.; KRAMER, S. Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. PLOS Neglected Tropical Diseases 12(7); 2018.

ZUMPT, F. The Stomoxyine biting flies of the world. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart. 1973.

## **14. ANEXOS**



## Original Article

Establishment and quantitative measure of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) colony production in Rio de Janeiro, Brazil

Melissa Florencio<sup>a,b,1</sup>, Dayana Rosa<sup>a,b,1</sup>, Karina Rigue de Araújo Lima<sup>a</sup>,  
Gabriel Araujo da Costa<sup>a</sup>, Karine Vieira Guimarães Guedes<sup>a</sup>, Patrícia Fampa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica- RJ 23.890-000, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica- RJ 23.890-000, Brazil



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Insect colony

Stable fly

Mechanical vectors

## ABSTRACT

Functional insect vector colonies are essential for the study of their biology, evolution, behavior as well as control strategies of these organisms that transmit pathogens of medical and veterinary importance. In addition to the establishment, improvement and adaptation of pre-established protocols in the maintenance of a colony is important, as it may result in higher production of insects. *Stomoxys calcitrans* or stable fly causes important economic losses in production of beef and milk, besides mechanically transmitting a great variety of pathogens to cattle. In order to generate flies under laboratory conditions, a colony of *S. calcitrans* was established at our laboratory considering local environment geographical characteristics. Adults collected in UFRRJ campus were kept in the laboratory and maintained with daily feeding on anticoagulant-containing bovine blood 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 monthly measured biological parameters included the development of eggs into pupae, of pupae into F1 adults and the comparison of the number of flies collected in the field with the number of F1 flies emerged in the laboratory. The data presented here was obtained from March to November 2019. In that period, the average per month of flies collected in the field was 604.2, of generated eggs was 2694.3, of generated pupae was 349.5 and of generated F1 flies in the laboratory was 205.9. Fluctuations of abiotic and biological factors contributed to an uneven production of flies in the colony throughout the months. This is the first report with numerical quantification of *S. calcitrans* flies production in a laboratory in Brazil. Some methodologies used in the colony shall be reevaluated and modified with the goal of obtaining higher numbers of flies generated in the laboratory over time.

## 1. Introduction

The only species of the genus that occurs in America, *Stomoxys calcitrans* is a Dipteran insect known as stable fly. Males and females of this hematophagous organism feed on mammals' blood, mainly equine and bovine in the breeding environment (Guimarães, 1984). As a consequence of the absence of anesthetic components in the saliva of *S. calcitrans*, their bites are painful and causes great stress (Cortinas and Jones, 2006), interfering with beef and milk production (Campbell et al., 2001). In Brazil, it is estimated that annual economic losses caused by the presence of *S. calcitrans* are of 340 million dollars (Grisi et al., 2014). Livestock and agricultural activity is responsible for 24%

of Gross Domestic Product (IBGE - Brazilian Institute of Geography and Statistics, 2017) of Brazil and it is estimated that livestock activity generated around 19.6 billion dollars in 2019 (IBGE, 2019). The proportion of one fly per animal is enough to decrease milk production by 0.7% (Bruce and Decker, 1958). Infested animals may present reduction of 19% of weight gain and of 40 to 60% decrease of milk production (Campbell et al., 2001).

Besides the direct damage caused by the fly bites, *S. calcitrans* is a mechanical vector of several pathogens, including virus, bacteria, protozoa and helminths (Baldacchino et al., 2013) as diverse as West Nile fever virus (Doyle et al., 2011), *Bacillus anthracis* (Turell and Knudson, 1987), *Anaplasma marginale* (Scoles et al., 2005; Oliveira

\* Corresponding author.

E-mail address: [pfampa@ufrrj.br](mailto:pfampa@ufrrj.br) (P. Fampa).

<sup>1</sup> M.F. and D.R. contributed equally to this work.

et al., 2011), *Trypanosoma vivax* (Mihok et al., 1995; Cuglovici et al., 2010), *Leishmania tropica* (Berberian, 1938), *Habronema microstoma* (Traversa et al., 2008) among others. Pathogens mechanical transmission is a consequence of hematophagic feeding behavior and occurs due to mouthparts contamination as well as regurgitation of digestive tract content (Baldacchino et al., 2013). It is difficult to estimate the additional economic impact potentially caused by the diseases transmitted by the fly.

Insecticide use for the control of *S. calcitrans* showed promising effects at first, with LC<sub>50</sub> values such as 0.037 ppm for diflubenzurane, 0.048 ppm for MK-933 (Schmidt and Kunz, 1980). However, the major obstacles for this strategy are the lack of a class of insecticides specifically targeting this group of insects and the emergence of populations resistant to treatment with certain compounds. It is not uncommon to identify populations of *S. calcitrans* resistant to organophosphate and pyrethroid insecticides. Depending on the population, resistance can vary from 2 to 100% (Cilek and Greene, 1994). In addition, conditions such as climate and time of exposure can affect the performance of these insecticides (Hogsette et al., 2008).

In nature, female flies lay up to 400 eggs during their lifetime. *Stomoxys calcitrans* eggs are elongated and present a longitudinal sulcus. Immature forms develop in organic matter, even in bovine and equine feces mixed with dry straw, chopped grass and sugarcane residues, preferentially in a fermented and aerated state with the temperature between 15 and 30 °C (Guimarães, 1984). Larvae present three development instars and then transform into pupae. The lifecycle duration in nature is directly influenced by the environment temperature which is in ideal conditions around 30 °C, when eggs to adults' transformation lasts on average 30 days (Brito et al., 2008).

Little is known about the mechanisms by which pathogens develop and are transmitted by the fly and since that an efficient method of controlling the insect is not available yet, it is essential to improve knowledge about its biology, considering *S. calcitrans* veterinary importance. An important step to achieve this is the establishment of *S. calcitrans* colonies in a controlled environment for the performance of reliable studies. Herein, we established and developed a colony of the stable fly considering our university environment specific conditions. The colony was started with flies collected in animals present in the university campus and established after adaptations of pre described protocols, being daily observed in order to accompany egg, larvae, pupa and adult production according to physical and diet conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fly collecting

Flies were collected at W.O. Neitz Parasitological Research Station in Rural Federal University of Rio de Janeiro (UFRRJ) campus, 22° 46' 8.994" S and 43° 41' 42.288" W, at the city of Seropédica, Rio de Janeiro state, at least three times a week from March to November 2019. Flies were caught directly from tied bovines for 40 min using insect nets, transferred to cages and transported to the laboratory that is located around 1 km far away from the collecting spot.

### 2.2. Screening and identification

At the laboratory, flies were anesthetized at -20 °C for approximately five minutes and distributed into 50 mL Falcon tubes and kept in ice bath. They were individually observed under stereoscopic microscope, being identified according to Carvalho et al. (2002). Flies not belonging to *S. calcitrans* species and or mite parasitized flies (Fig. 1) were discharged. After screening, field flies were transferred to plastic cages, in a maximum of 500 flies per cage.



Fig. 1. Parasitized *Stomoxys calcitrans*. Arrows show the mites.

### 2.3. Adult flies maintenance and feeding

Flies were kept in plastic containers (25 × 30 × 22 cm) adapted as cages. Beneath the container lid, a piece of polyamide net (weight of 22 g/m<sup>2</sup>), with the same size of the lid, was fixed with hot glue and all the exterior board of the cage lid was sealed with masking tape to minimize contamination with other arthropod species. Almost all the bottom of the plastic container was removed and the resulting opening was also covered with polyamide net fixed with hot glue. To work as an adult flies cage, the plastic container was kept upside down, with its lid turned at the bottom surface and the free polyamide net at the superior surface. Flies were daily fed with citrated blood obtained from a slaughterhouse in the city of Piraí, RJ. Blood was kept frozen at -20 °C, being thawed in the moment of use by heating in water bath at 40 °C and offered to the flies in cotton disposable sanitary napkins. These sanitary napkins were positioned on the superior part (on the polyamide net cover) with the blood-embedded surface turned to the interior of the cage and being daily replaced. As contamination of the colony with *Drosophila* sp. remained high over the initial months, a piece of polyester net with a tighter weave (weight of 46 g/m<sup>2</sup>) was also added covering the sanitary napkins and all the polyamide net area and fixed with masking taper.

### 2.4. Eggs collecting

A black piece of cloth (22 × 15 cm, weight of 130 g/m<sup>2</sup>) folded in half and wrapped around a water-soaked cotton, where flies prefer to oviposit once they are attracted to dark colors (Hogsette and Foil, 2018), was positioned in the superior part of the cage next to the sanitary napkin. Eggs were daily collected there, but also in the disposable napkin and in the inferior part of the cage that was covered with bond paper. All eggs collected on the day were washed with distilled water to remove blood remnants, being retained in a granulometric sieve (0.8 mm), counted at naked eye, transferred to plastic containers (18 × 13 × 6 cm) containing 90 g of the larvae diet and kept at room temperature or at 34 °C. Part of the lids of these plastic containers was removed and the resulting opening covered with the tighter polyester net fixed with hot glue in order to minimize contamination with opportunistic invader arthropods.



## 2.5. Larvae diet

The diet used for immature stages development was prepared as described by Christmas (1970) with adaptations. Each diet lot contained 330 g of crushed sugar cane, 125 g of wheat bran, 40 g of meat meal, 5 g of sodium bicarbonate and 125 mL of distilled water. This mixture was kept in a non-sealed recipient at room temperature for three days in order to ferment. Then, it was stored in the refrigerator at 4° C. For use, the diet was removed from the refrigerator until it reached room temperature, the generated colony eggs were added and then incubated at higher temperatures as described above. Nystatin at 100,000 IU/ mL (International Units per mL) diluted in water 1:100 was sprinkled when necessary to avoid fungus proliferation.

## 2.6. Larvae

Larvae development in the diets was observed daily. It was determined how many days were necessary for the eggs to hatch and to establish the proportion generated egg: hatched larvae. In the months of July, August and September 2019, the diets containing eggs were kept in BOD (Biological Oxygen Demand) incubator at 34° C. Otherwise, they were kept at room temperature.

## 2.7. Pupae

Pupae were daily removed from the diets using tweezers, cleaned by emerging on distilled water followed by drying in paper towel, and transferred to clean plastic disposable urine collection cups until adult emergence.

## 2.8. Adult flies

Newly emerged F1 flies were transferred to empty adult cages. The groups consisted of flies that emerged until three consecutive days. Consequently, it was possible to control the age and nutritional state of the flies, important parameters that must be considered for future experiments. In July, F1 flies started to be reintroduced into field flies cages in order to obtain eggs from these crossings and initiate colony self-sustainability. In November, this procedure was no longer performed.

## 2.9. Abiotic factors

The temperature and air relative humidity of the room measurements were daily recorded by a thermo-hygrometer. The temperature was not artificially controlled in the room where the colony was installed. The relative humidity was artificially altered whenever it was below 65%. Trays with water were distributed throughout the room until the relative humidity reached values above 65%.

## 2.10. Statistics

Colony production was analyzed according to the following criteria: number of collected field flies versus number of generated eggs; number of generated eggs versus number of generated pupae; number of generated pupae versus emerged F1 adults; and finally number of collected field flies versus emerged F1 adults. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software, version 5.0, in one-way ANOVA tests for independent samples. Significance values were represented as (\*) for values with  $p < .05$ ; (\*\*) for values with  $p < .01$  and (\*\*\*) for values with  $p < .001$ .

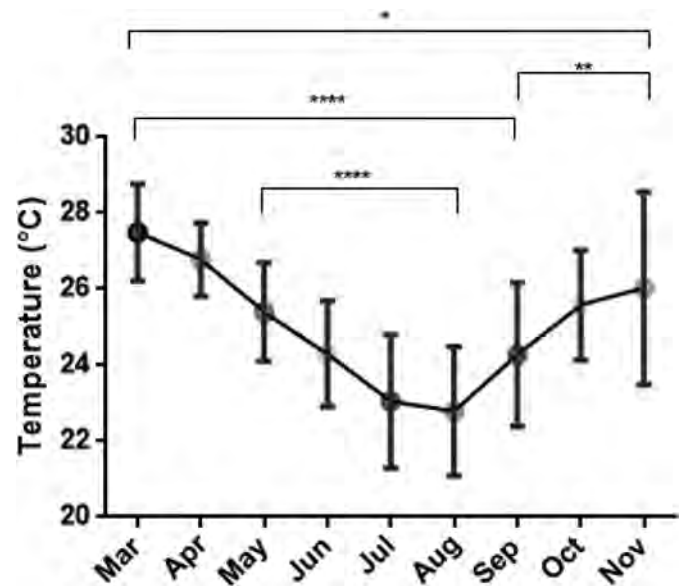


Fig. 2. Temperature variation throughout the months (March to November 2019). Mean temperature for each month. (\*) for values with  $p < .05$ ; (\*\*) for values with  $p < .01$  and (\*\*\*) for values with  $p < .001$ .

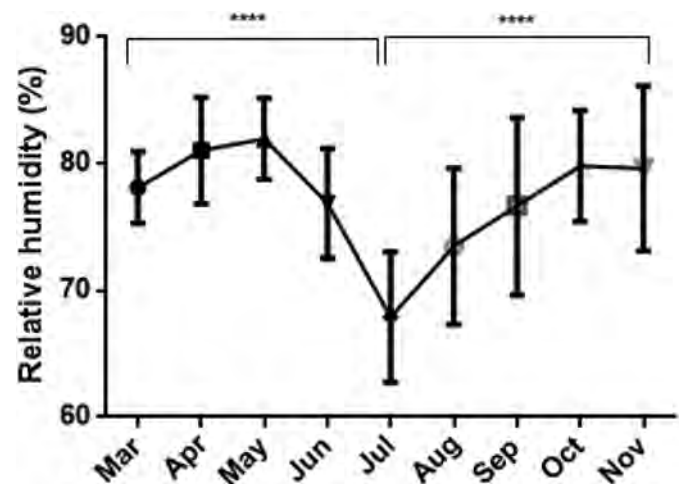


Fig. 3. Relative air humidity variation throughout the months (March to November 2019). Mean relative air humidity for each month. (\*) for values with  $p < .05$ ; (\*\*) for values with  $p < .01$  and (\*\*\*) for values with  $p < .001$ .

## 3. Results

### 3.1. Abiotic factors variation in *S. calcitrans* colony

The analyzed abiotic factors were room temperature (Fig. 2) and air relative humidity (ARH) (Fig. 3) inside the room where the colony was kept. The temperature was not artificially controlled at any moment. The highest registered temperature was 29.6° C in March 2019 and the lowest was 20.0° C in July 2019. When the ARH value was lower than 65%, it was positively controlled with the addition of trays containing water in the colony room. The highest registered ARH was 91% in November 2019 and the lowest was 56% in July 2019. There were also statistically differences in ARH values throughout the months.

### 3.2. Colony production

The highest number of collected flies occurred in October with a



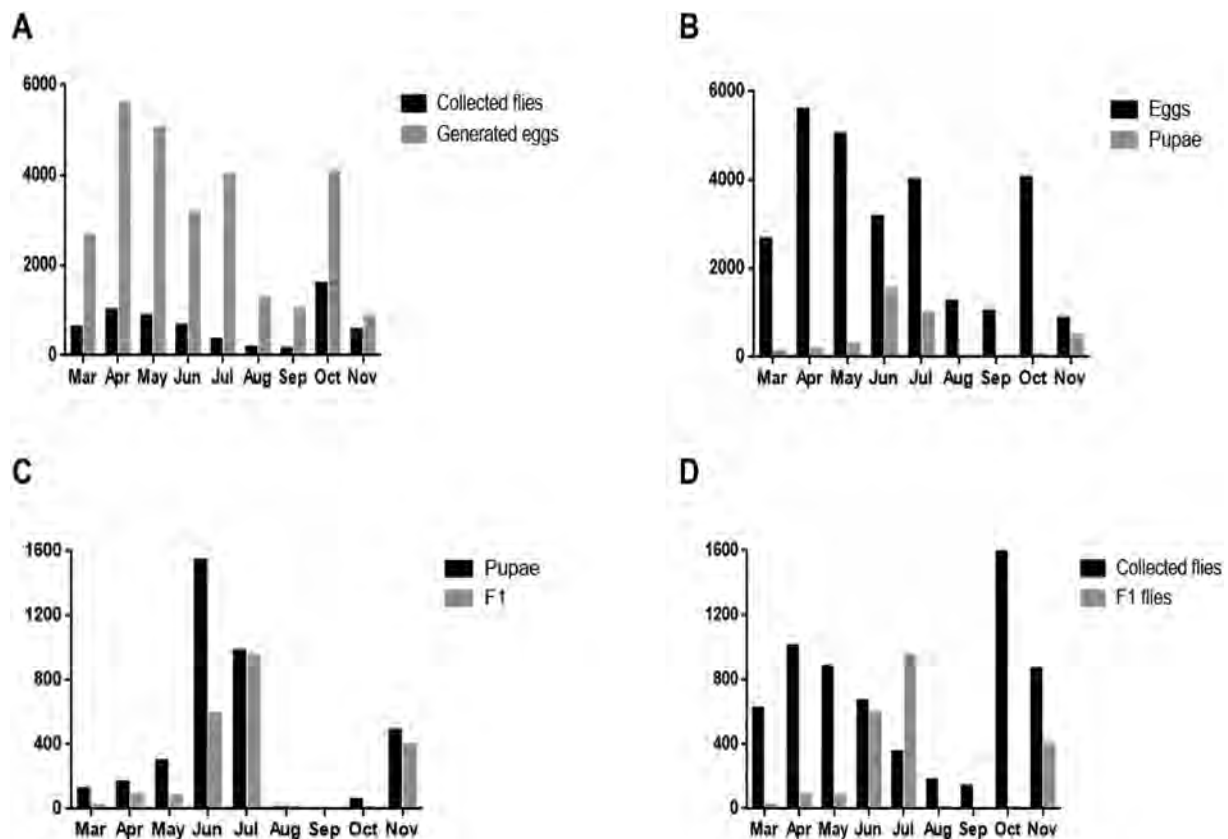


Fig. 4. Colony production according to the following criteria: number of collected field flies versus number of collected eggs (A); number of collected eggs versus number of collected pupae (B); number of collected pupae versus emerged adults (C); number of collected field flies versus emerged adults (D).

total of 1604 individuals. The mean number per month was 604.16. The number of laid eggs was highest in April ( $n = 5596$ ). The mean number per month was 2694.3. The number of collected flies was low in some months such as August ( $n = 179$ ) and September ( $n = 140$ ) (Fig. 4 A). It was due to climate conditions such as low temperatures, rainy weather and adverse conditions regarding the animals from which the flies were collected.

Although the highest number of collected eggs occurred in April, the highest number of generated pupae ( $n = 1544$ ) occurred in June. The mean number of generated pupae per month was 349.4. In May, eggs took from six to eleven days to hatch until their complete development into L3 instar. In June, this process took from six to nine days and in July from six to eight days (Fig. 4 B).

The greatest number of emerged adults occurred in the month of July ( $n = 950$  F1 adults). Pupae that generated these adults had been kept in BOD incubator at  $34^{\circ}\text{C}$ . By that time, we started a new procedure by reintroducing F1 flies into field flies cages in order to obtain eggs from these crossings and initiate colony self-sustainability. However, the result obtained was not the expected. In the months of August and September there were the lowest numbers of collected field flies and of F1 flies emergence, in spite of also keeping immature stages at  $34^{\circ}\text{C}$ . Compared to the high number of generated eggs in July, almost 4000, in August and September it did not reach 2000. The mean number of adults' emergence per month was 205.9 flies (Fig. 4 C).

The last analyzed parameter to measure colony production efficiency was the relation of collected field flies versus F1 emerged flies. July was the only month when the proportion of emerged F1 flies:field collected flies was positive being 2.7:1. June was the second best with almost 1:1 (Fig. 4 D).

The production of new flies per month was also analyzed. In March, 4.68% of the eggs generated pupae and 16.8% of pupae generated F1 adults (Fig. 5 A). Considering the number of collected field flies versus

the number of emerged F1 flies, the efficiency in March was 3.37%, that is, the number of emerged F1 flies corresponded to 3.37% of the total number of field collected flies. In April, 2.98% of the eggs generated pupae and 51.49% of pupae generated F1 adults, and the efficiency in April was 8.53% (Fig. 5 B). In May, 5.91% of the eggs generated pupae and 26.17% of pupae generated F1 adults, and the efficiency in May was 8.84% (Fig. 5 C). In June, 49% of the eggs generated pupae and 38% of pupae generated F1 adults, and the efficiency in June was 88.77% (Fig. 5 D). In July, 24.5% of the eggs generated pupae and 96.74% of pupae generated F1 adults, and the efficiency in July was 269.88% (Fig. 5 E). In August, 0.39% of the eggs generated pupae and 100% of pupae generated F1 adults, and the efficiency in August was 6.14% (Fig. 5 F). In September, though a total of 140 flies were collected in the field and a total of 1025 eggs were generated, no pupae and consequently no F1 flies were obtained with an efficiency of 0% (Fig. 5 G). In October, the production of F1 flies was very low with an efficiency of 0.37% (Fig. 5 H). In November, production was reasonably recovered with an efficiency of 69.1% for the production of generated F1 flies in relation to field collected ones.

#### 4. Discussion

Laboratory insect colonies are of extreme importance for better understanding their biology characteristics, such as analysis of vector competence, life cycle, physiology behavior and control strategies under controlled circumstances (Chelbi and Zhioua, 2019). The well succeeded establishment of these colonies is a challenger and depends on the fortunate reproducibility of the conditions found in nature (Salem et al., 2012; Cannet et al., 2015; Chelbi and Zhioua, 2019; Montezano et al., 2019). The searching for the best conditions and adaptations, considering efficient artificial feeding, appropriate diets for immature stages, more favorable abiotic conditions, impairment of

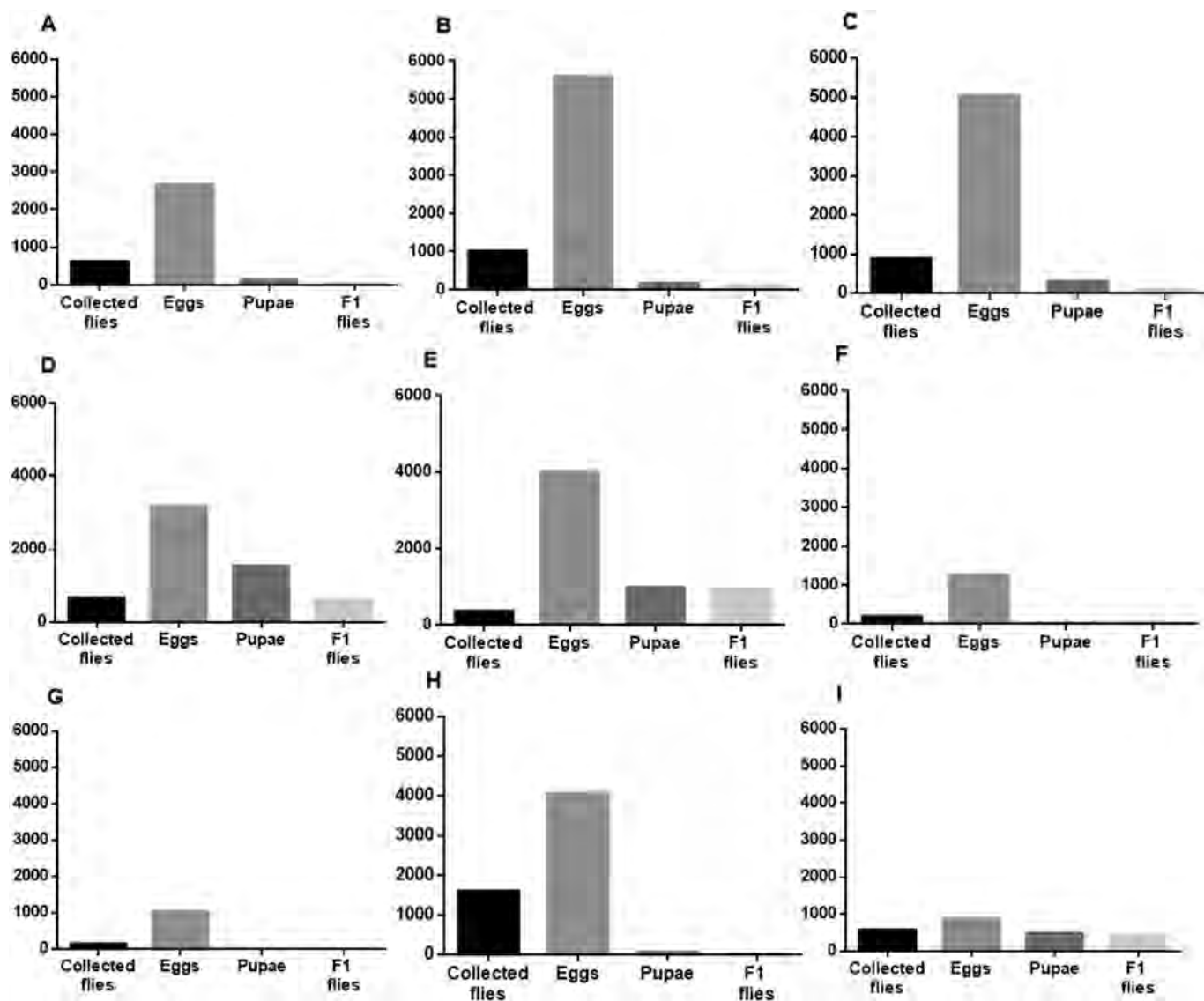


Fig. 5. Colony production throughout the months of March and November 2019 (A-H) showing the number of collected field flies, number of collected eggs, number of collected pupae and number of emerged F1 adults.

invasion by contaminating organisms is constant.

Protocols to establish and keep *S. calcitrans* laboratory colonies have been described (Doty, 1937; Christmas, 1970; Bailey et al., 1975; Brito et al., 2008; Salem et al., 2012). Overall, these works provide qualitative detailed description of the adopted conditions (cage models, utilized diet), but quantitative information involving the number of generated flies is not given, as in the case of the establishment of *S. calcitrans* colony report in UFRRJ campus by Moraes (unpublished data). Salem et al. (2012) were the first to furnish quantitative information such as colony production numbers, life cycle duration and flies longevity in the laboratory. It is expected that insect colonies present the best possible conditions to allow the development of all life phases of the organism in high numbers in order to be used in scientific investigations.

We started a colony of *S. calcitrans* in the campus of UFRRJ, aware that it is not always possible to fully reproduce all the previous reported conditions, either due to infrastructure issues or for specific geographical characteristics. Based on reported protocols, but with adaptations, we have obtained all the life stages, from eggs to adults, of this insect and analyzed the colony production efficiency from March to November 2019.

From March until mid-May, the diet containing the immature phases of the stable fly were kept at room temperature, however in the colder months they were maintained in BOD incubator at 34° C. At first, the incubation of the larvae at the controlled temperature was favorable, once the rate of eggs conversion to pupae were of 4.68 and 2.98% in March and April with room temperature, respectively, but in May, June and July, with eggs hatching and larvae development at 34° C, this rate reached 5.41, 49 and 24.5%. These results are not according to previous reported data when immature stages did not develop in temperatures higher than 30° C (Hansens, 1951; Gilles et al., 2005). Other works considered lower temperatures around 23 °C (Salem et al., 2012), 25 °C (Christmas, 1970; Brito et al., 2008) or 27 °C (unpublished data) as ideal for the development of stable fly. In the months of March and April the immature stages were kept at these lower temperatures in our colony (Fig. 1), which did not ensure good egg to pupae rate conversion. Additionally, the temperature values variation throughout the months were statistically significant which has probably affected the flies' development. Nevertheless, in the subsequent months of August, September and October, though eggs remained being kept at 34° C, we performed a methodological change by mixing F1 and field flies to stimulate their crossings in order to obtain colony self-sustainability.

Our attempt failed and in the subsequent months, no eggs were produced and consequently neither larvae, pupae nor adults were obtained. It is not clear why field flies x F1 flies crossings failed. In November, immature stages were no longer kept in the BOD incubator and considerably resumed development at room temperature.

Moraes et al. (2008) reported the fragility of *S. calcitrans* eggs to manipulation, which may explain the low eclosion rate. The chosen methodology of egg collecting and handling is crucial to assure a greater efficiency colony production. A high number of eggs were generated every month, but conversion to pupae did not follow the same pattern throughout the months.

Early in the establishment of our colony, *Drosophila* sp. frequently laid eggs in the colony diets, constituting an opportunistic invader. Besides, it carried mites belonging to *Macrocheles* genus, a natural predator of *S. calcitrans* immature stages and parasite of adult flies (Kinn, 1966). The problem was solved when the polyester mesh with tighter weave was also added to cover the sanitary napkins and polyamide net in the cages and impaired *Drosophila* sp. entrance. After the polyester mesh addition, the conversion from eggs to pupae reached the rate of 49% in July. Salem et al. (2012) observed great mortality in their *S. calcitrans* colony after larvae conversion to pupae step and attributed this fact to the introduction of *Macrocheles* sp. They managed to eradicate the mites utilizing Amitraz that presents acaricide and insecticide effect. Although they did not observe increased mortality of the flies after Amitraz administration, the impact of this component on their life cycle remains to be evaluated and we chose not to use it.

The diet of the immature stages is organic matter-rich. Therefore, at first, all diet ingredients were sterilized by autoclaving to eliminate the presence of contaminating microorganisms. However, after the appearance of fungus in the autoclaved diet and because Mramba et al. (2007) had also observed a better development of immature stages in non-sterilized substrate, this procedure was no longer performed. The usage of fungicide Nystatin was satisfactory to control the proliferation of fungus on the diet.

The usage of exclusive recipients for pupae separated from larvae diet is important to avoid contact with *Macrocheles* sp. mite predator. Two days after pupae collecting, adults started to emerge. In our best results when immature stages were kept at BOD incubator at 34 °C in July, the complete development from eggs gathering until adult flies emergence lasted nine days. Salem et al., 2012 observed a minimum development time of 16 days. Gilles et al. (2005) correlated the duration of development time and the temperature, showing that there was positive correlation between temperature increase and egg to adult time shortening, for example, at 15 °C, the mean time of egg to adult development was of 70 days and at 35 °C it dropped to 12 days. In the month of July, when the production of the colony reached its best results with 950 emerged F1 flies versus 393 collected in the field, we also started reintroducing F1 flies into field flies cages. The goal was obtaining a self-sustaining colony. Nonetheless, the results did not correspond to what we expected and in the following months of August, September and October, the immature stages did not develop well. Besides this change in the methodology, August and September are cold months in the South Hemisphere and there were climate and other unfavorable conditions that contributed to extremely low numbers of collected field flies.

## 5. Conclusion

We managed to establish *S. calcitrans* colony in our laboratory with production of F1 flies. We have identified some aspects that contributed positively and others that contributed negatively to flies' production. It is not trivial to precisely determine all the conjecture of factors that account to well succeeded maintenance of the colony, but it is certainly a combination of internal and external (field) factors. The fluctuations of some of these factors are expected, but their effects must be compensated and minimized.

## Ethical statement

We have utilized bovine blood obtained from a slaughterhouse in the city of Pirai, RJ that would be discharged to feed the flies.

## Declaration of Competing Interest

None.

## Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support. We also Professor Avelino Bittencourt (IV/UFRRJ) who shared his knowledge about *Stomoxys calcitrans* collecting and maintenance.

## References

- Bailey, D.L., Whitfield, T.L., Labrecque, G.C., 1975. Laboratory biology and techniques for mass producing the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. J. Med. Entomol. 12, 189–193.
- Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T., Duvallet, T., 2013. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. Parasite. 20, 26–39.
- Berberian, D.A., 1938. Successful transmission of cutaneous Leishmaniasis by the bites of *Stomoxys calcitrans*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 38, 254–256.
- Brito, L.G., Oliveira, M.C.S., Gigliotti, R., Barbieri, F.S., Netto, F.G.S., Chagas, A.C.S., Celestino, O., 2008. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteros de interesse veterinário em laboratório. (ISSN 0103-9865).
- Bruce, W.N., Decker, G.C., 1958. The relationship of stable fly abundance to milk production in dairy cattle. J. Econ. Entomol. 51, 269–274.
- Campbell, J.B., Skoda, S.R., Berkebile, D.R., Boxler, D.J., Thomas, G.D., Adams, D.C., Davis, R., 2001. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle. J. Econ. Entomol. 94, 780–783.
- Cannet, A., Akhouni, M., Berenger, J.M., Michel, G., Marty, G., Delaunay, P., 2015. A review of data on laboratory colonies of bed bugs (Cimicidae), an insect of emerging medical relevance. Parasite. 22, 1–7.
- Carvalho, C.J.B., Moura, M.O., Ribeiro, P.B., 2002. Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Faniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. Revista Brasileira de Entomologia. 46, 107–114.
- Chelbi, I., Zhioua, E., 2019. Establishment, Maintenance of *Phlebotomus* spp. in the Laboratory, and Infection with *Leishmania* spp. Springer Science + Business Media, LLC, part of Springer Nature Cap 19.
- Christmas, P.E., 1970. Laboratory rearing the biting fly *Stomoxys calcitrans*. N Z Entomol. 4, 46–49.
- Cilek, J.E., Greene, G.L., 1994. Stable fly (Diptera: Muscidae) insecticide resistance in Kansas cattle feedlots. J. Econ. Entomol. 87, 275–279.
- Cortinas, R., Jones, C.J., 2006. Ectoparasites of cattle and small ruminants. Vet. Clin. Food Anim. 22, 673–693.
- Cuglovici, D.A., Bartholomeu, D.C., Reis-Cunha, J.L., Carvalho, A.U., Ribeiro, M.F., 2010. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state. Brazil. Veterinary Parasitol. 169, 320–326.
- Doty, A.E., 1937. Convenient method of rearing the stable fly. J. Econ. Entomol. 30, 367–369.
- Doyle, M.S., Swope, B.N., Hogsette, J.A., Burkhalter, K.L., Savage, H.M., Nasci, R.S., 2011. Vector competence of the stable fly (Diptera: Muscidae) for West Nile virus. J. Med. Entomol. 48, 656–668.
- Gilles, J., David, J.F., Duvallet, G., 2005. Temperature effects on development and survival of two stable flies, *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* (Diptera: Muscidae), in La Réunion Island. J. Med. Entomol. 42, 260–265.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., de Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., de León, A.A.P., Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol. 23, 150–156.
- Guimarães, J.H., 1984. Mosca dos estábulos – uma importante praga do gado. Agroquímica Ciba – Geigy. 23, 10–14.
- Hansens, E., 1951. The stable Fly and its effect on seashore recreation areas in New Jersey. J. Econ. Entomol. 44, 482–487.
- Hogsette, J.A., Foil, L.D., 2018. Blue and black cloth targets: effects of size, shape, and color on stable Fly (Diptera: Muscidae) attraction. J. Econ. Entomol. 111, 974–979.
- Hogsette, J.A., Nalli, A., Foil, L.D., 2008. Evaluation of different insecticides and fabric types for development of treated targets for stable Fly (Diptera: Muscidae) control. J. Econ. Entomol. 101, 1034–1038.
- IBGE, 2017. <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/20166-pib-avanca-1-0-em-2017-e-fecha-ano-em-r-6-6-trilhoes>.
- IBGE, 2019. <http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017-CGEE/DCEE/SPA/MAPA> [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica\\_agricola/](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica_agricola/)

- agropecuaria-brasileira-em-numeros. acesso em agosto de .
- Kinn, D.N., 1966. Predation by the mite, *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina: Macrochelidae), on three species of flies. J. Med. Entomol. 3, 155–158.
- Mihok, S., Maramba, O., Munyoki, E., Kagoiya, J., 1995. Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxyinae (Diptera: Muscidae). Trop. Med. Parasitol. 46, 103–105.
- Montezano, D.G., Hunt, T.J., Specht, A., Luz, P.M.C., Peterson, J.A., 2019. Life-history parameters of *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. J. Insect Sci. 19, 1–8.
- Moraes, A.P.R., Angelo, I.C., Fernandes, E.K.K., Bittencourt, V.R.E.P., Bittencourt, A.J., 2008. Virulence of *Metarhizium anisopliae* to eggs and immature stages of *Stomoxys calcitrans*. Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci. 149, 384–387.
- Mramba, F., Broce, A.B., Zurek, L., 2007. Vector competence of stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae), for *Enterobacter sakazakii*. J. Vect. Ecol. 32, 134–139.
- Oliveira, J.B., Montoya, J., Romero, J.J., Urbina, A., Soto-Barrientos, N., Melo, E.S.P., Ramos, C.A.N., Araujo, F.R., 2011. Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. Vet. Parasitol. 177, 359–365.
- Salem, A., Franc, M., Jacquet, P., Bouhsira, E., Liénard, E., 2012. Feeding and breeding aspects of *Stomoxys calcitrans* (diptera: muscidae) under laboratory conditions. Parasite. 19, 309–317.
- Schmidt, C.D., Kunz, S.E., 1980. Testing immature laboratory-reared stable flies and horn flies for susceptibility to insecticides. J. Econ. Entomol. 73, 702–703.
- Scoles, G.A., Broce, A.B., Lysyk, T.J., Palmer, G.H., 2005. 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. 42, 668–675.
- Traversa, D., Otranto, D., Iorio, R., Carluccio, A., Contri, A., Paoletti, B., Bartolini, R., Giangaspero, A., 2008. Identification of the intermediate hosts of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* under field conditions. Med. Vet. Entomol. 22, 283–287.
- Turell, M.J., Knudson, G.B., 1987. Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). Infect. Immun. 55, 1859–1861.