

RENATA CRISTINA BARBOSA

**EXPRESSÃO GÊNICA NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS ADULTAS DO  
MOSQUITO AUTÓGENO *Toxorhynchites theobaldi* (DIPTERA, CULICIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B238e  
2019  
Barbosa, Renata Cristina, 1982-  
Expressão gênica no intestino médio de fêmeas adultas do  
mosquito autógeno *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera,  
Culicidae) / Renata Cristina Barbosa. – Viçosa, MG, 2019.  
76 f.: il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2019.

Inclui bibliografia.

1. *Toxorhynchites theobaldi*. 2. Intestinos. 3. Autogenia.  
I. Martins, Gustavo Ferreira, 1980-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.772

RENATA CRISTINA BARBOSA

**EXPRESSÃO GÊNICA NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS ADULTAS DO  
MOSQUITO AUTÓGENO *Toxorhynchites theobaldi* (DIPTERA, CULICIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de setembro de 2019.

Assentimento:

---

Renata Cristina Barbosa  
(Autor)

---

Gustavo Ferreira Martins  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Programa de Biologia Celular e as entidades de apoio à pesquisa CAPES (PVE 88881.030429/2013-01) e Fapemig (APQ-00560-17) pela oportunidade a mim concedida.

Agradeço ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos – Departamento de Biologia Geral (DBG) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) - MG pela permissão e compreensão para realização das atividades relacionadas ao doutorado.

Agradeço ao meu orientador Gustavo Ferreira Martins, por ter aceitado me orientar e por toda a disponibilidade, presteza e paciência em todos os momentos, o que foi fundamental para a conclusão do curso. Acredito que foi um privilégio ser orientada por uma pessoa com características tão importantes na formação acadêmica de futuros pesquisadores.

Agradeço aos meus amigos e colaboradores pelo auxílio em várias fases do trabalho, Tales Vicari, Carolina Macedo e Henrique Barbosa. Agradeço ao Kenner que foi quem sugeriu a realização desse projeto que foi aceito prontamente pelo meu orientador, Gustavo. E em especial à amiga e companheira, Raquel Godoy, que esteve comigo nos finais de semana e durante várias noites no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos me auxiliando em várias questões sobre o trabalho, devido à semelhança do assunto dos nossos projetos.

Agradeço ao Núcleo de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa, ao Pedro Vidigal, que sempre foi muito atencioso e prestativo durante os vários momentos que precisei da sua colaboração.

Agradeço ao Professor Marcelo Ramalho-Ortigão Disease Vectors Laboratory, Department of Entomology, Kansas State University, Manhattan, USA pela colaboração no início do projeto permitindo a utilização do seu laboratório para o armazenamento e preparo das amostras para sequenciar.

Meu muito obrigado aos Pesquisadores José Marcos Ribeiro e Fabiano Oliveira do National Institute of Allergy and Infectious Diseases/National Institute of Health, Rockvile Pike, Bethesda, Maryland pelo auxílio com as análises de bioinformática, fundamentais para o desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Immunovirologia - DBG - UFV, em especial ao pesquisador Roberto que sempre foi muito solícito durante a realização das análises de expressão gênica.

Agradeço à secretária do Programa de Biologia Celular e Estrutural – DBG -UFV, Elisabeth, pela eficiência e acessibilidade em todos os momentos durante todo o percurso em que precisei do seu auxílio.

Agradeço a Professora Karla Yotoko coordenadora do laboratório de Bioinformática e Evolução – DBG - UFV pelo auxílio no delineamento das análises filogenéticas melhorando muito a qualidade dos resultados obtidos.

Agradeço ao meu namorado Felipe, meus pais Vicente e Irani pelo apoio, paciência e compreensão requerida durante vários momentos.

## RESUMO

BARBOSA, Renata Cristina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2019. **Expressão gênica no intestino médio de fêmeas adultas do mosquito autógeno *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae)**. Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

O mosquito não-hematófago *T. theobaldi* pertence a um dos três gêneros de culicídeos que não necessitam da ingestão de sangue para reproduzir. Alimenta-se basicamente de carboidratos através da ingestão de néctar, que provém a energia e os nutrientes necessários para suas funções primordiais. A digestão ocorre principalmente no intestino médio que também é o local principal de interação com patógenos provenientes da dieta. O intestino médio de *T. theobaldi* difere dos culicídeos hematófagos por estar permanentemente recoberto pela matriz peritrófica, além de possuir a região médio anterior bastante desenvolvido em relação ao intestino médio posterior atrofiado. A análise dos transcritos expressos no intestino médio posterior bem como a expressão diferencial entre as regiões, nos mostrou que elas são funcionalmente diferentes. A região médio anterior, especializou na digestão de carboidratos e a região médio posterior semelhante aos demais mosquitos é o principal local de digestão e absorção, principalmente de proteínas. Os processos de síntese, proteólise e transporte de proteínas representam a maioria dos transcritos. Os microorganismos ativam o sistema imune inato através de mecanismos regulatórios semelhantes aos demais mosquitos sendo mais proeminente na região posterior. Além de suplementar a dieta desse mosquito com nutrientes importantes, como aminoácidos de cadeia longa e vitaminas do complexo B. O metabolismo de proteção contra espécies reativas de oxigênio é elevado nas diferentes regiões do intestino médio devido à importância para manutenção da homeostase. No entanto, os mosquitos hematófagos diferem de *T. theobaldi* devido a maior diversidade e complexidade nos transcritos envolvidos nos mecanismos de combate ao estresse oxidativo provocado pela ingestão de sangue. Também foi observado que diferentes vias metabólicas são utilizadas para produção de energia e síntese de metabólitos importantes, o que representa uma vantagem adaptativa frente a condições ambientais adversas. Estudar as diferenças no processo de digestão entre *T. theobaldi* e os mosquitos hematófagos constitui uma ferramenta importante para o entendimento de como as mudanças no processo de digestão envolvidas na aquisição da capacidade de digerir sangue possibilitou também a infecção dos mosquitos com os mais variados patógenos.

Palavras-chave: Intestino médio, autogenia, *Toxorhynchites theobaldi*

## ABSTRACT

BARBOSA, Renata Cristina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2019. **Gene expression in the midgut of adult female mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae)**. Advisor: Gustavo Ferreira Martins.

The non-hematophagous mosquito *T. theobaldi* belongs to one of three genera of culicids that do not require blood ingestion to reproduce. It feeds primarily on carbohydrates through the intake of nectar, which provides the energy and nutrients needed for its primary functions, digested occurs mainly in the midgut. The midgut of *T. theobaldi* differs from hematophagous culicids in that it is permanently covered by the peritrophic matrix, besides having a well-developed anterior midgut region concerning the atrophied posterior midgut. Analysis of the transcripts expressed in the posterior midgut as well as the differential expression between regions showed us that they are functionally different. The anterior midgut region specializes in carbohydrate digestion and the posterior midgut region like other mosquitoes is the main site of digestion and absorption, especially of proteins. The processes of protein synthesis, proteolysis, and transport represent most transcripts. The innate immune system involves regulatory mechanisms like other mosquitoes being more prominent in the posterior region. The presence of several classes of antimicrobial peptides allows us to speculate that microorganisms are an important source of nutrients for this mosquito. Protective metabolism against reactive oxygen species is high in different midgut regions due to the importance of maintaining homeostasis. However, hematophagous mosquitoes differ from *T. theobaldi* due to their greater diversity and complexity in the transcripts involved in the mechanisms of combating oxidative stress caused by blood ingestion. It was also observed that different metabolic pathways are used for energy production and synthesis of important metabolites, which represents an adaptive advantage against adverse environmental conditions. The study of the differences in digestion process of *T. theobaldi* in comparison to the hematophagous mosquitoes comprises a relevant tool to be explored in the understanding of how the acquisition of the capacity of blood digestion also made it possible for mosquitoes to be infected with several pathogens.

Keywords: Midgut, autogeny, *Toxorhynchites theobaldi*

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 GERAL .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 ESPECÍFICOS .....</b>	<b>19</b>
<b>EXPRESSÃO GÊNICA NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS ADULTAS DO MOSQUITO AUTÓGENO <i>TOXORHYNCHITES THEOBALDI</i> (DIPTERA, CULICIDAE) .....</b>	<b>20</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>20</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 Mosquitos.....	23
2.2 Extração do RNA, preparação da biblioteca e sequenciamento .....	23
2.3 Análises de bioinformáticas das sequências .....	24
2.4 Clusterização das proteínas ortólogas e hipóteses filogenética .....	25
2.5 Extração de RNA e análise de qRT-PCR.....	27
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
3.1 Descrição geral dos transcritos expressos no intestino médio posterior de <i>T. theobaldi</i> .....	27
3.2 Identificação de ortólogos e clusterização .....	28
<b>4. PRINCIPAIS CLASSES FUNCIONAIS ENVOLVIDAS NA DIGESTÃO .....</b>	<b>36</b>
4.1 Matriz peritrófica.....	36
4.2 Metabolismo de carboidratos.....	39
4.3 Imunidade e a contribuição à nutrição .....	41
4.4 Proteções contra o estresse oxidativo .....	43
4.5 Metabolismo de aminoácidos .....	45
4.6 Metabolismo de proteínas.....	47
4.7 Inibidores de proteases .....	49
4.8 Metabolismo das proteínas de reserva .....	51
4.9 Hormônios .....	52
4.10 Metabolismo de lipídeos .....	53
4.11 Transportadores e canais .....	55
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>

**6. REFERÊNCIAS ..... 58**

**ANEXO..... 75**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os mosquitos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Culicidae Meigen, sendo popularmente conhecidos como pernalongos. A família Culicidae inclui 3.567 espécies catalogadas e classificadas em duas subfamílias: Anophelinae, subdivida em três gêneros e Culicinae, subdivida em 113 gêneros, segregados em 11 tribos (HARBACH, R.E., 2013). Os culicídeos são encontrados nas regiões temperadas e tropicais do planeta, mas não existem em áreas que permanecem constantemente congeladas.

A subfamília Culicinae possui apenas três gêneros (*Malaya*, *Topomya* e *Toxorhynchites*) cujas fêmeas não se alimentam de sangue e, portanto, não são vetores de doenças (ZHOU, XIAOFAN *et al.*, 2014). No gênero *Toxorhynchites*, as larvas alimentam-se de invertebrados, incluindo larvas de outros mosquitos contidos em recipientes naturais e artificiais de água (HARBACH, RALPH E, 2007; ZEQUI; LOPES; MEDRI, 2006). Vários estudos têm mostrado o potencial de *Toxorhynchites* para o controle biológico de mosquitos vetores (COLLINS; BLACKWELL, 2000).

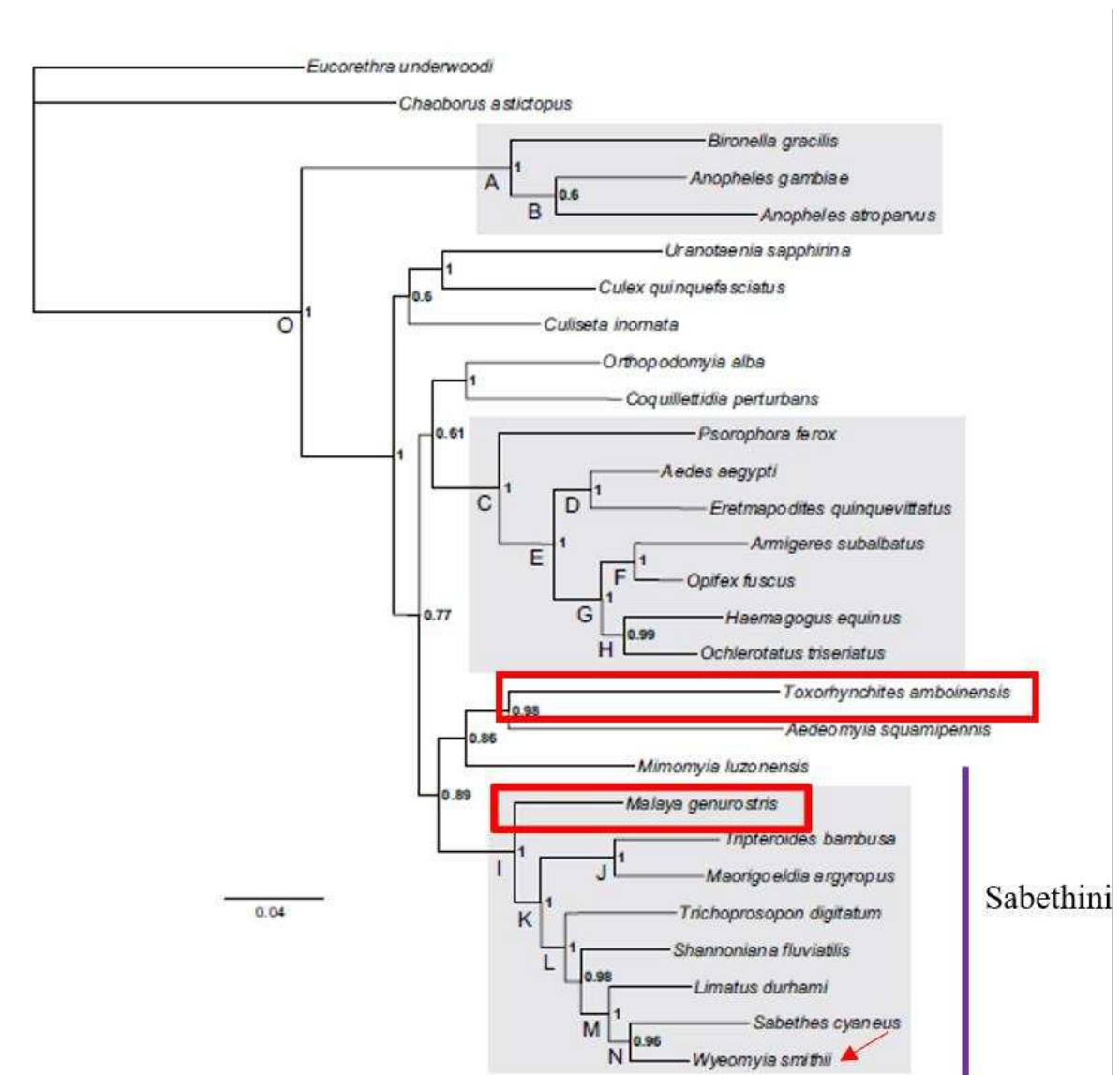
O gênero *Toxorhynchites* tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrado principalmente na região tropical, e algumas poucas espécies distribuem-se através das regiões temperadas da Ásia oriental e América do Norte (HARBACH, R.E, 2013). Os adultos são grandes, possuindo cerdas coloridas (principalmente esverdeadas ou azuladas) espalhadas pelo corpo e uma probóscide longa e curvada para baixo, especializada na alimentação de fluidos ricos em açúcares (HARBACH, R.E., 2013).

Provavelmente o período de maior divergência nas linhagens dos culicídeos foi no final do Jurássico e início do Cretáceo, entre 65-145 milhões de anos (REIDENBACH *et al.*, 2009), devido à diversificação e expansão dos vertebrados terrestres (AZAR; NEL, 2012; REIDENBACH *et al.*, 2009). Dentro de Diptera, a hematofagia teria surgido em vários momentos de forma independente (MING-SHAN *et al. et al.*, 2015; WIEGMANN *et al.*, 2011). A dependência do hábito hematófago varia entre os mosquitos, e os mesmos podem ser agrupados em autógenos, anautógenos facultativos e anautógenos. Os autógenos são aqueles que não necessitam de sangue para o primeiro ciclo gonadotrófico. Os outros mosquitos, que conseguem colocar a primeira postura de ovos sem alimentação sanguínea, mas necessitam do sangue para as posturas seguintes são referidos como anautógenos facultativos. E aqueles mosquitos que desde a primeira postura necessitam do sangue

são considerados anautógenos, como por exemplo, *Culex quinquefasciatus* e as espécies do gênero *Anopheles*. Vários fatores tais como, tamanho do adulto, fotoperíodo e nutrição da larva (ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005; SOLIMAN; TEWFICK; WASSIM, 2014) interferem na expressão da autogenia, apesar dos seus mecanismos fisiológicos e moleculares não terem sido ainda totalmente esclarecidos. Existem variações quanto ao hábito alimentar dentro de uma mesma espécie ocorrendo uma tendência autógena ou anautógena, como é caso do mosquito *Wyeomyia smithii* (Sabethini), que apresenta hematofagia ou não de acordo com a localidade geográfica dos Estados Unidos da América (BRADSHAW *et al.*, 2018).

A família Culicidae é monofilética, porém algumas relações entre as tribos não são suportadas (HARBACH, RALPH E, 2007; REIDENBACH *et al.*, 2009). Um dessas incongruências ocorreu nas primeiras propostas de hipóteses filogenéticas para Culicidae que colocou o gênero *Toxorhynchites* na família Toxorhynchitinae (HARBACH, RALPH E, 2007). Posteriormente, outras classificações, utilizando caracteres morfológicos e moleculares, passaram a considerar *Toxorhynchites* um grupo monofilético para a subfamília Culicinae, agrupando as espécies do gênero na tribo Toxorhynchitini (HARBACH, RALPH E.; KITCHING, 1998; REIDENBACH *et al.*, 2009). As árvores filogenéticas recentes (NARAYANAN KUTTY *et al.*, 2018), permitem inferir que os gêneros não hematófagos pertencem às tribos Toxorhynchitini (*Toxorhynchites*) e Sabethini (*Malaya* e *Topomya*) (Fig. 1) e segundo Harbach & Kitching (1998), *Toxorhynchites* possui um ancestral comum com Sabethini. Essa hipótese é suportada pelo compartilhamento de muitas características morfológicas no adulto herdadas de um ancestral provavelmente não-hematófago (HARBACH, RALPH E.; KITCHING, 1998) .

A hematofagia é possível devido às características morfológicas e fisiológicas que permitiram o comportamento de busca do hospedeiro, aquisição e digestão do sangue. A presença de receptores de odores em grande número nas antenas dos mosquitos hematófagos (RAJI; DEGENNARO, 2017) é um exemplo, sendo encontrados em menor quantidade no mosquito não-hematófago *Toxorhynchites amboinensis* (ZHOU, XIAOFAN *et al.*, 2014) (Tab. 1). Esses receptores em *Toxorhynchites*, supostamente os auxiliam a selecionar os sítios de oviposição para a postura dos ovos (DAY, 2016; DEKEL *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Filogenia das relações entre as espécies, inferidas pelas análises combinadas dos aminoácidos Bayseana/Verossimilhança. Os números associados com os nós são probabilidades acima de 0.5. As letras associadas com os nós referem aos valores de suporte de *bootstrap* e probabilidades posterior estimada por análises alternativas. As caixas cinzas sombreadas indicam do topo até a base: Anophelinae, Aedini e Sabethini. As caixas em vermelho mostram o compartilhamento do ancestral de *Toxorhynchites* e o gênero não hematófago da tribo Sabethini, *Malaya*. A seta vermelha mostra *Wyeomyia smithii*, uma espécie que pode ser hematófaga ou não, dependendo da região geográfica dos Estados Unidos da América. Adaptado de (REIDENBACH *et al.*, 2009).

Os mosquitos apresentam autogenia facultativa quando não conseguem acumular nutrientes suficientes na fase de larva, como é caso de *Culex pipiens* (HANSEN *et al.*, 2014; SOLIMAN;

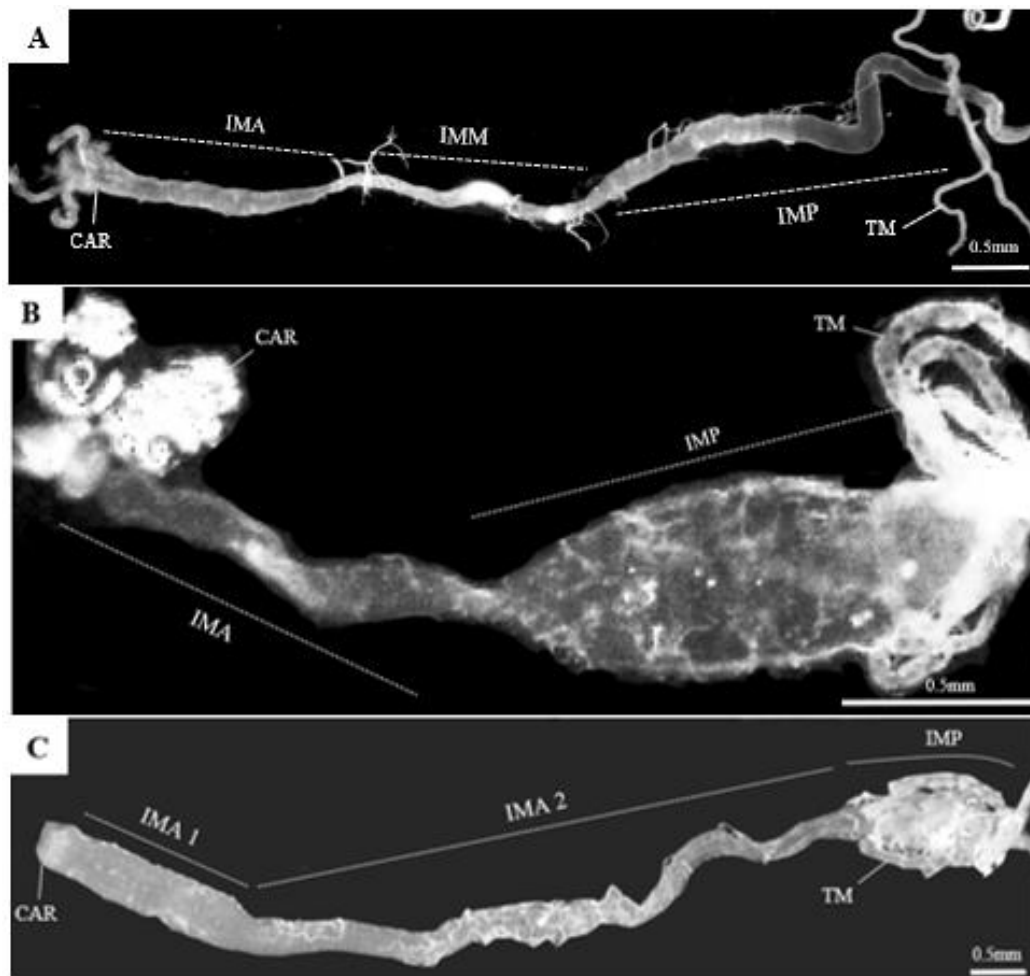
TEWFICK; WASSIM, 2014). O sangue é rico em nutrientes, principalmente aminoácidos, sendo praticamente todo convertido em substâncias que compõem o vitelo. Nos mosquitos autógenos, as reservas energéticas da larva são usadas para o desenvolvimento do ovo no adulto. Por exemplo, *Toxorhynchites* possui larvas predatórias e longevidade bem superior aos mosquitos anautógenos (STEFFAN; EVENHUIS, 2003) (Tab. 1) nessa fase ocorre acúmulo de grande quantidade de lipídeos, principalmente no último estágio larval (PASCINI *et al.*, 2011). Existe uma correlação entre o tamanho corporal do adulto e a capacidade de armazenamento de reservas no período larval (TAKKEN; KLOWDEN; CHAMBERS, 1998), por isso as fêmeas de *Toxorhynchites* que possuem o maior tamanho corporal entre os mosquitos (GOETTLE; ADLER, 1999; GONSALVES *et al.*, 2013) (Tab. 1) conseguem acumular reservas metabólicas no corpo gorduroso durante a fase de larva suficientes para o desenvolvimento dos ovócitos (SCHILLER *et al.*, 2019) (Tab. 1).

A necessidade da ingestão de sangue para o início da ovogênese não é a única diferença na reprodução entre os mosquitos hematófagos e não-hematófagos. A corte e o acasalamento nos mosquitos autógenos requer espaço suficiente para machos e fêmeas copularem (CHOOCHOTE *et al.*, 2002). Já nos mosquitos anautógenos, pelo menos os já colonizados em laboratório, como *Ae. aegypti*, são classificados como espécies estenógamas ou estenogâmicas sendo capazes de copular em ambientes confinados durante o voo ou em repouso sobre uma superfície, em geral pouco espaço já é suficiente para o acasalamento que dura às vezes poucos segundos (CARVALHO *et al.*, 2018). Após a fertilização, se inicia o desenvolvimento do ovário que ocorre de forma assíncrona em *Toxorhynchites*, permitindo que a fêmea faça posturas pontuais ao longo da vida, evitando assim o canibalismo entre as larvas e garantindo que não falte alimento no local onde crescem (WATTS; SMITH, 1978). As fêmeas de *Toxorhynchitini* lançam um ovo durante o voo, com o movimento do abdômen semelhante aos mosquitos da tribo Sabethini, em recipientes artificiais e naturais que incluem buracos de árvores, axilas de folhas, hastes de bambu e brácteas de flores (DAY, 2016) Essa estratégia é oposta à da maioria dos mosquitos anautógenos, onde os ovos amadurecem de forma sincrônica e após o amadurecimento são depositados próximos à superfície da água ou em locais facilmente inundáveis. Dependendo da espécie a oviposição ocorre de forma ininterrupta e em grande quantidade, podendo chegar a dezenas e centenas de ovos (DAY, 2016)

A hematofagia induz ou reprime a expressão de determinados genes. A indução de genes específicos é necessária para digestão e manutenção da homeostase, devido a alterações extremas

que ocorrem após a ingestão do sangue (SANDERS *et al.*, 2003; STERKEL *et al.*, 2017). Essas alterações incluem a formação da matriz peritrófica pelo intestino médio posterior para auxiliar na digestão e proteger o epitélio dos micro-organismos ingeridos com o sangue (WHITEN *et al.*, 2018a). Em adultos de *T. theobaldi*, a matriz peritrófica é delgada, produzida de forma constitutiva (GODOY *et al.*, 2015). Já em mosquitos hematófagos a matriz peritrófica é bem mais espessa e produzida apenas no momento da digestão do sangue, em seguida ela é degradada e expulsa por defecação (WHITEN *et al.*, 2018a).

A digestão no intestino médio dos Diptera, como por exemplo *Drosophila melanogaster*, é compartimentalizada (MARIANES; SPRADLING, 2013). A digestão dos carboidratos em *D. melanogaster* ocorre sobretudo na região anterior (isto é, intestino médio anterior - IMA e intestino médio médio - IMM) e a digestão das proteínas, é realizada principalmente na região posterior (intestino médio posterior -IMP) (Fig. 2A) (ERKOSAR *et al.*, 2014). Semelhante compartimentalização é observada nos mosquitos hematófagos, onde a digestão dos carboidratos ocorre principalmente no IMA e a digestão de proteínas no IMP (Fig. 2C). Diferente do que é observado nos mosquitos hematófagos, em *T. theobaldi* o intestino médio é subdividido em três compartimentos, IMA (torácico), IMM e IMP (abdominais) (Fig. 2B). Apesar de várias diferenças terem sido mostradas quanto à biologia de mosquitos anautógenos e autógenos, pouco se sabe sobre aspectos envolvendo o sistema digestivo, principalmente no que diz respeito à expressão gênica.



**Figura 2.** Intestinos médios de *Drosophila melanogaster*, (A), *Aedes aegypti* (B) e *Toxorhynchites theobaldi* (C) com suas diferentes regiões. IMA: intestino médio anterior. IMM; intestino médio médio; IMP; intestino médio posterior; CAR: cárdia e TM: túbulo de Malpighi. Em *A. aegypti*, o IMP é relativamente hipertrofiado em relação a *T. theobaldi*. O IMA de *T. theobaldi* é muito desenvolvido em relação ao IMP e é subdividido em IMA 1 torácico e IMA 2 abdominal.

A: adaptado de [https://nsf.gov/news/mmg/mmg\\_disp.jsp?med\\_id=73148&from=](https://nsf.gov/news/mmg/mmg_disp.jsp?med_id=73148&from=) acessado em 12/08/2019. (Crédito: Angela Douglas). B: adaptado de Paquette *et al.*, 2015. C: autoria própria.

**Tabela 1.** Diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais observadas entre *Toxorhynchites* e mosquitos hematófagos.

	<i>Toxorhynchites</i>	Hematófagos
<b>Caracteres morfológicos</b>		
Probóscide curvada ventralmente para baixo	x	
Probóscide alongada formada por pequenos feixes de estiletos		x
Antenas com menor número de classes de receptores (ex. ionotrópicos)	x	
Antenas contendo diversas classes de receptores (ex. ionotrópicos)		x
Intestino médio do adulto subdividido em três regiões	x	
Intestino médio do adulto subdividido em duas regiões		x
Grande tamanho corporal, cerca de 7 mm chegando a 12mm, considerando a envergadura	x	
Pequeno tamanho corporal, cerca de 5mm		x
Glândula salivar trilobada		x
Glândula salivar bilobada	x	
<b>Reprodução</b>		
Oviposição de um único ovo por local durante o voo	x	
Oviposição em lotes de forma massiva		x
Ovário com folículos em diferentes estágios de desenvolvimento	x	
Ovários com folículos ovarianos com desenvolvimento mais ou menos sincrônico		x
A maioria das espécies precisa de muito espaço para a cópula	x	
A maioria das espécies necessita de pouco espaço para a cópula		x
<b>Ciclo de vida</b>		
Cerca de 100 dias	x	
Cerca de 50 dias		x
<b>Alimentação</b>		
Larva predadora	x	
Maioria das larvas são detritívoras		x
Adulto alimenta-se somente de néctar	x	
Adulto alimenta-se de néctar e sangue		x

## 2. REFERÊNCIAS

- ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. Insect Biochemistry and Molecular Biology Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 661–675, 2005.
- AZAR, D.; NEL, A. Evolution of hematophagy in non-biting midges (Diptera: Chironomidae). **Terrestrial Arthropod Reviews**, v. 5, n. 1, p. 15–34, 2012.
- BRADSHAW, W. E. et al. Evolutionary transition from blood feeding to obligate nonbiting in a mosquito. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 5, p. 1009–1014, 2018.
- CARVALHO, D. O. et al. Mosquito pornoscopy: Observation and interruption of aedes Aegypti copulation to determine female polyandric event and mixed progeny. **Plos One**, v. 13, n. 3, p. e0193164, 2018.2018.
- CHOOCHOTE, W. et al. A Note on Laboratory Colonization of Toxorhynchites splendens by Using an Aedes togoi Larva as Prey. **J Trop Med Parasitol**, v. 25, n. 1, p. 47–50, 2002.
- COLLINS, L. E.; BLACKWELL, A. The biology of Toxorhynchites mosquitoes and their potential as biocontrol agents. **Biocontrol News and Informatio**, v. 7, n. 4, p. 65, 2000.
- DAY, J. F. Mosquito oviposition behavior and vector control. **Insects**, v. 7, n. 4, p. 65, 2016.
- DEKEL, A. et al. Evolutionarily conserved odorant receptor function questions ecological context of octenol role in mosquitoes. **Scientific reports**, v. 6, p. 37330, 2016.
- ERKOSAR, B. et al. Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: Novel insights from the Drosophila model. **FEBS Letters**, v. 588, p. 4250–4257, 2014.
- GODOY, R. S. M.; FERNANDES, K. M.; MARTINS, G. F. Midgut of the non-hematophagous mosquito Toxorhynchites theobaldi (Diptera, Culicidae). **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–16, 2015.
- GOETTLE, B. J.; ADLER, P. H. Elephant (or Treehole) Predatory mosquito Toxorhynchites rutilus rutilus Toxorhynchites rutilus septentrionalis. **Supplemental Volume: Species of Conservation Concern**. p. 1-5, 2005.
- GONSALVES, L et al. Mosquito Consumption by Insectivorous Bats: Does Size Matter? **PloS One**. v. 8, n. 10, p. e77183, 2013.
- GULIA-NUSS, M. et al. Multiple factors contribute to anautogenous reproduction by the mosquito Aedes aegypti. **Journal of insect physiology**, v. 82, p. 8–16, nov. 2015.
- HANSEN, I. A. et al. Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 103, 20 mar. 2014.

- HANSEN, I. A et al. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 29, p. 10626–31, 2004.
- HARBACH, R. E. *Mosquito Taxonomic Inventory*. Disponível em: <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>>. Acesso em: 20 jun. 2019.
- HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic Entomology**, v. 23, n. 4, p. 327-370, 1998.
- HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591–638, 2007.
- MARIANES, A.; SPRADLING, A. C. Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. **elifelife.org Marianes and Spradling. eLife**, v. 2, p. 886, 2013.
- MING-SHAN, W. A. N. G. et al. Accelerated evolution of constraint elements for hematophagic adaptation in mosquitoes. **Zoological Research**, v. 36, n. 6, p. 320, 2015.
- NARAYANAN KUTTY, S. et al. A phylogenomic analysis of Culicomorpha (Diptera) resolves the relationships among the eight constituent families. **Systematic Entomology**, v. 43, n. 3, p. 434–446, jul. 2018.
- PAQUETTE, C. C. H. et al. Biodistribution and Trafficking of Hydrogel Nanoparticles in Adult Mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 9, n. 5, p. e0003745, 2015.
- PASCINI, T.V. et al. Changes in the fat body during the post-embryonic development of the predator *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 4, p. 456–461, 2011.
- RAJI, J. I.; DEGENNARO, M. Genetic analysis of mosquito detection of humans. **Current Opinion in Insect Science**, v. 20, p. 34–38, 2017.
- REIDENBACH, K. R. et al. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. **BMC evolutionary biology**, v. 9, n. 1, p. 298, 2009.
- SANDERS, H. R. et al. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 11, p. 1105–1122, 2003.
- SCHILLER, A. et al. Updated Methods for the Production of *Toxorhynchites rutilus septentrionalis* (Diptera, Culicidae) for Use as Biocontrol Agent Against Container Breeding Pest Mosquitoes in Harris County, Texas. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 2, 2019.
- SOLIMAN, B. A.; TEWFICK, M. K.; WASSIM, N. M. Comparative fine structure of eggs of autogenous and anautogenous *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 44, n. 3, p. 761–769, 2014.

- STEFFAN, W. A.; EVENHUIS, N. L. Biology of Toxorhynchites. Annual Review of Entomology. **Annu Rev Entomol**, v.26, 159-181, 1981.
- STERKEL, M. et al. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. Trends in Parasitology, v. 33, n. 8, p. 633–644, 1 ago. 2017.
- TAKKEN, W.; KLOWDEN, M J.; CHAMBERS, G. M. Effect of body size on host seeking and blood meal utilization in Anopheles gambiae sensu stricto (Diptera: Culicidae): the disadvantage of being small. **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 5, p. 639–45, set. 1998.
- SOLIMAN, B. A.; TEWFICK, M. K.; WASSIM, N. M. Comparative Fine Structure of Eggs of Autogenous and Anautogenous Culex Pipiens Diptera: Culicidae. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 240, n. 1546, p. 1-9, 2014.
- WAHID, I.; SUNAHARA, T.; MOGI, M. The Hypopharynx of Male and Female Mosquitoes. **The Open Entomology Journal**. v. 1, p. 1-6, 2007.
- WARR, E. et al. Spatial and sex-specific dissection of the Anopheles gambiae midgut transcriptome. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 37, 29 jan. 2007.
- WATTS, R. B.; SMITH, S. M. Oogenesis in Toxorhynchites rutilus (Diptera: Culicidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 56, n. 1, p. 136–139, jan. 1978.
- WHITEN, S. R. et al. Characterization of the adult Aedes aegypti early midgut peritrophic matrix proteome using LC-MS. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0194734, 2018.
- WIEGMANN, B. M et al. Episodic radiations in the fly tree of life. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 14, p. 5690-5695, 2011.
- ZEQUI, J. A. C.; LOPES, J.; MEDRI, Í. M. Imaturos de Culicidae (Diptera) encontrados em recipientes instalados em mata residual no município de Londrina, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 656-661, 2005.
- ZHOU, X. et al. Divergent and Conserved Elements Comprise the Chemoreceptive Repertoire of the Nonblood-Feeding Mosquito Toxorhynchites amboinensis. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 10, p. 2883–2896, 16 out. 2014.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Caracterizar os genes transcritos no intestino médio de *T. theobaldi* em classes funcionais e compará-los com os transcritos observados nos mosquitos hematófagos.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

1. Identificar os genes transcritos no intestino médio de *T. theobaldi* que são relacionados à hematofagia.
2. Entender a condição autógena observada em *T. theobaldi* analisando as famílias gênicas que participam da digestão do sangue nos mosquitos hematófagos.

## EXPRESSÃO GÊNICA NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS ADULTAS DO MOSQUITO AUTÓGENO *TOXORHYNCHITES THEOBALDI* (DIPTERA, CULICIDAE)

### RESUMO

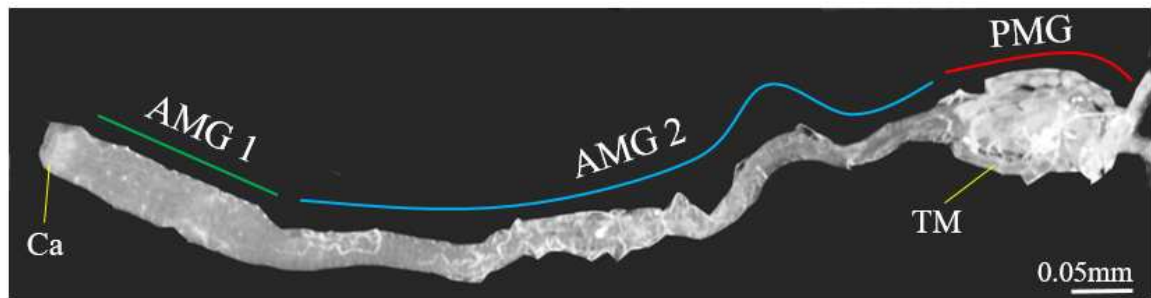
O mosquito não-hematófago *T. theobaldi* pertence a um dos três gêneros de culicídeos que não necessitam da ingestão de sangue para reproduzir. Alimenta-se basicamente de carboidratos através da ingestão de néctar, que provém a energia e os nutrientes necessários para suas funções primordiais. A digestão ocorre principalmente no intestino médio, que também é o local principal de interação com patógenos ingeridos juntamente com o alimento. O intestino médio de *T. theobaldi* difere dos culicídeos hematófagos por apresentar matriz peritrófica constitutiva, além de possuir a região anterior bastante desenvolvida em relação ao intestino médio posterior (PMG), que é atrofiado. A análise dos transcritos expressos no PMG, bem como a expressão diferencial entre as regiões, mostrou que elas são funcionalmente diferentes. Os processos de síntese, proteólise e transporte de proteínas representam a maioria dos transcritos identificados no PMG. O sistema imune inato envolve mecanismos regulatórios semelhantes aos demais mosquitos sendo mais proeminente na região posterior. A presença de diversas classes de peptídeos antimicrobianos detectadas no PMG nos permite especular que os micro-organismos podem ser uma fonte importante de nutrientes para esse mosquito. O metabolismo de proteção contra espécies reativas de oxigênio é elevado nas diferentes regiões do intestino médio devido à importância para manutenção da homeostase. *T. theobaldi* também difere do intestino dos mosquitos hematófagos em relação à menor diversidade e complexidade nos transcritos envolvidos nos mecanismos de combate ao estresse oxidativo provocado pela ingestão de sangue. Também foi observado que diferentes vias metabólicas provavelmente são utilizadas para produção de energia e síntese de metabólitos importantes, o que representa uma vantagem adaptativa quando o alimento estiver escasso. Os genes relacionados a hematofagia, principalmente pertencentes ao sistema imune e de desintoxicação expressos no intestino médio de *T. theobaldi* podem ser explorados para o desenvolvimento de estratégias para combater os mosquitos vetores.

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade da alimentação sanguínea para reprodução tornou os mosquitos importantes agentes de disseminação de patógenos entre vertebrados <sup>1</sup>. Porém, os três gêneros não-hematófagos *Malaya*, *Topomya* e *Toxorhynchites* não necessitam ingerir sangue para se reproduzir <sup>2,3</sup>. O gênero *Toxorhynchites* se destaca por ser o único da tribo Toxorhynchitini <sup>4</sup> que possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas áreas tropicais e nas áreas temperadas <sup>5</sup>. As larvas de *Toxorhynchites* são predadoras, alimentando-se principalmente de invertebrados aquáticos, incluindo larvas de mosquitos, enquanto os adultos ingerem apenas néctar e exudatos de plantas <sup>6</sup>.

A fase de larva é o período onde ocorre o acúmulo de reservas que são usadas na reprodução. O fato da larva de *Toxorhynchites* ser predadora permite a ingestão de grande quantidade de proteínas e lipídeos <sup>7</sup> que são armazenados no corpo gorduroso. Os ovos de *Toxorhynchites* amadurecem de forma assincrônica utilizando as reservas acumuladas na fase imatura durante toda a fase adulta <sup>6</sup>. Já os mosquitos anautógenos e autógenos, as reservas acumuladas na larva <sup>8,9</sup> vão diminuindo à medida que vão sendo utilizadas para o desenvolvimento dos folículos ovarianos, que ocorre de maneira geral de forma sincrônica <sup>10</sup> após a alimentação sanguínea.

O intestino médio das fêmeas do mosquito *T. theobaldi* é diferente das fêmeas dos culicídeos hematófagos. A primeira diferença é o tamanho do AMG que é mais desenvolvido do que a região PMG (Fig. 1). Além disso, o AMG pode ser subdividido em AMG1 e AMG2, sendo o AMG torácico mais próximo à cárdia. O AMG1 é mais grosso e com dobras na parede (Fig. 1). O PMG é atrofiado, sendo similar ao dos machos, não havendo dimorfismo sexual no órgão, diferente do que acontece em espécies hematófagas em que o PMG é muito desenvolvido em fêmeas e atrofiado nos machos. Além dessas diferenças, a matriz peritrófica é produzida constitutivamente no intestino médio de *T. theobaldi*, recobrimdo todo o lúmen desse órgão, ao contrário dos culicídeos hematófagos adultos, onde a síntese da matriz ocorre apenas no momento da digestão do sangue <sup>11,12</sup>.



**Figura 1.** Intestino médio de fêmea adulta de *T. theobaldi* fixado com glutaraldeído 2,5%. O intestino médio anterior é bastante desenvolvido e subdividido em intestino médio anterior 1 (AMG 1), localizado no tórax, e intestino médio anterior 2 (AMG 2), localizado no abdômen. O intestino médio posterior (PMG) é atrofiado. Ca: cárdia; TM: túbulo de Malpighi.

A digestão dos nutrientes varia dependendo da região do intestino médio dos mosquitos hematófagos. Por exemplo, a atividade das alfa-amilases, responsável pela digestão dos carboidratos, ocorre principalmente no AMG<sup>13,14</sup>. Enquanto a secreção de proteases e a degradação das proteínas é mais intensa no PMG, que é o local onde ocorre a digestão do sangue<sup>14,15</sup>.

No presente estudo, foram avaliados os transcritos expressos no PMG de *T. theobaldi* e comparados com vários bancos de sequências agrupando-os em função dos processos metabólicos em que estão envolvidos. Além disso, foi verificada a expressão das proteínas que atuam na digestão, resposta imune, transporte, formação da matriz peritrófica e armazenamento de energia nos três compartimentos do intestino médio. Também foram identificados os genes de *T. theobaldi* que são ortólogos com os culicídeos hematófagos, agrupando-os de acordo com as funções biológicas desempenhadas. As sequências dos genes ortólogos que são importantes na digestão basearam hipóteses filogenéticas buscando entender a história evolutiva desse mosquito. Esse estudo foi o primeiro a investigar a expressão gênica do intestino médio de um mosquito não-hematófago, o que será útil em futuros estudos sobre digestão, hematofagia e evolução nos culicídeos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Mosquitos

Larvas de diferentes de estágios e pupas de *T. theobaldi* foram coletadas sob a licença 56917-2 do ICMBio na Mata do Paraíso, pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil, situado entre as latitudes de 20°41'20''S a 20°49'35''S e, entre as longitudes de 42°49'36'' W a 42°54'27''W. As larvas e pupas foram coletadas em baldes de plástico (5L) contendo água fluvial ou pluvial, colocados no solo próximo a tronco de árvores. As amostras coletadas foram levadas para o insetário do Departamento de Biologia Geral/UFV e colocadas em frascos de plástico transparente (100ml) com água dechlorada onde foram alimentadas com larvas de diferentes estágios de *Aedes aegypti* (linhagem PPCampos, Campos dos Goytacazes). As pupas foram colocadas em gaiolas e após emergirem, adultos foram alimentados com solução de sacarose 10%. Os mosquitos foram mantidos à temperatura de  $26 \pm 3$  °C, umidade de 60-70% e ciclo de claro/escuro de 12:12.

### 2.2 Extração do RNA, preparação da biblioteca e sequenciamento

Os PMG (Fig. 1) de oito fêmeas adultas de *T. theobaldi*, com 7-14 dias de idade após a emergência foram dissecados e separados em dois microtubos (quatro intestinos em cada microtubo) com utensílios descontaminados com RNase AWAY® (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) em solução PBS 0,1M pH 7,2 (0.1 M NaCl, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e transferidos imediatamente para o TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), homogeneizados e armazenados a -80°C. A seguir foi feita a extração de RNA total conforme orientações do fabricante. As amostras de RNA foram verificadas em gel de agarose 1% desnaturante, contendo MOPS (Sigma M1254) 1X (MOPS 20Mm; acetato de sódio 5Mm; EDTA 1M pH 7.0 em água DEPC 0,1%) e formaldeído 5%.

A integridade do RNA foi avaliada no bioanalisador Agilent 2100 Bioanalyser® usando RNA 6000 Nano chip (Agilent Technologies) na Kansas State University, Kansas, Estados Unidos, no K-State Integrated Genomics Facility (IGF) Department of Plant Pathology (KSU, Manhattan, Kansas, USA). A quantificação das amostras foi feita com o aparelho Qubit 2.0 Fluorometer®

(Thermo Fisher Scientific) e a sua pureza foi medida no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Para a preparação das bibliotecas de RNA-seq, foram usados 400ng de RNA total de alta qualidade usando o kit TruSeq RNA Sample Preparation v.2 (Illumina®) seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas foram avaliadas com Agilent 2100 Bioanalyser utilizando o kit Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific) para averiguar possível contaminação com DNA. A seguir as bibliotecas foram normalizadas para 10nM em volumes iguais, 2 bibliotecas por pool. Cada pool foi sequenciado na plataforma Illumina MiSeq utilizando um kit *MiSeq reagent v3* (Illumina®), 600 ciclos, em uma execução do tipo *paired end* no IGF-KSU.

### **2.3 Análises de bioinformáticas das sequências**

Os dados brutos gerados pela plataforma Illumina MySeq foram processados usando o RTA 1.12.4.2 e CASAVA 1.8.2. As reads foram submetidas a um filtro de qualidade e somente aquelas que contabilizaram um phred score de 20 ou mais (que determinam as sequências utilizadas são de boa qualidade) foram usadas. Um total de 25.514.372 reads foram montadas em uma única direção usando o software ABySS (Genome Sciences Centre, Vancouver, BC, Canada) <sup>16,17</sup> utilizando vários valores de kmer (k) (a cada cinco de 21-91). Como o montador ABySS pode falhar para transcritos altamente expressos <sup>18</sup> o montador SOAPdenovo <sup>19</sup> foi usado, utilizando os mesmos valores de kmer (k) usados para o montador ABySS. As montagens resultantes foram unidas pelo BLAST iterativo e o montador cap3 <sup>20</sup> em único arquivo.

As sequências codificantes (CDS) foram extraídas usando um pipeline automático baseado nas similaridades com as proteínas conhecidas ou através da obtenção de CDS contendo um peptídeo sinal <sup>21</sup>. Os resultados foram organizados e mapeados em uma planilha Excel com hyperlinks. Peptídeo sinal, domínios transmembrana, sítios de clivagem para furinas e O-glicosilações do tipo mucina foram determinadas com os softwares do Center for Biological Sequence Analysis (Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark) <sup>21-24</sup>. As *reads* foram mapeados usando os *contigs* através do BLASTn <sup>25</sup> com tamanho de palavra de 25, ocultando decâmeros de homonucleotídeos e possibilitando o mapeamento para até três diferentes extensões de CDS (.pep, .cds e .gff3) se os valores de BLAST tiverem o mesmo valor de score. O mapeamento das reads foi incluído nas planilhas do excel. Também foi feita a análise dos

transcritos anotados através do método de normalização RPKM (reads por quilobase por milhão de reads mapeadas)<sup>26</sup> para cada sequência codificante que foram mapeados para compor a planilha. Além do valor do RPKM foi feita a comparação através da expressão relativa dos transcritos, o “índice de expressão” foi usado e definido como o número reads mapeada para um determinado CDS multiplicado por 100 e dividido pelo maior número reads mapeadas para um único CDS, que no caso desse transcriptoma foi um valor de 676.641 mapeada para uma única sequência codificante precursora de proteína hipotética secretada. O “RPKM relativo máximo” também foi usado e definido como “índice de expressão”. O valor máximo (100) foi encontrado para o mesmo CDS precursor de proteína secretada hipotética, que teve um RPKM=52.111.

As proteínas foram anotadas em classes funcionais de forma automatizada baseado em um vocabulário de aproximadamente 290 palavras encontradas associadas a vários bancos de dados, incluindo NCBI NR light, Swissprot, Gene Ontology, CDD, KEGG, KOG, Pfam, SMART, Refseq-invertebrates, REPBASE-RPS, RRNA e um subconjunto de sequências do GenBank contendo díptera, bem como a presença ou ausência do peptídeo sinal e domínios transmembrana. Anotações manuais adicionais foram feitas conforme necessário e de acordo com dados da literatura. Análises de bioinformática detalhadas da nossa pipeline podem ser encontradas em publicações anteriores<sup>20</sup>.

## 2.4 Clusterização das proteínas ortólogas e hipóteses filogenética

O alinhamento múltiplo das sequências utilizadas foi conduzido por meio do algoritmo MAFFT versão 7<sup>27</sup> com parâmetro método de refinamento iterativo E-INS-i e em seguida os gaps foram retirados utilizando o programa GBLOCKS Version 0.91b, 2002<sup>28</sup>. Após o tratamento das sequências foi utilizado o programa MrBayes versão 3.2.2<sup>29</sup> para a inferência Bayesiana através da plataforma virtual CIPRES (CyberInfrastructure for Phylogenetic RESearch)<sup>30</sup>, com a opção de testar o melhor modelo de evolução de dados, posteriormente utilizado pelo programa para completar a inferência filogenética através da cadeia de Markov com um milhão de gerações.

As sequências de *T. theobaldi* homólogas as de outros culicídeos, *Ae. aegypti*, *An. darlingi*, *An. gambiae* e *C. quinquefasciatus* foram usadas para o alinhamento e inferência bayesiana após análise utilizando o site OrthoVenn<sup>31</sup> que clusterizou os transcritos em famílias homólogas. O orthoVenn tem como vantagens ser uma plataforma online utilizada para comparações do proteoma

predito de um genoma, além de suportar o upload de sequências de proteínas de espécies definidas pelo usuário. As análises utilizando o site OrthoVenn (e-value máximo de  $1E10^{-25}$ , valores de inflação de 2.0) permitiram a identificação de clusters ortólogos compartilhados entre os culicídeos *Ae. aegypti*, *An. gambiae*, *An. darlingi*, *C. quinquefasciatus* e *T. theobaldi* além de clusters de genes de cópia única (singletons). Os clusters ortólogos relacionados a alimentação e digestão foram explorados através das análises filogenéticas permitindo aumentar o conhecimento sobre a evolução da hematofagia nos mosquitos. As árvores foram visualizadas no FigTree versão 1.44 <sup>32</sup>.

As proteínas preditas homólogas dos clusters obtidos do OrthoVenn2 foram escolhidas devido à importância no processo digestivo desse mosquito (listadas a seguir), concatenadas em um único segmento. A hipótese filogenética foi inferida utilizando as sequências de todas as proteínas ortólogas para verificar se a mesma topologia observada para *Toxorhynchitesamboinenses* seria recuperada em *T. theobaldi*.

As proteínas preditas ortólogas com os culicídeos *Ae. aegypti*, *An. darlingi*, *An. gambiae* e *C. quinquefasciatus* que foram utilizadas são as seguintes: peritrofina-1, quitina sintetase 2, alfa-amilase, proteína de reconhecimento de peptoglicano (AMP), proteína ligante de beta-1,3-glucana, aminoácido de cadeia ramificada, receptor de lipoproteína de baixa densidade, hexamerina 1.1, quimiotripsina 1, serino protease-semelhante à tripsina, transferrina, lipase pancreática, proteína quinase ativada por mitógeno 1 (MAPKK1) e cecropina N. Essas proteínas são importantes no metabolismo da digestão, por exemplo, a peritrofina-1 e quitina sintetase 2 participam da organização e da síntese da MP, respectivamente. Já as glucosidases alfa-amilases atuam no passo inicial da digestão de maltopolissacarídeos. As serino proteases quimiotripsina e as serino protease-semelhante à tripsina pertencem a principal família de peptidases envolvidas na digestão de sangue no intestino médio dos mosquitos <sup>1</sup>. O receptor de lipoproteína de baixa densidade e a lipase pancreática são importantes no metabolismo de lipídeos. A proteína de reconhecimento de peptoglicano, proteína ligante de beta-1,3-glucana e cecropina N atuam na resposta imune inata contra micro-organismos, como fungos e bactérias. A proteína MAPKK1 participa da via de sinalização alvo da rapamicina (TOR), uma das principais vias reguladoras da digestão. As proteínas hexamerina 1.1 e transferrina transportam e armazenam aminoácidos aromáticos e ferro, respectivamente. Além de ambas armazenarem resíduos que podem ser utilizados como fonte de energia.

## 2.5 Extração de RNA e análise de qRT-PCR

O RNA total foi extraído de pools de fêmeas adultas (N=3 pools de 5 indivíduos) das três regiões do intestino médio separadamente (AMG1, AMG2 e PMG) de *T. theobaldi*, com 7-14 dias de idade após a emergência usando TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme orientações do fabricante. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific) e 500ng de RNA foi utilizado para reação de transcrição reversa usando o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) após tratamento com DNase I Amplification Grade (Invitrogen). A amplificação foi realizada com o Eco Real Time PCR System (Illumina™) e o GoTaq qPCR® Master Mix (Promega). A reação de qRT-PCR consistiu na ativação da enzima a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 5s e anelamento e extensão a 60°C por 30s. A expressão relativa dos genes alvos (Anexo) foi calculada através do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  para cada região do intestino médio utilizando três amostras biológicas independentes. A subunidade 40S da proteína ribossomal S7 foi utilizada como gene de referência e o DNA genômico da região do PMG foi usado como calibrador interno para padronizar os resultados da expressão. A quantificação do produto amplificado de cada amostra, expresso como Ct (Cycle threshold) foi avaliada utilizando o teste ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey de múltiplas comparações de médias usando o software GraphPad Prism 7.00 para Windows (La Jolla, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Todos os testes foram considerados significativos para  $p \leq 0.05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Descrição geral dos transcritos expressos no intestino médio posterior de *T. theobaldi*

Após a montagem de 25.514.372 reads contendo 5.092.653.553 bases, um total de 17.359 sequências codificadoras (CDS) foram montadas sendo 14.060 (81%) dessas sequências completas (contendo a metionina como código iniciador e uma das três sequências que correspondem a um códon de parada). O tamanho médio delas foram de 722 nucleotídeos, com 4.380 CDS com mais de 1000 nucleotídeos e N50=480 nucleotídeos. Esses resultados foram semelhantes ao transcriptoma de outros culicídeos<sup>33-35</sup>, por exemplo o transcriptoma do intestino médio de

*Anopheles albimanus*, o número de transcritos obtidos foi de 17.764 contigs e tamanho médio dos contigs de 970pb<sup>34</sup>. As sequências codificadoras (CDS) foram inseridas em cinco classes, “secretadas”, “desconhecidas”, “elementos transponíveis”, “vírus” e “housekeeping” conforme podemos observar na tabela 2. As três classes que contêm a maioria dos transcritos foram as secretadas, desconhecidas e maquinaria de síntese de proteínas que acumularam 27%, 22% e 22% das reads, respectivamente, similar ao transcriptoma de outros culicídeos<sup>14,35-37</sup>. Entre as proteases secretadas as mais abundantes são as tripsinas e as quimiotripsinas que acumularam 65% e 25% das reads, respectivamente.

Entre os transcritos que compõe a classe “secretadas”, as mucinas respondem por 12% das reads do intestino médio posterior de *T. theobaldi*. Essas glicoproteínas evitam o contato dos microorganismos presentes no néctar e à ação de enzimas digestiva sob o epitélio além de lubrificar a passagem do alimento ingerido<sup>38</sup>. Vários transcritos que atuam na resposta imune tais como a família de inibidores de proteases, família de antígeno 5, lectinas, domínios repetidos ricos em leucina e serino proteases semelhantes à tripsina<sup>39,40</sup> respondem por 2,5% das reads da classe “secretadas”.

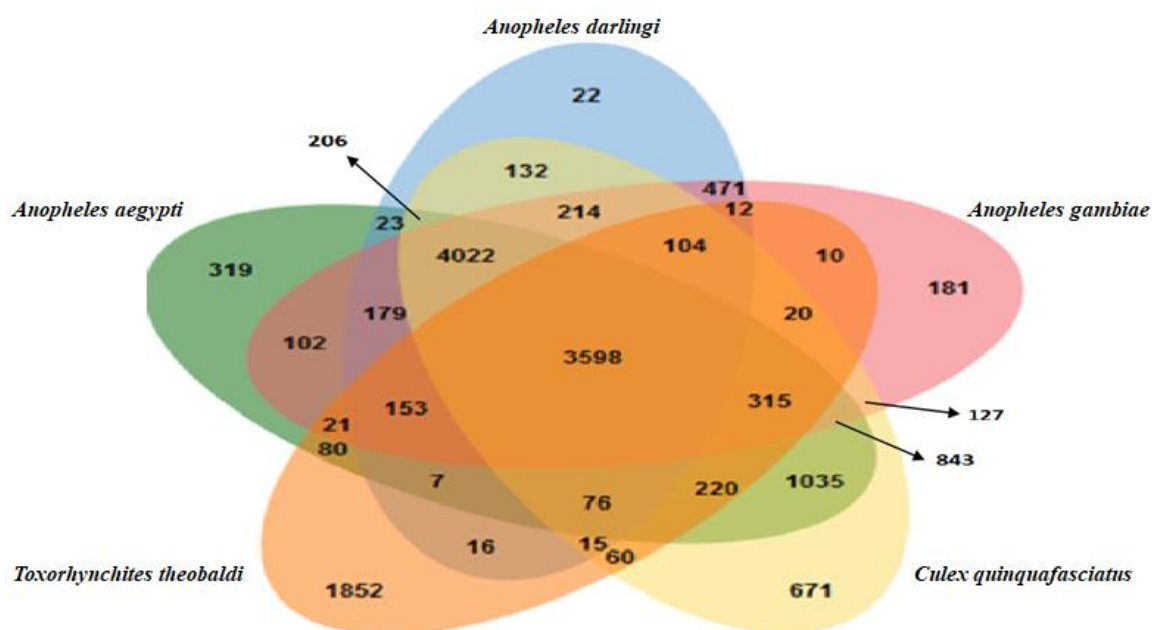
### 3.2 Identificação de ortólogos e clusterização

A identificação de sequências ortólogas é uma ferramenta útil nos estudos evolutivos. Isso porque ortólogos geralmente possuem similaridade com relação a função, estrutura, mecanismos de ação, resíduos conservados envolvidos na arquitetura do domínio entre espécies e linhagens<sup>41-43</sup>. As proteínas preditas de *T. theobaldi* foram submetidas a plataforma online OrthoVeen e confrontadas com as proteínas dos culicídeos *Ae. aegypti*, *An. darlingi*, *An. gambiae* e *C. quinquefasciatus*. Em seguida, as sequências foram agrupadas em *clusters* classificados de acordo com as categorias do banco de dados do GO (Gene Ontology) (Fig. 2; Tab. 1), além das proteínas que não formaram *clusters*, os *singletons*, que são as sequências exclusivas da espécie (Tab. 1).

As análises dos *clusters* das proteínas ortólogas enriquecidas de *T. theobaldi* compartilhadas com os culicídeos foram mais abundantes para os processos celulares conservados correspondente a classe tradução (GO:0006412), seguida das classes tradução de sinal (GO:0007165) e ciclo do ácido tricarbóxico (GO:0006099) e foram menos abundantes para as proteínas da digestão sendo observadas as endopeptidases quimiotripsinas (GO:0007586) (Fig. 3).

Os culicíneos *Ae. aegypti*, *C. quinqua-fasciatus* e *T. theobaldi* são mais similares entre si do que os anofelinos (Fig. 2), que corresponde à topologia da árvore filogenética baseada nas sequências das proteínas ortólogas (Fig. 4). A filogenia proposta foi semelhante ao que Zhou et al. <sup>2</sup> obteve no estudo utilizando sequências relacionadas aos quimiorreceptores de *Toxorhynchites amboinensis*.

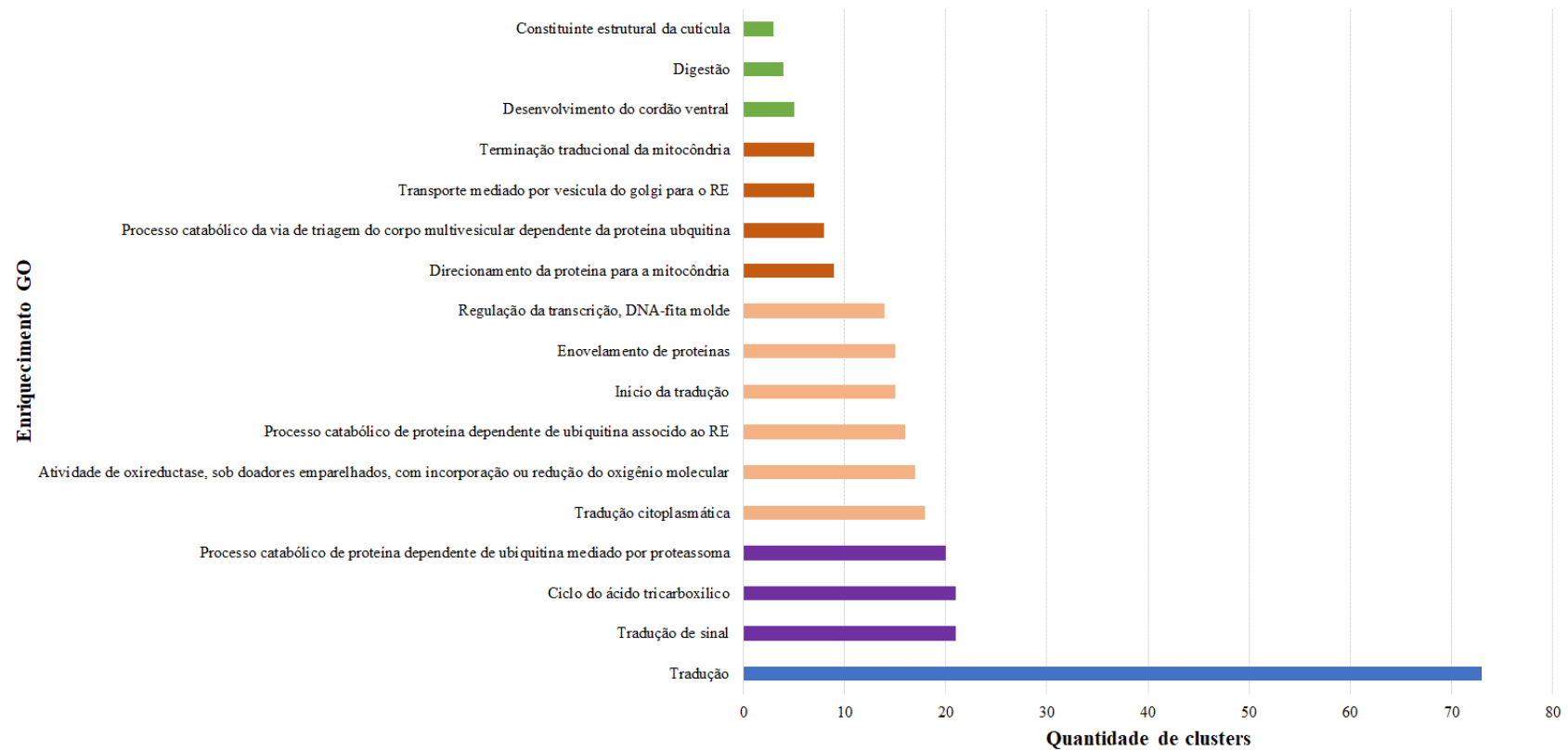
No geral, 1.852 proteínas foram únicas de *T. theobaldi* e incluem proteínas envolvidas na transposição mediada por DNA (GO:0006313: elementos transponíveis) (Fig. 2) que tem sido associadas ao aumento da diversidade por permitir a produção de várias isoformas de proteínas <sup>181</sup>. Os elementos transponíveis podem ter favorecido o elevado número de singletons observados no intestino médio de *T. theobaldi* (Tab. 1). As proteínas associadas ao metabolismo dos açúcares tais como atividades de simporte (GO:0015293), processo metabólico da manose (GO:0006013) e transporte de trealose (GO:0015771) também foram enriquecidas para os clusters que foram únicos.



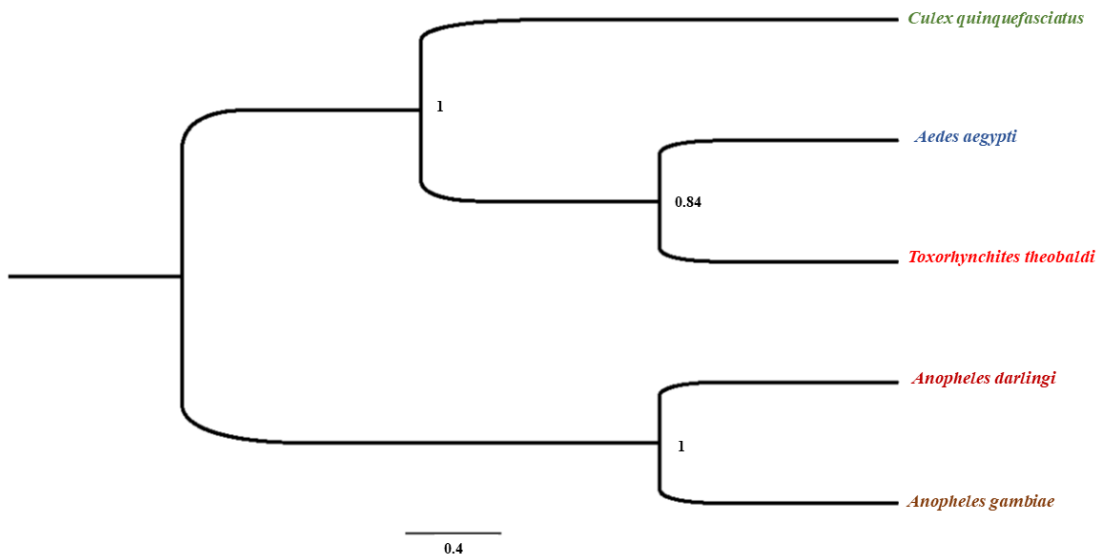
**Figura 2.** Distribuição dos *clusters* (grupos ortólogos) dos proteomas dos culicídeos *Ae. aegypti*, *An. darlingi*, *An. gambiae*, *C. quinquefasciatus* e *T. theobaldi* produzidos a partir do OrthoVenn

**Tabela 1.** Análise das proteínas deduzidas dos contigs de *T. theobaldi* comparadas com o proteoma de *Ae. aegypti*, *An. darlingi*, *An. gambiae* e *C. quinquefasciatus* utilizando o site OrthoVenn

ESPÉCIES	PROTEÍNAS	CLUSTERS	SINGLETONS
<i>Ae. Aegypti</i>	15.783	11.199	2.223
<i>An. darlingi</i>	10.509	9.25	981
<i>An. gambiae</i>	12.506	10.372	1.199
<i>C. quinquefasciatus</i>	18.955	11.658	3.988
<i>T. theobaldi</i>	17.359	6.559	5.164



**Figura 3.** Clusters ortólogos enriquecidos classificados de acordo com a nomenclatura do Gene Ontology (GO) para as espécies de culicídeos *Ae. aegypti*, *An. darlingi*, *An. gambiae*, *C. quinquefasciatus* e *T. theobaldi*



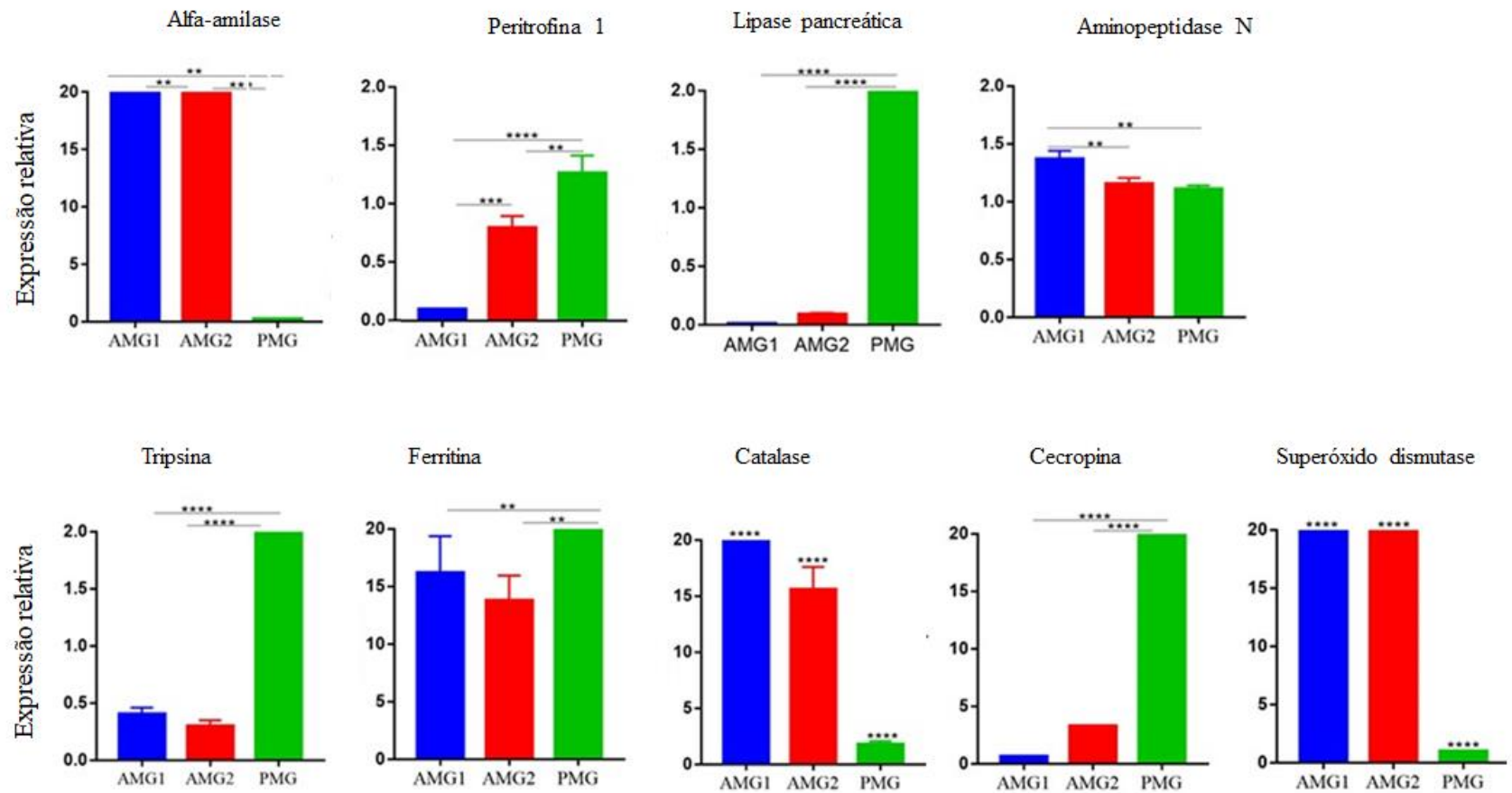
**Figura 4.** Hipótese filogenética obtida por inferência Bayesiana das sequências ortólogas dos culicídeos *Ae. aegypti*, *An. darlingi*, *An. gambiae*, *C. quinquefasciatus* e *T. theobaldi* alinhadas com MAFFT e concatenadas após clusterização pelo orthoVenn. Os valores ao lado de cada nó correspondem a probabilidade posterior de cada um utilizando o modelo de substituição de aminoácidos Rrev.

**Tabela 2.** Classificação funcional dos transcritos encontrados no transcriptoma do intestino médio posterior de fêmeas adultas de *Toxorhynchites theobaldi*.

Classes	Número de contigs	Número de RPKM	Média de RPKM/Contig	Distribuição de RPKM %
<b>Associada com a fisiologia digestiva</b>				
<b>Secretadas</b>	4643	402656	86.723	35.648
<b>Subclasses</b>				
<i>Família antígeno 5</i>	7	56	8.000	0.005
<i>Hormônios</i>	10	129	12.900	0.011
<i>Metaloproteases</i>	3	6	2.000	0.001
<i>Imunidade</i>	13	649	49.923	0.057
<i>Lipocalin</i>	4	16	4.000	0.001
<i>Metabolismo lipídeos</i>	27	242	8.963	0.021
<i>Metabolismo nuclear</i>	21	243	11.571	0.022
<i>Mucinas</i>	257	61688	240.031	5.461
<i>OBPs</i>	7	475	67.857	0.042
<i>Proteases</i>	124	19080	153.871	1.689
<b>INIBIDORES DE PROTEASES</b>				
<i>Tiropinas</i>	6	188	31.333	0.017
<i>Pacifastinas</i>	2	78	39.000	0.007
<i>Serpinas</i>	25	134	5.360	0.012
<i>DUF4803</i>	1	9	9.000	0.001
<i>TIMP</i>	1	8	8.000	0.001
<i>TIL</i>	4	19	4.750	0.002
<i>Cistatina</i>	1	16	16.000	0.001
<i>Kazal</i>	9	7212	801.333	0.638
<i>Reprosilina</i>	4	14	3.500	0.001
<i>Desconhecido</i>	4031	304299	75.490	26.940
<i>Outras</i>	86	8095	94.128	0.717
<b>Metabolismo oxidativo/detoxificação</b>	161	5787	35.944	0.512
<b>Transportadores e canais</b>	712	10341	14.524	0.916
<b>Imunidade</b>	258	14469	56.081	1.281
<b>Matrix extracelular</b>	217	13307	61.323	1.178
<b>Armazenamento</b>	29	2942	101.448	0.260

Continuação da página anterior

Classes	Número de contigs	Número de RPKM	Média de RPKM/Contig	Distribuição de RPKM %
<b>Associada com função celular</b>				
Maquinaria de síntese de proteína	380	295470	777.553	26.158
Produto desconhecido	4611	284091	61.612	25.151
Tradução de sinal	923	14595	15.813	1.292
Metabolismo de energia	572	13673	23.904	1.210
Proteínas modificadas	372	13156	35.366	1.165
Metabolismo de aminoácidos	234	8948	38.239	0.792
Metabolismo de carboidrato	345	7750	22.464	0.686
Conservado desconhecido	662	7243	10.941	0.641
Proteína de exportação	548	5691	10.385	0.504
Proteínas do citoesqueleto	267	5096	19.086	0.451
Metabolismo do lipídeo	431	5065	11.752	0.448
Detoxificação	157	3533	22.503	0.313
Maquinaria de proteossoma	271	3479	12.838	0.308
Maquinaria de transcrição	519	2580	4.971	0.228
Metabolismo de nucleotídeo	140	2451	17.507	0.217
Proteína de membrana conservada desconhecida	244	2158	8.844	0.191
Regulação nuclear	222	1832	8.252	0.162
Elementos transponíveis	195	1266	6.492	0.112
Metabolismo intermediário	89	847	9.517	0.075
Fator transcricional	98	694	7.082	0.061
Produto viral	33	347	10.515	0.031
Exportação nuclear	26	73	2.807692	0.006
<b>Total</b>	<b>17359</b>	<b>1129540</b>		<b>100</b>



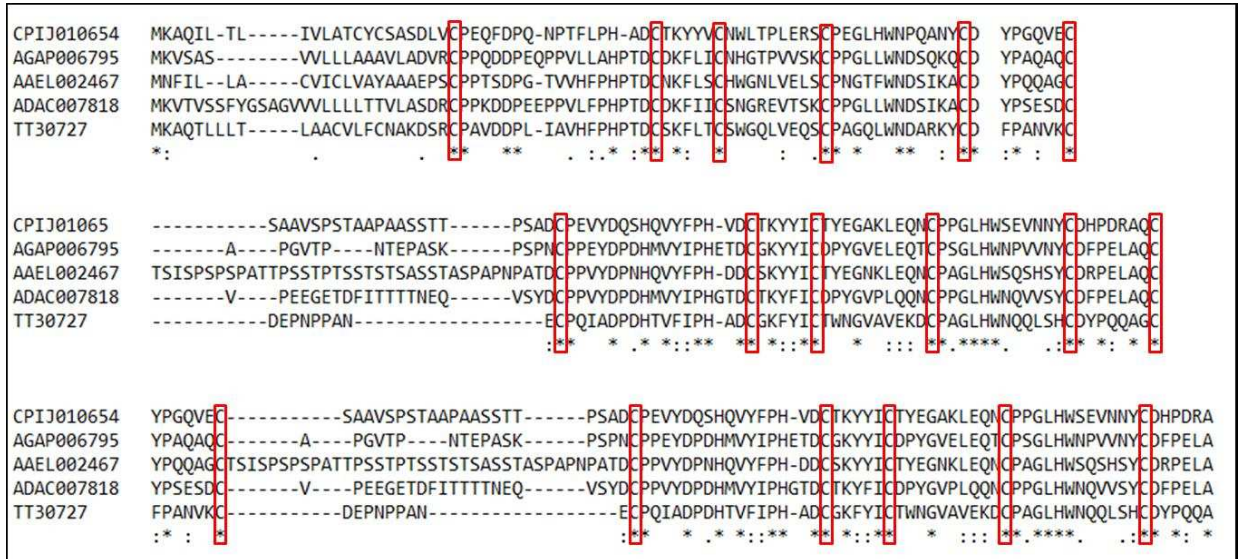
**Figura 5.** Análise da expressão diferencial das regiões do intestino médio (AMG1, AMG2 e PMG) de *Toxorhynchites theobaldi* foram calculados pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . A proteína ribossomal S7 40S constitutiva de *T. theobaldi* foi utilizado como gene de referência. Os experimentos foram realizados em triplicata, com três réplicas. Os níveis transcricionais foram obtidos pelo teste one-way ANOVA, seguido de testes de Tukey de múltiplas comparações, o nível de significância adotado foi de  $p < 0.05$ . Os asteriscos representam diferenças significativas \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  e as barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão. As análises foram feitas usando o software GraphPad Prism 7.00 para Windows (La Jolla, California, USA).

## 4. PRINCIPAIS CLASSES FUNCIONAIS ENVOLVIDAS NA DIGESTÃO

### 4.1 Matriz peritrófica

A MP de *T. theobaldi* é permanentemente produzida pelas células do intestino médio, formando um envoltório que reveste todo o intestino <sup>44</sup>. Nos mosquitos hematófagos, a síntese da MP ocorre quando o sangue é ingerido <sup>45</sup>. A quitina é um dos principais constituintes da MP sendo sintetizada pela quitina sintetase 2 <sup>46</sup>. Entre as CDS identificados no intestino médio de *T. theobaldi*, três correspondem à esta enzima. Essa proteína juntamente com a glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase (1 CDS) são consideradas as principais enzimas reguladoras da via de síntese de quitina <sup>45</sup>. As enzimas quitinases (10 CDS) que participam do processo de remodelamento da MP dos mosquitos hematófagos <sup>46</sup> também estão presente no intestino médio de *T. theobaldi*.

As proteínas da MP mais estudadas nos culicídeos são as peritrofinas <sup>47-49</sup>, sendo identificados 5 transcritos para peritrofina 1. Dentre esses transcritos, o contig TxSigP-30727\_FR4\_217-393 apresenta-se completo, sendo observado 57% de similaridade com a peritrofina 50 (AAEL002467) expressada no intestino médio de *Ae. aegypti* antes da alimentação sanguínea <sup>49</sup>. A expressão da peritrofina-1 ocorreu em todo intestino médio de *T. theobaldi* sendo mais elevada no PMG ( $p < 0.00001$ , Fig. 5). As peritrofinas são importantes na manutenção da estabilidade e da seletividade da MP <sup>50</sup>. Dos cinco transcritos encontrados em *T. theobaldi* para peritrofina 1, três são ortólogos com as peritrofinas dos demais mosquitos. As sequências identificadas como peritrofina 1 em *T. theobaldi* apresentam estruturas simples, com um ou dois domínios de ligação à quitina peritrofina-A que é o tipo de CBD (domínio de ligação à quitina) mais comum, com seis resíduos de cisteína interespaçados (Fig. 6).



**Figura 6.** Alinhamento da proteína putativa peritrofina 1 utilizando o programa ClustalW (versão 1.83) sendo identificados três domínios de ligação à quitina ricos em cisteína, domínios de peritrofina-A, contendo 6 cisteínas destacadas através do retângulo vermelho. As identificações das espécies referem-se a *C. quinquefasciatus*, *An. gambiae*, *Ae. aegypti*, *An. darlingi* e *T. theobaldi*, respectivamente. As indicações “\*”, “.” e “:” indicam máxima identidade entre todas as sequências, substituição conservada e substituição semi-conservada, respectivamente.

As mucinas, glicoproteínas ricas em resíduos de serina, prolina e treonina, são componentes da MP, e totalizam 12% dos transcritos para proteínas putativas secretadas em *T. theobaldi*. As mucinas evitam a penetração de micro-organismos, além de prevenirem danos físicos e químicos, sendo alvo de glicosidasas e peptidasas, tais como as metaloproteases microbianas que clivam as mucinas associadas à MP de *Ae. aegypti*<sup>51</sup> facilitando a infecção por vírus, como o vírus dengue. A metaloproteinase de matriz extracelular 1 (MMP-1, 629 reads) também foi detectada no intestino médio de *T. theobaldi*, apresentando 88% de identidade com o gene AeMMP1 (AAEL005666) de *Ae. aegypti* que facilita a penetração do vírus Chikungunya<sup>52</sup>. Essa metaloprotease é controlada entre outros fatores pela ligação à inibidores teciduais de metaloproteinases<sup>52</sup> conforme foi observado no intestino de *Aedes aegypti* ocorrendo também em *T. theobaldi* (2 CDS). Também foi observado no intestino médio de *T. theobaldi* 24 transcritos para domínio de ligação à quitina onde os contigs TxSigpSigP-27287\_FR5\_1-406 e TxSigpSigP-27286\_FR2\_1-405 também possuem domínios mucina. Esses contigs possuem 44% de identidade com o gene Aamucin-5

(AAEL006953), que é uma mucina transcrita no intestino médio de *Ae. aegypti* antes do repasto sanguíneo<sup>53</sup>.

A presença de uma MP com apenas um tipo de peritrofina (peritrofina 1) com poucos domínios CBDs, como observado no intestino médio de *T. theobaldi*, é um tipo de matriz mais simples quando comparada à MP dos mosquitos hematófagos que possuem várias peritrofinas com numeroso domínios CBDs<sup>48,54</sup> (Fig. 7). Um ambiente rico em proteases, como ocorre após a ingestão de sangue nos mosquitos hematófagos<sup>1,55,56</sup>, provavelmente requer peritrofinas com elevado número de CBDs para manter a integridade da MP. Na fase adulta *T. theobaldi* alimenta-se apenas de soluções ricas em açúcares, por isso a peritrofina 1 com pouco domínios CBDs seriam suficientes para manter a integridade funcional da MP. A hipótese filogenética para a peritrofina 1 diferiu das sequências ortólogas concatenadas para os culicíneos, porém a relação de irmão entre *T. theobaldi* e *A. aegypti* foi firmemente suportada (Fig. 8).

#### Peritrofinas simples

AeAper25b AgAper1 CqAper14 LuloPer1 GmPro2 LuloPer2 PpPer2 DmPer15a  
 AgAper14 LuloPer2 LuloPer3 DmPer15b  
 AgAper9 DmPer42  
 DmPer55

TtAper1

#### Peritrofinas binárias

AgICHIT

#### Peritrofinas complexas

AeIMUC1 AgAper26 CqAper26 DmObs-H  
 AeAper50 AgAper50 CqPer1

#### Peritrofinas repetitivas

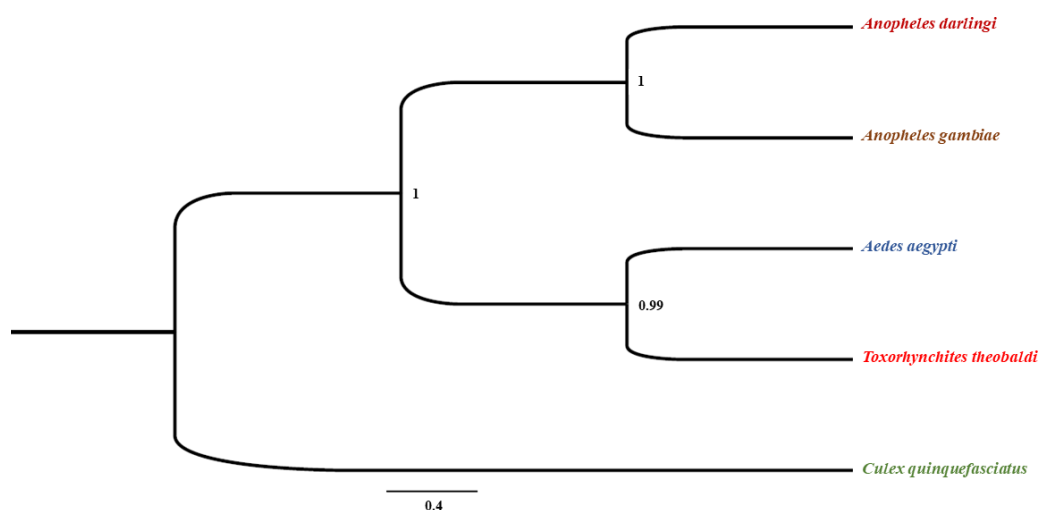
AeAper25a AgAper25a CqAper25a DmPer44  
 AgAper29 DmPer48  
 AgAper30  
 AgAper34  
 AgAper57

Domínio peritrofina A  
 Domínio modificado peritrofina A2  
 Domínio peritrofina B  
 Domínio peritrofina C parcial  
 Domínio peritrofina C total  
 Domínio de ligação carboidrato tipo III  
 Domínio peritrofina D

Ag- *Anopheles gambiae*  
 Ae- *Aedes aegypti*  
 Lulo- *Lutzomyia longipalpis*  
 Dm- *Drosophila melanogaster*  
 Tt- *Toxorhynchites theobaldi*

**Figura 7.** Peritrofinas conhecidas da matriz peritrófica de insetos da ordem Diptera. Classificação da peritrofina de acordo com seus domínios de ligação (CBDs). Peritrofinas com domínio A (PAD) é o tipo de mais comum de CBD com seis resíduos de cisteína interespaçados. Peritrofinas com

domínio A modificado (mPAD) possui dois resíduos de cisteínas adicionais. Peritrofina com domínio B possui 81-88 resíduos inter espaçados com oito resíduos de cisteínas. Peritrofina com domínio C possui 121-122 resíduos (PCD) inter espaçados com 10 resíduos de cisteínas. Domínio parcial PCDs contém entre 67-70 amino ácidos. Domínios de ligação a carboidrato tipo III contendo dez resíduos cisteínas interpaçados, similar a PCD, que comumente possuem 110-117 resíduos de aminoácidos. Outra classificação adotada para peritrofinas baseia-se nos domínios CBDs e domínios mucina (MDs) sendo possível observar quatro tipos: Peritrofina simples com um ou domínios CBD podendo conter pequenos MDs; Peritrofina binária com dois PADs separado por MDs; Peritrofinas complexas têm múltiplos CBDs interspaçados por MDs; Peritrofinas repetitivas com múltiplos CBDs, que são relacionados e pode apresentar MDs <sup>48,57</sup>. A peritrofina TtAper1, destacada pelo retângulo preto, é a única peritrofina encontrada na matriz peritrófica de *T. theobaldi*.



**Figura 8.** Hipótese filogenética obtida por inferência Bayesiana para as seqüências ortólogas da peritrofina 1 após clusterização pelo site orthovenn e alinhadas com MAFFT, para as espécies *Ae. aegypti* (AAEL002457), *T. theobaldi* (TT30727), *An. darlingi* (ADAC007818), *An. gambiae* (AGAP006795) e *C. quinquefasciatus* (CPIJ010654), respectivamente. Os valores ao lado de cada nó correspondem a probabilidade posterior de cada um utilizando o modelo de substituição de aminoácidos WAG.

## 4.2 Metabolismo de carboidratos

No PMG de *T. theobaldi* foram observados transcritos para as vias de síntese de trealose e glicogênio que são importantes fontes primárias de energia <sup>58,59</sup>. A glicose gerada por essas vias serve de substrato para a via glicolítica devido à presença dos transcritos relacionados ao metabolismo intermediário: glicose-6-fosfatase isomerase (1.663 reads), gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase (28.545 reads) e piruvato quinase (14.702 reads). O piruvato formado na glicólise também pode ser sintetizado *de novo* pela gliconeogênese pela piruvato carboxilase (806 reads) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (2.676 reads) conforme ocorre nas fêmeas que não hematófagas do mosquito *Wyeomyia smithii* <sup>60</sup>. Foi detectado transcritos para outras duas vias importantes para geração de energia, a via do ciclo do ácido cítrico e a via das pentoses que utilizam o piruvato como substrato <sup>58</sup>. Provavelmente *T. theobaldi* assim como observado nas fêmeas não hematófagas do sabethini *Wyeomyia smithii* utiliza mais de uma via metabólica para geração de energia <sup>60</sup>.

Dentre as carboidrases encontradas no intestino médio de *T. theobaldi*, a família das endohidrolases, composta principalmente pelas alfa-amilases (21%), são as mais numerosas. O grande número de glicosil hidrolases possibilita maior flexibilidade na dieta devido à ação dessas enzimas sobre diversos substratos principalmente amido e glicogênio <sup>61</sup>. A expressão da alfa-amilase em *T. theobaldi* ocorreu em todos os compartimentos do intestino médio sendo muito mais intensa na porção anterior, AMG1 e AMG2 ( $p < 0,0001$ ; fig. 5), o que indica que essa região é especializada na digestão de carboidratos conforme observado nos mosquitos hematófagos <sup>61,62</sup> e *D. melanogaster* <sup>63</sup>. Alpha-amilase também está presente na glândula salivar de *Toxorhynchitesamboinensis* <sup>39</sup>.

Além dos transcritos para as enzimas alfa-amilase e maltase-glucoamilase, que são associados à digestão inicial dos carboidratos, foram observados outros transcritos pertencentes à família hidrolase glicosídica tais como alfa-glicosidases (7.343 reads), alfa-galactosidase (384 reads), alfa-manosidase (7.726 reads) e beta-manosidase (10.748 reads) que participam da digestão intermediária e final dos carboidratos em insetos <sup>64</sup>. Além de transcritos referentes as hidrolases quitinolíticas beta-hexosaminidase, beta-N-acetilhexosaminidase e beta-manosidase (10.748 reads) que também degradam os resíduos lisossomais resultantes da degradação da parede celular de fungos e bactérias conforme observado em *M. domestica* e *D. melanogaster* <sup>65,66</sup>. Também foram detectadas lectinas ligantes de quitina que possuem um domínio não catalítico e um domínio CBD. Essas proteínas foram observadas exclusivamente no intestino de larvas e adultos de insetos de várias ordens <sup>67,68</sup>, sugerindo que apesar de ter perdido a capacidade catalítica, são capazes de se ligar à MP atuando na defesa contra patógenos ingeridos na alimentação <sup>67</sup>.

O processo de glicosilação envolve a adição enzimática de sacarídeos a proteínas e lipídeos permitindo que atuem no reconhecimento celular e nos processos de interação com bactérias, vírus e microrganismos <sup>69</sup>. Os oligossacarídeos, provavelmente impedem a ação das proteases e

patógenos no intestino médio dos culicídeos, o que deve ocorrer no intestino médio de *T. theobaldi*, devido à presença das N-acetil-glucosaminotransferases (5 CDS) e N-acetil-galactosaminotransferases (2 CDS) que estão presentes também nas membranas dos microvilos e na MP do intestino médio de *Ae. aegypti* e *Aedes stephensi*<sup>70</sup>.

#### 4.3 Imunidade e a contribuição à nutrição

O sistema imune inato e digestivo em insetos sintetizam proteínas, lisozimas e  $\beta$ -1,3-glucanases, envolvidas na resposta imune com papéis também na digestão<sup>71</sup>. A participação dessas enzimas em ambos os sistemas trazem vantagens nutricionais ao hospedeiro devido a síntese pelos micro-organismos de produtos essenciais ou por servirem como potencial fonte de energia<sup>72,73</sup>. Nos insetos fítofagos, a microbiota complementa a dieta fornecendo aminoácidos essenciais, vitaminas e esteróis<sup>73</sup>. No PMG de *T. theobaldi* foram detectados vários transcritos relacionados às vias metabólicas das vitaminas do complexo B<sup>74</sup> tais como: pantotenato quinase (vitamina B5, 1 CDS), biotinidase (vitamina B7, 4 CDS), piridoxina (vitamina B6, 2 CDS), nicotinamida (vitamina B3, 3 CDS) e C1-tetrahidrofolato sintase (vitamina B9, 2 CDS). Isso sugere que a síntese das vitaminas do complexo B no PMG de *T. theobaldi* pode envolver a participação de bactérias conforme provavelmente ocorre com *An. stephensi*<sup>182</sup>.

Os principais componentes das vias de sinalização imune humoral observados nos culicídeos foram identificados no PMG de *T. theobaldi* incluindo transcritos relacionados a via da Imunodeficiência (IMD), Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs), dentre os quais a família dos receptores Toll-like (TLRs) e Via Jak/STAT. Foram observados no PMG desse mosquito vários efetores que ativam os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) encontrados na superfície dos micro-organismos, dentre eles as proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRPs, 22 CDS), lectinas (48 CDS), RNA dupla fita de vírus (dsRNA, 4 CDS) e proteínas ligantes de beta-1,3-glucanas (3 CDS).

As proteínas ligantes de beta-1,3-glucanas ( $\beta$ GPRs) são proteínas solúveis pertencentes a família 16 das hidrolases glicolíticas que após serem secretadas no lúmen do intestino dos mosquitos interagem com a parede celular dos fungos<sup>183</sup>. A partir dessa interação inicia a cascata de profenoloxidasas (PPO, 262 reads) envolvendo a participação das serino proteases (10 CDS) e inibidores de serino proteases (27 CDS) que também estão presentes no intestino médio de *T.*

*theobaldi*, e que nos demais culicídeos resulta na formação de melanina <sup>40,75</sup>. Em mosquitos hematófagos, a ativação de PPO também ocorre após a ingestão de sangue provocando aumento da concentração de tirosina que é metabolizada por mecanismos diversos resultando também na formação de melanina <sup>40,76</sup>.

As lectinas tipo-C são proteínas que permitem o reconhecimento de carboidratos por receptores de reconhecimento de padrões, sendo necessário a presença do íon cálcio. No PMG de *T. theobaldi*, essa família é numerosa, sendo detectados 48 transcritos <sup>35</sup>, esse número foi superior ao que foi observado no transcriptoma do intestino médio de *Ae. aegypti*, e provavelmente atuam em resposta à diversidade de bactérias presentes no intestino. As lectinas tipo-C possuem motivos específicos para se ligar a uma gama de bactérias, no entanto, devido a ação regulatória sobre as vias de sinalização preservam as bactérias comensais da ação dos AMPs <sup>77</sup>.

Uma das respostas do sistema imune humoral no controle dos micro-organismos identificado nos insetos ocorre através da ação dos PGRPs que se encontram na membrana plasmática ou no espaço extracelular. No PMG de *T. theobaldi*, foram detectadas as classes de transcritos para proteínas de membrana PGRP-LC de cadeia longa isoforma A e PGRP-Ic de cadeia curta (PGRP-Ic e PGRP-Ic isoforma b e a classe de cadeia curta PGRP-S1, que provavelmente após serem secretados semelhante ao que foi observado em *Ae. aegypti* e *An. gambiae* ativam a via da Imunodeficiência (IMD) <sup>75,78</sup>. Em seguida, nesses mosquitos ocorre a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) após a translocação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, 1.321 reads) para o núcleo <sup>78,79</sup> presentes também no intestino de *T. theobaldi*.

Componentes que são efetores do sistema imune dos mosquitos foram identificados no PMG de *T. theobaldi*, incluindo os AMPs atacina, cecropina (CECA, CECA2, CECB, CECB1 e CECN), defensina (DEF A e DEF B) e lisozimas (LYS 3, LYSc-4 e LYSP). Os AMPs se ligam à parede celular das bactérias provocando o seu rompimento. As cecropinas e as defensinas possuem maior efetividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente, e são os AMPs melhor caracterizados em mosquitos <sup>45,80</sup>. A cecropina A2 possui maior expressão no PMG de *T. theobaldi* (p<0,0001; Fig. 5), de forma semelhante ao observado em *Ae. gambiae* <sup>14</sup>. Porém, a supressão da via IMD pelo fator transcricional caudal (446 reads) interrompe a produção de AMPs e lectinas do tipo-C em mosquitos contrabalanceando os efeitos das cecropinas, permitindo a manutenção da microbiota <sup>77</sup> semelhante mecanismos pode ocorrer em *T. theobaldi*. Outro mecanismo de controle dos AMPs que possivelmente ocorre no PMG de desse mosquito é

governado pelas amidases (1.259 reads). Essas enzimas são secretadas pelas células epiteliais e clivam os peptoglicanos em formas inativas em *D. melanogaster* permitindo a permanência das bactérias residentes<sup>82</sup>. É provável que as bactérias residentes também contribuam para a formação e manutenção da MP de *T. theobaldi* conforme foi observado em *Anopheles coluzzii*, no qual a ausência da microbiota mostrou ser importante na síntese dos seus principais constituintes<sup>45</sup>.

#### 4.4 Proteções contra o estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas constantemente devido à redução de oxigênio a ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e em virtude da resposta imune contra patógenos. Porém, em excesso, pode causar danos às biomoléculas<sup>83</sup>. Os mecanismos de defesa contra antioxidantes envolvem a produção de pequenas moléculas não-enzimáticas e enzimas antioxidantes<sup>84</sup>. Estas últimas incluem as enzimas catalase (11.876 reads), superóxido dismutase (23.004 reads) e glutaciona peroxidase (5.009 reads) presentes no intestino médio de *T. theobaldi*. A enzima superóxido dismutase converte ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e a catalase converte moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. No intestino médio de *T. theobaldi* estas duas enzimas antioxidantes são mais abundantes no AMG ( $P < 0.00001$ ; figura Fig. 5). Provavelmente, o excesso de ROS eliminado pelas catalases contribua para a manutenção das bactérias comensais, conforme observado no intestino médio de *D. melanogaster*<sup>85</sup>.

A família das citocromo P450 monoxigenase é a mais numerosa, totalizando 40% dos transcritos das famílias pertencentes ao metabolismo de detoxificação e oxidação do intestino médio de *T. theobaldi*. Essa família multigênica é bastante diversa possuindo 126 transcritos distribuídos em 14 subfamílias. A indução à síntese de P450 ocorre em resposta ao consumo de xenobióticos que podem estar contidos no alimento e subprodutos do metabolismo como ROS<sup>86</sup>.

A família glutaciona transferase é a segunda família de oxidases com maior expressão no PMG de *T. theobaldi*, classificada em função da localização na célula em microsomal e citosólica, sendo observado os transcritos glutationas-s-transferases (28 CDS), glutationas-s-transferases microsomais (7 CDS) e glutationas sintetase (2 CDS). As oxidases tais como citocromo glutaciona-s-transferase e P450 monoxigenase evitam a proliferação de bactérias tais como *Pseudomonas*, *Asaia* e *Acetobacter* comumente presentes no néctar ou em outras fontes de açúcares naturais que são consumidos pelos mosquitos<sup>83</sup>.

As famílias de proteínas de choque térmico, chaperonas moleculares, importantes em vários processos celulares, incluindo variações brusca de temperaturas ou estresse oxidativo, são representadas por 11 transcritos no PMG de *T. theobaldi*. A família chaperona HSP70 teve sua atividade elevada em *Ae. aegypti* e *Ae. gambiae* após o repasto sanguíneo devido ao aumento da temperatura<sup>87-89</sup>. As chaperonas HSP70 são proteínas conservadas auxiliando na recuperação após o choque térmico em outros dípteros, como *D. melanogaster* e *Musca domestica*, mesmo em temperaturas mais baixas<sup>90</sup>.

O ferro é um micronutriente importante no desenvolvimento do ovo e necessário em diversos processos celulares em mosquitos<sup>91</sup>. Esse metal entra na dieta dos mosquitos como heme ou íon férrico. O metabolismo do ferro é conservado nos insetos e envolve proteínas semelhantes nos processos de armazenamento, transporte e degradação<sup>48</sup>. O intestino médio de *T. theobaldi* expressou transcritos para as proteínas de ligação ao ferro, ferritina (106.568 reads) e transferrina (21.242 reads). A ferritina em artrópodes é composta por duas subunidades homólogas à cadeia leve (LCH) e pesada (HCH)<sup>92</sup>. A presença de subunidades de ferritina 1 (LCH) e 2 (HCH) em *T. theobaldi* sugere que essas proteínas expressadas no intestino médio são uma importante fonte de armazenamento e transporte de ferro, esse metal é usado em todas células vivas como cofator de várias proteínas em diversos processos metabólicos<sup>93,94</sup>. A ferritina funciona também como agente antioxidante sequestrando o ferro liberado durante a digestão<sup>91,94</sup>. No intestino médio de *T. theobaldi* a expressão da ferritina foi maior no PMG, provavelmente em virtude de o metabolismo ser mais intenso nessa porção do intestino ( $p < 0,001$ ; Fig. 5). Nos mosquitos hematófagos, a expressão de ferritina ocorre constitutivamente, sendo maior após a digestão do sangue<sup>87,88,91,94</sup>, a qual libera ferro. As proteínas de transporte de ferro ferritina e transferrina ao sequestrarem esse metal evita a utilização dele na reação de Fenton impedindo a geração de ROS e danos ao epitélio. Foi observado no intestino médio de *T. theobaldi* dois componentes envolvidos nas principais vias de regulação do ferro e do heme, o transcrito para a proteína de membrana heme oxigenase 1 (150 reads) e o receptor para o vírus da leucemia felina tipo C (FLVCR, 550 reads) uma proteína exportadora de heme, ambos apresentam expressão elevada no intestino médio posterior de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) durante a digestão do sangue<sup>95</sup>.

Os mecanismos observados no intestino médio de *T. theobaldi* para evitar os danos causados pelo ferro/heme são semelhantes a outros dípteros não-hematófagos, como *D. melanogaster*<sup>96</sup>. Diferente das estratégias utilizadas pelos mosquitos hematófagos para anular ou

diminuir os efeitos de grande quantidade de heme liberados durante a digestão do sangue que envolvem diversas moléculas <sup>48,87,88,97,98</sup>, conforme foi observado também na glândula salivar desses culicídeos <sup>99,100</sup>. Essas diferenças possivelmente se devem às adaptações que ocorreram nesses mosquitos para a digestão do sangue e, portanto, somam-se a outras evidências que indicam que o hábito hematófago representa uma condição derivada <sup>101-103</sup>. Provavelmente os culicídeos descendem de um ancestral predador que possuía características como mandíbulas fortes, comportamento de agressão e emboscada contra suas presas, conforme observado em *T. theobaldi* e *Anopheles* <sup>184</sup>, além da presença de enzimas digestivas para proteínas permitindo a transição para hematofagia. No entanto, outras características inerentes como saliva rica em anti-hemostáticos, proteínas analgésicas e anticoagulantes não observados no sialoma de *T. amboinenses* <sup>39</sup>, facilitaram a penetração da probóscide alongada (*Toxorhynchites* a probóscide é curvada ventralmente) neutralizando a resposta inflamatória. Outra adaptação importante que ocorreu nos mosquitos hematófagos foi o gerenciamento dos novos metabólitos produzidos pelo sangue, através da matriz peritrofica bastante espessa contendo várias peritrofinas, sendo observada apenas um tipo de peritrofina em *T. theobaldi* (Fig. 7). Além de mecanismos regulatórios complexos observados nas células intestinais para a regulação da expressão dos genes relacionados ao ferro/heme após a alimentação sanguínea evitando ao mesmo tempo uma sobrecarga de ferro e heme e danos oxidativos que estes íons podem causar.

#### 4.5 Metabolismo de aminoácidos

Insetos que se alimentam de néctar, como *T. theobaldi*, ingere aminoácidos essenciais e não-essenciais, proteínas e aminoácidos não-proteicos em baixas concentrações<sup>104</sup>. Os aminoácidos são utilizados na síntese de proteínas e lipídeos importantes à sobrevivência e à reprodução. Foram observados transcritos expressos no intestino de *Toxorhynchites* pertencentes ao metabolismo dos aminoácidos considerado essenciais (alanina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) e aminoácidos considerado não-essenciais (gama amino-butírico, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamina, glicina, prolina, serina e tirosina).

A metionina é um aminoácido obtido da dieta possivelmente é catabolizado nos precursores utilizados na síntese de cisteína e glutatona no PMG de *T. theobaldi* devido a presença dos transcritos cistationina beta-liase/cistationina gama-sintase (2.140 reads), S-adenosil-

homocisteína hidrolase (4.319 reads), S-adenosilmetionina sintetase (1.311 reads) e homocisteína S-metiltransferase (345 reads) <sup>105,106</sup>. Foi observado em *D. melagnogaster* e *Glossina morsitans* que restrições alimentares regulam de forma positiva a via da transulfuração reduzindo a disponibilidade de metionina, o que resulta na diminuição da síntese de proteínas <sup>105,107</sup>.

A presença da transaminase 4-aminobutirato aminotransferase (429 reads) e glutamato descarboxilase (2715 reads) é um indício da ocorrência da síntese do aminoácido não-proteico ácido gama amino-butírico (GABA) no intestino médio de *T. theobaldi*. GABA é um inibidor de neurotransmissão do sistema nervoso, que diminui a excitabilidade neuronal em insetos, através da excitação ou através de transportadores <sup>108</sup>, como o receptor cpj001929 gaba-a (44 reads) e proteína associado ao receptor gama-butírico (9.144 reads).

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAs) são obtidos da dieta sendo degradados através das aminotransferases de cadeia longa (BCAT1) liberando metabólitos utilizados como sinalizadores na comunicação entre tecidos <sup>109</sup>. As BCAT1 expressadas no intestino médio de *T. theobaldi* (924 reads) assim como ocorrem em outros culicídeos produzem alfa-cetoácidos de cadeia ramificada (417 reads) que provavelmente ativam a via de sinalização alvo de rapamicina (TOR) conforme observado em *Ae. aegypti* <sup>110</sup>. Essa via de sinalização atua sobre diversos processos celulares em resposta a disponibilidade de nutrientes, e foi observado no intestino de *D. melagnogaster* regulando vários genes peptídeos antimicrobianos através do fator transcricional Forkhead, observados também no intestino médio de *T. theobaldi* <sup>111</sup>. As BCATs juntamente com outras transaminases, como aspartato aminotransferases (2.944 reads), contribuem para conectar as diversas vias metabólicas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos conforme observado em *Rhodnius prolixus* <sup>65</sup>. Outro importante aminoácido que é sintetizado no intestino médio de *T. theobaldi* é o triptofano, essencial na formação das proteínas <sup>12</sup>. Os transcritos envolvidos no metabolismo do triptofano <sup>113,114</sup> quinurenina aminotransferase (1.115 reads), alanina-glioxilato aminotransferase (600 reads), quinurenina formamidase (2.281 reads) e triptofano-2,3-dioxigenase (129 reads) estão presentes no intestino desse culicídeo.

Após a digestão das proteínas ingeridas, os aminoácidos são absorvidos ou oxidados no intestino médio dos mosquitos para gerar energia conforme já comentamos, e o excesso de nitrogênio é excretado. Os compostos nitrogenados são removidos através de três mecanismos diferentes dependendo do habitat e da dieta dos insetos <sup>115</sup>. No PMG de *T. theobaldi*, componentes das vias clássica e alternativa de síntese do ácido úrico são observados. O ácido úrico comumente

é excretado sem nenhuma transformação através da via clássica nos mosquitos, sendo imprescindível a participação da enzima xantina desidrogenase (29.884 reads) nesse processo. Porém, conforme ocorre em *Ae. aegypti*<sup>116</sup>, o ácido úrico pode ser metabolizado nos compostos nitrogenados alantoina, ácido alantóico e ureia através da via uricolítica, utilizando as enzimas uricase (2.952 reads), alantoinase (240 reads) e alantoicase (8.609 reads), respectivamente. O excesso de amônia não excretado é fixado através da via glutamato sintase /glutamina sintetase (8.874 reads; 5.029 reads respectivamente), utilizando as enzimas prolina oxidase (147 reads), delta-1-pirrolina-5-carboxilato-desidrogenase (920 reads) e pirrolina-5-carboxilato redutase (430 reads) que produzem os aminoácidos glutamato e prolina, envolvidos nessa via, que estão presentes no PMG de *T. theobaldi*. A presença de 11 CDS para transportadores de membrana para glutamato nos permite supor que esse aminoácido pode ser transportado para a hemolinfa onde provavelmente é convertido em prolina. A prolina é um substrato energético muito utilizado nos músculos do voo<sup>117</sup>. O glutamato também pode ser oxidado pelo alfa-oxoglucurato produzindo alanina via alanina aminotransferase (4.699 reads) no intestino médio de *T. theobaldi*, conforme observado em *An. stephensi* e *Ae. aegypti*<sup>118,119</sup>. Ambos os processos relacionados à excreção de metabólitos nitrogenados são coordenados em insetos hematófagos e são mais intensos em órgãos excretores após a ingestão de sangue<sup>120</sup>.

#### 4.6 Metabolismo de proteínas

O PMG hematófagos é o local onde a síntese de proteases e degradação das proteínas é mais intensa<sup>1</sup>. As principais proteases digestivas observadas nesta região são as endopeptidases e as exopeptidases carboxipeptidases e aminopeptidases. As endopeptidases podem ser classificadas de acordo com o mecanismo catalítico em serino proteases, cistéino proteases, proteases aspárticas e metaloproteases<sup>64</sup>. As serino proteases tripsinas, quimotripsinas e serino tripsina semelhante à tripsina são moléculas pequenas que atuam no espaço endoperitrófico clivando grandes moléculas<sup>64</sup>.

As tripsina pertencentes às classe 3, 4 e 7 são constitutivas em fêmeas de mosquitos e as tripsinas pertencentes as classes 1 e 2 são induzidas após a alimentação sanguínea<sup>121</sup>. No PMG de *T. theobaldi* foram detectadas as tripsinas pertencentes às classes 1 (591.128 reads) e 4 (165.771 reads). Em fêmeas de *An. aquasalis*, as tripsina das classes 1 e 4 são armazenadas em vesículas na

porção apical do epitélio antes do repasto sanguíneo sendo liberadas no lúmen do intestino após o repasto <sup>121</sup>. A regulação das tripsinas no PMG de *T. theobaldi* deve ocorrer em resposta à presença do alimento no lúmen. As tripsinas 1 e 4 presentes no PMG *T. theobaldi* são parálogas com os culicídeos *Ae. aegypti*, *An. darlingi*, *Ae. gambiae* e *C. quinquefasciatus*, provavelmente devido a duplicação gênica que ocorreu nessas proteases. Nos mosquitos hematófagos, as duplicações gênicas nos genes para tripsina resultaram no aumento do número de cópias <sup>122,123</sup>, sendo observado sete clusters em *An. gambiae* onde o Antryp1 e Antryp2 são expressados após a alimentação sanguínea e o Antryp3, Antryp4 e Antryp7 <sup>121</sup> são constitutivamente expressados, o que sugere a ocorrência de duplicação gênica seguida de neofuncionalização das cópias derivadas. Em *C. quinquefasciatus*, a diversificação observada nas serino proteases semelhantes à tripsina provavelmente é o que teria permitido a esse culicídeo se alimentar de diferentes hospedeiros<sup>124</sup>. O PMG de *T. theobaldi* possui 56 transcritos para proteases semelhantes à tripsina sendo a maioria dos transcritos parálogos com os culicídeos *Ae. aegypti*, *Ae. darlingi*, *Ae. gambiae* e *C. quinquefasciatus* razão pela qual provavelmente desempenham funções distintas nesse mosquito.

As quimotripsinas detectadas no PMG de *T. theobaldi* pertencem às classes 1, 2 e B (isoformas BI e bi). As quimotripsinas e as tripsinas agem sobre as proteases que se encontram no espaço endoperitrófico, conforme observado em outros mosquitos <sup>123–125</sup>. A quimotripsina 1 é ortóloga as dos demais culicídeos, sendo expressada constitutivamente no intestino médio de *Aedes albopictus* submetidos à dieta a base de açúcares <sup>124</sup>. As quimotripsinas 1 e 2 são armazenadas como grânulos de zimógenos no intestino médio de *An. aquasalis*, sendo detectadas após o repasto sanguíneo devido à presença da extremidade N-terminal precedido pelo aminoácido arginina <sup>1,126,127</sup>.

As exopeptidases aminopeptidases possuem expressão constitutiva nos tecidos epiteliais agindo sobre a porção N-terminal das proteínas e ocorrem em todo intestino médio dos mosquitos submetidos à dieta a base de açúcares <sup>14</sup>. Várias classes de aminopeptidases, como as aminopeptidases da classe N, foram detectadas no PMG de *T. theobaldi* (8.712 reads). Essas aminopeptidases ocupam a porção apical dos microvilos do intestino dos insetos interagindo contra as toxinas produzidas por patógenos <sup>128</sup>. A metaloprotease metionina aminopeptidase 1 também foi detectada no intestino médio de *T. theobaldi*, exopeptidase importante por remover a metionina da porção N-terminal durante a síntese de várias proteínas apresentando expressão elevada na região AMG 1 (p<0.001; Fig. 5).

As carboxipeptidases clivam os aminoácidos na região C-terminal da cadeia de polipeptídeos. Várias classes de carboxipeptidases foram detectadas no PMG de *T. theobaldi*, tais como as classes A (3.386 reads), B (43.546 reads), D (77 reads), M (159 reads), Q (1.343 reads), prolilcarboxipeptidases (328 reads), serino carboxipeptidases (1.626 reads) e zinco carboxipeptidases (53.621 reads).

Uma classe de proteases, as aspartases, que não são encontradas no intestino médio dos mosquitos hematófagos, mas que são importantes na digestão do sangue nos triatomíneos também foi detectada no PMG de *T. theobaldi*. Essas proteases possuem dois resíduos de ácido aspártico no sítio catalítico<sup>1,64</sup>. Duas classes de aspartases, as catepsinas B (17.594 reads) e I (8.371 reads) foram detectadas no PMG de *T. theobaldi*. O recrutamento das catepsinas D em *M. domestica* e *D. melagnogaster* é atribuído à dieta rica em bactérias<sup>129</sup>. Além das aspartases, as cisteíno proteases que também não são encontradas no intestino dos mosquitos hematófagos foram observadas no PMG de *T. theobaldi*, cisteínas CG12163 (1.772 reads) e TIN-g (1.489 reads), ao contrário do que ocorre nos mosquitos hematófagos que a digestão é realizada principalmente pelas serino proteases<sup>1,129</sup>.

A partir da observação das proteases envolvidas na digestão de *T. theobaldi*, é possível perceber duas características presentes nos insetos hematófagos mantidas nesse mosquito. A utilização das aspartases-cisteínas proteases, como ocorre em insetos mais distantes evolutivamente, como é o caso dos triatomíneos<sup>1,130-132</sup>, e a utilização predominante das enzimas serino protease, principalmente as tripsinas, como ocorre nos culicídeos<sup>129-131,133</sup>. Conforme, já discutido anteriormente, existem fortes evidências que o mosquito *T. theobaldi* também utiliza as bactérias presentes no alimento para complementar a dieta, provavelmente as catepsinas lisossomais realizam a digestão inicial desses micro-organismos. Apesar de nos mosquitos essa função não ter sido ainda descrita formalmente, as bactérias podem estar envolvidas em alguns processos metabólicos, como provavelmente ocorra com o mosquito *An. stephensi* que obtém vitaminas através das bactérias *Asaia bogorensis*.

#### **4.7 Inibidores de proteases**

Os inibidores de proteases secretados no intestino médio de insetos auxiliam no controle da atividade das proteases utilizadas na digestão dos alimentos e dos patógenos nele contidos<sup>134</sup>. As

proteases podem ser sintetizadas e armazenadas inativas, como é o caso das tripsinas. Também se ligam a inibidores para impedir que sejam degradadas ou tenham limitado suas atividades limitadas<sup>135</sup>. Os transcritos para inibidores de proteases no PMG de *T. theobaldi* (49 CDS) foram identificados e revisados, como sendo pertencentes às famílias das serpinas, cistatinas, DUF4803, pacifastinas, tiroglobulinas tipo I, TIL, TIMPs e Kazal.

A família das serpinas é a mais abundante em eucariotos e assim como observado em outros culicídeos, numerosas serpinas (25 CDS) foram observadas no intestino de *T. theobaldi*. Esses inibidores de serino proteases desempenham diversas funções e estão presentes em vários órgãos dos insetos, incluindo as glândulas salivares e o intestino médio. A expressão das serpinas aumenta após o repasto sanguíneo nos mosquitos hematófagos, sendo comumente associada à ação antibacteriana para proteger o indivíduo de bactérias presentes no alimento<sup>136</sup>. Os inibidores de proteases com domínio Kazal (123.954 reads) é o segundo grupo com maior número de transcritos observados no PMG de *T. theobaldi* relacionados à defesa contra microrganismos nos culicídeos<sup>136,137</sup>.

Nos mosquitos, como *C. quinquefasciatus*, ocorreu expansão do número de genes pertencentes à família serino-proteases semelhantes à tripsina, que auxiliam na digestão dos componentes do sangue<sup>123</sup>. Essas serino-proteases também aumentam a expressão após o repasto sanguíneo nos mosquitos hematófagos, fato também considerado uma evolução adaptativa que favoreceu a digestão do sangue nesses insetos impulsionado pela aquisição de características hematófagas<sup>122</sup>. As serino-proteases semelhantes à tripsina observadas no intestino médio de *T. theobaldi* pertencem à família com domínio catalítico para tripsina atuando em processos essenciais aos culicídeos, como digestão do alimento e resposta imune<sup>122</sup>. Essa família possui transcritos homólogos aos demais culicídeos em *T. theobaldi* sendo secretada em todo intestino médio apresentando maior expressão no PMG ( $p < 0.0001$ , Fig. 5). A digestão das proteínas e microrganismos, principalmente no PMG pode ser uma fonte de energia e aminoácidos para *T. theobaldi* e é um tema a ser explorado no futuro, uma vez que a dieta desse mosquito, como ocorre em outros fitófagos, provavelmente possui conteúdo proteico reduzido. A escassez de nitrogênio é um fator limitante na nutrição de muitos insetos como *T. theobaldi* e, portanto, requer uso eficiente das proteases hidrolíticas, o que provavelmente só foi possível graças à presença de inibidores de proteínas e de mecanismos regulatórios do pH<sup>64,131,132</sup>.

#### 4.8 Metabolismo das proteínas de reserva

A expressão de genes codificadores de proteínas que armazenam nutrientes, assim como aqueles que atuam no controle da nutrição e transporte de metabólitos em insetos tem sido objeto de investigação. Entre as classes de proteínas de armazenamento observadas estão a ferritina e a transferrina já discutidas anteriormente. Além das proteínas de armazenamento e transporte de lipídeos, as lipoforinas, que serão discutidas adiante.

A proteína hexamerina constitui uma fonte de aminoácidos aromáticos que são importantes na vitelogênese <sup>138</sup>. As hexamerinas são classificadas em *larval serum protein 1* (LSP-1) e *larval serum protein 2* (LSP-2) de acordo com a quantidade de aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e metionina armazenados <sup>9</sup>. A hexamerina (5 CDS) presente em *T. theobaldi* pertence à classe LSP-1 apresentando uma porcentagem elevada de fenilalanina e tirosina <sup>9</sup>, além de possuir características estruturais de dípteros que divergiram no início da evolução da Ordem Diptera <sup>139</sup>. Vários transcritos envolvidos no metabolismo da tirosina participam da via de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), como as proteínas tirosina fosfatase (8 CDS). Apesar do desconhecimento da função das hexamerinas no PMG dos mosquitos adultos, a expressão nos culicídeos ocorre em ambos os sexos e as hexamerinas da classe LSP-1 pode ser uma fonte de energia a ser utilizada durante o voo <sup>139</sup>.

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é importante na regulação de processos catabólicos e anabólicos de ATP <sup>140</sup>. A subunidade catalítica gama (619 reads) de *T. theobaldi* é ortóloga aos culicídeos apresentando 87% de identidade com *Ae. aegypti* de acordo com banco de dados NCBI não redundantes. Os níveis de AMPK sofrem alteração de acordo com as necessidades nutricionais dos insetos sendo observados aumento da expressão para prover ATP <sup>140</sup>.

O transportador slimfast (855 reads) foi identificado em *Ae. aegypti* como um transportador que possui a função de transportador e receptor de aminoácidos entre o intestino e o corpo gorduroso durante a reprodução <sup>141</sup>. Esse tranceptor, conforme foi denominado devido à dupla função que exerce, está presente no PMG de *T. theobaldi* e é homólogo aos outros culicídeos. Apesar disso, não podemos afirmar se ocorre o transporte de aminoácidos até a hemolinfa para estimular a oogênese em *Toxorhynchites*, como ocorre nos mosquitos hematófagos <sup>141,142</sup>.

## 4.9 Hormônios

O sistema digestivo dos insetos é coordenado pelos neuropeptídeos que são produzidos pelas células enteroendócrinas sendo liberados para o espaço intracelular <sup>143,144</sup>. Os transcritos para os neuropeptídeos presentes no intestino médio de *T. theobaldi*, semelhante ao que foi observado em *Ae. aegypti*, provavelmente exercem sua ação após se ligarem aos receptores de membrana acoplados à proteína G (13 CDS) e receptor de tirosina (2 CDS) <sup>143,144</sup>. Transcritos relacionados ao metabolismo de hormônios tais como hormônio diurético, proteínas de ligação ao hormônio juvenil da hemolinfa (hJHBP), proteínas induzidas pelo hormônio juvenil, neuropeptídeo F, proteína 31 semelhante ao neuropeptídeo e hormônio de dispersão de pigmentos identificados baseados na similaridade com o hormônio de dispersão de pigmentos dos crustáceos <sup>145</sup> foram detectados no PMG de *T. theobaldi*. Os neuropeptídeos F são membros da família de neuropeptídeos NPY que modulam a alimentação, o metabolismo, a reprodução e a resposta ao estresse <sup>144</sup>. Transcritos para esses neuropeptídeos (1.985 reads) detectados no PMG de *T. theobaldi* são parálogos aos demais mosquitos e provavelmente modulam a ingestão do alimento, como ocorre em *D. melanogaster* <sup>146</sup>. Alterações na via do neuropeptídeo F em *Ae. aegypti* resultaram em alterações no comportamento de busca do hospedeiro e digestão do sangue <sup>146</sup>. Já os hormônios diuréticos (196 reads) estimulam a excreção de água do néctar e os hormônios de dispersão de pigmentos (1.497) regulam o comportamento dos insetos <sup>144,147,148</sup>.

O hormônio juvenil (HJ) regula a reprodução e o desenvolvimento dos insetos <sup>149</sup>. A síntese do HJ é regulada pelo estado nutricional, sendo estimulada ou reprimida devido a secreção de hormônios, como o neuropeptídeo F <sup>150</sup>. Vários transcritos que codificam para enzimas requeridas para a biossíntese, metabolismo e sinalização do HJ, incluindo ácido farnesoico O-metiltransferase (17.903 reads), proteínas semelhante ao ácido farnesoico O-metiltransferase (32.553 reads), epóxido hidrolase do HJ (6.710 reads), proteína induzida pelo HJ (30.790 reads) e proteína de ligação ao HJ da hemolinfa-hJHBP (4.565 reads) foram detectadas no PMG de *T. theobaldi*. Os transcritos relacionados aos passos finais da síntese do HJ, do ácido farnesoico O-metil transferase e epóxido hidrolase, aumentam a expressão em mosquitos hematófagos após a alimentação sanguínea <sup>150</sup>.

Uma nova classe de JHBP, pertencente à família das proteínas ligadoras a odores – OBP (denominadas de proteína de ligação ao HJ de mosquito ou mJHBP), foi caracterizada em *A.*

*aegypti*<sup>151</sup>. A proteína mJHPB pode atuar na alimentação, acasalamento e desenvolvimento do ovo<sup>151</sup>, sendo detectado dois CDS em *T. theobaldi*, com 59% (AAEL008620) de identidade com *Ae. aegypti* de acordo com o banco de dados NCBI não redundante. A mJHPB é caracterizada como família D7 forma longa nos bancos de dados de sequências. Nos mosquitos hematófagos, a proteína D7 longa está presente na saliva, auxiliando no rompimento das barreiras impostas pelo hospedeiro para aquisição de sangue<sup>152</sup>. Esta proteína provavelmente sofreu duplicação passando a desempenhar outras funções até o momento desconhecidas, como deve ocorrer com as proteínas parálogas observadas em *T. theobaldi* e em *D. melanogaster*, onde também foi observada<sup>151</sup>.

#### 4.10 Metabolismo de lipídeos

O metabolismo dos lipídeos é essencial na vida dos insetos devido ao papel dos seus constituintes na formação das membranas celulares, na sinalização celular, além de serem considerados a principal fonte de armazenamento de energia para o voo e reprodução<sup>153</sup>. Apesar disso, a principal fonte de nutrientes dos mosquitos adultos, como *T. theobaldi* é o néctar com pouca quantidade de lipídeos<sup>154</sup>.

O triacilglicerol é um dos principais lipídeos da dieta dos mosquitos e juntamente com os fosfolipídeos são hidrolisados a ácidos graxos livres, cujo transporte e absorção ocorre nos enterócitos com o auxílio das proteínas de transporte<sup>160</sup> como a proteína ligante de ácido graxo detectada em *T. theobaldi*. Em seguida eles são esterificados pela enzima Acil-CoA sintetase (28 CDS) para a formação de lipídeos mais complexos<sup>65</sup>. A digestão desses lipídeos requer a participação de diversas enzimas tais como lipase-esterase (4.705 reads), lipase pancreática (6.677 reads) e esfingomielinase ácida-fosfatase PHM5 (7.437 reads) que são secretadas. A lipase pancreática age inicialmente na interface água-éster de forma semelhante a triacilglicerol lipase<sup>155</sup> hidrolisando os lipídeos provenientes da dieta no lúmen intestinal, os produtos da degradação monoacilglicerol e ácidos graxos livres liberados são absorvidos pelo epitélio intestinal<sup>156,157</sup>. A expressão das lipases pancreáticas no intestino de *T. theobaldi* foram maiores no PMG, uma vez que a atividade dessas enzimas é favorecida por pH básico<sup>44,157</sup> ( $p < 0.00001$ ; fig. 5). Nos mosquitos hematófagos os aminoácidos e lipídeos liberados após a degradação do sangue servem como precursores para a síntese de lipídeos, como os triacilgliceróis (TAGs)<sup>55,88</sup>, que podem ser transportados pelas lipoforinas para outros tecidos, como o corpo gorduroso<sup>88,153</sup>.

O triacilglicerol é um dos principais componentes das gotículas lipídicas que constituem sítios de armazenamento de lipídeos neutros (trigliceróis, diacilgliceróis, colesterol e ácidos graxos). As gotículas de lipídeos são importantes na manutenção da homeostase dos lipídeos e na resposta imune contra vírus e bactérias <sup>158</sup>. No intestino de *T. theobaldi*, foram detectadas perilipinas 1 (3,592 reads) e perilipinas 2 (448 reads), uma classe de proteínas de revestimento das gotículas de lipídeos <sup>158,159</sup> que estão presentes no epitélio intestinal de *T. theobaldi*. Além dessas enzimas, outros membros da via da  $\beta$ -oxidação <sup>160,161</sup>, como 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, enoil-CoA hidratase, carnitina O-aciltransferase foram detectados no PMG de *T. theobaldi*. Portanto, podemos afirmar que *T. theobaldi* também utiliza essa via para obtenção de energia.

O PMG de *T. theobaldi* apresenta abundância de transcritos para lipoproteínas, correspondentes às apolipoproteínas II (62 reads) e III (2.101 reads), que atuam no transporte de lipídeos e servem como fonte de energia. A apolipoproteína III, importante fonte de energia durante o voo e estimulante do sistema imune, também pode estar presente na estrutura das lipoforinas <sup>162</sup>. As lipoforinas são lipoproteínas classificadas de acordo com a composição dos seus lipídeos: HDLp (lipoforina de alta densidade), VDLp (lipoforina de densidade muito alta) e LDLp (lipoforina de baixa densidade) <sup>153</sup>. Além das apolipoproteínas, o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR - 331 reads) e transcritos para região terminal das lipoproteínas (5 CDS) também foram detectados no PMG de *T. theobaldi*. A presença de transcritos para o receptor LDL é um indício de que os lipídeos também podem ser transportados para a hemolinfa, podendo servir como fonte de energia durante o voo <sup>153</sup>. Transcritos para outro receptor que também participa no transporte de lipídeos para a hemolinfa é o complexo F1F0 (ATP sintetase), que é formado por duas subunidades. As subunidades do complexo F1F0 alfa (12.584 reads) e beta (5.382 reads) foram detectadas no intestino médio de *T. theobaldi* e atuam provavelmente como receptores de lipoproteínas como ocorre no intestino médio do hemíptero *Panstrogyllus megistus* <sup>163</sup>.

Os insetos não capazes de sintetizar esteróis obtendo-os através da alimentação <sup>91</sup>. Os esteróis são precursores de hormônios esteroides e atuam como reguladores do desenvolvimento <sup>164</sup>. No caso de *T. theobaldi*, na fase de larva (carnívora) a quantidade de esterol adquirida é superior à fase adulta (fitófago), que ocorre em pequenas quantidades sob a forma de ésteres de ácidos graxos a partir do néctar ingerido <sup>154,164</sup>. Várias proteínas que são essenciais no processo de absorção e transporte de esteróis <sup>160,165,166</sup> foram detectadas no PMG de *T. theobaldi*, dentre elas a triglicerídeo lipase-colesterol esterase, NPC (proteína da doença Niemann-Pick C), proteínas

contendo o domínio STAR1 (proteína regulatória de esteroidogênese aguda) que transporta colesterol, proteína com domínio de captura do colesterol, proteína carreadora de esterol (SPC-2) e proteína transportadora da família ABCA tipo 1. A presença de 17  $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase provavelmente indica que o colesterol armazenado pode ser metabolizado em outros esteróis<sup>65</sup>. Nos mosquitos hematófagos o colesterol é obtido do sangue<sup>109</sup>, e é considerado um dos nutrientes essenciais para a síntese do hormônio ecdsona, importante no desenvolvimento do ovário<sup>167</sup>. A presença de transcritos para receptor de lipoforina de baixa densidade (LDL) que se liga à LDLp pode ser fonte de colesterol para *T. theobaldi*, como observado no carrapato *Ixode ricinus*<sup>168</sup>.

Outros transcritos que participam do metabolismo de lipídeos também foram detectados no PMG de *T. theobaldi*, como as desaturases (delta-6-ácido graxo/delta-8-esfingolípido, 32.024 reads), essenciais para o bom funcionamento das membranas biológicas. Também foram identificadas proteínas de transferência de fosfolipídeos (PL-TPs), tais como as proteínas de transferência do fosfoinositol (32 CDS) que participam da regulação do metabolismo dos fosfoinosítídeos e do tráfico de membranas<sup>169</sup>, além dos fosfolipídeos que atuam na via Kennedy<sup>170</sup>, sn-12 diacilglicerol etanolamina - colinefosfotranferases (11 CDS, 3.117 reads) e a proteína de ligação a fosfatiletalona (1.446 reads), que participam no processo de síntese de fosfatidilcolina e fosfatidiletalona, respectivamente. Esse último fosfolipídios é um dos componentes mais importantes para a preservação da integridade da membrana plasmática produzido por essa via<sup>170</sup>.

#### **4.11 Transportadores e canais**

O grande número de transcritos para transportadores e canais (totalizando 712 CDS) expressos no PMG de *T. theobaldi* condiz com um intenso processo de transporte de nutrientes e água, e de regulação do equilíbrio do pH e sais. As classes mais abundantes pertencem aos transportadores tipo ABC, transportadores de aminoácidos, transportadores de monocarboxilato, transportadores de ânions/prótons orgânicos, permeases pertencentes a superfamília dos principais facilitadores, transportadores de fosfato dependente de sódio, família de carreadores de solutos (subfamílias 2, 25, 35 e 39), transportadores de açúcares, transportadores de sulfato, ATPases vacuolares, transportadores de Zn/Zn<sup>2+</sup> e aquaporinas. Foram observados transcritos para

transportadores multivitamínicos dependente de sódio e transcritos simporte multivitamínico/mio-inositol/iodeto de sódio que participam do transporte de vitaminas do complexo B <sup>72</sup>. Os transportadores de aminoácidos, pertencentes à superfamília de carreadores de soluto (SLC), composta por duas subfamílias SCL6 e SCL7 também foram detectados no PMG de *T. theobaldi*. A subfamília SLC6-NSS (neurotransmissor de sódio por simporte) transporta aminoácidos essenciais que intermediam a sinalização neuro-humoral e neuroquímica <sup>171</sup>. Já a subfamília SLC7-CAT (transportadores de aminoácidos catiônicos-CAT) são permeases que intermediam o transporte catiônico por facilitar a difusão passiva e/ou permuta com alta afinidade pelos aminoácidos positivamente carregados como lisina <sup>172</sup>. No PMG de *T. theobaldi* foram encontrados quatro CDS para SLC7-CAT, dois desses são transportadores Slimfast com alta afinidade para aminoácidos catiônicos e neutros que combinam as funções de transportadores e receptores de aminoácidos regulados através da via TOR <sup>141,172</sup>.

Conforme já mencionado anteriormente, a excreção dos compostos nitrogenados em *T. theobaldi* provavelmente envolve a via uricolítica que é a forma mais comum em insetos terrestres. Porém, além dos transportadores de xantina/ácido úrico (8.247 reads) envolvidos no metabolismo de purinas e formação de ácido úrico para excreção, transportadores de amônia e transportadores ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  foram identificados. As ATPases  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  subunidades  $\alpha$  (16.152 reads) e  $\beta 1$  (8.849 reads) em *A. aegypti* são expressadas em órgãos que excretam amônia, como o PMG <sup>173,174</sup>. No entanto, o número de transcritos desses transportadores, incluindo a proteína transmembrana ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  subunidade  $\beta 1$  (109 reads) possui vários transcritos no PMG de *T. theobaldi*, sugerindo que no PMG de *T. theobaldi* pode ocorrer o sequestro e utilização da amônia na síntese de glutamina e prolina, seguidos da excreção de amônia, ácido úrico e ureia, conforme discutido anteriormente.

## 5. CONCLUSÕES

O intestino médio de *T. theobaldi* possui três subdivisões anatômicas onde as regiões anteriores (AMG1 e AMG2) se especializaram na digestão de carboidratos devido à expressão relativa da alfa-amilase ser muito superior ao PMG. Além do AMG, o PMG também participa do metabolismo dos carboidratos, pois vários transcritos relacionados às vias metabólicas destes nutrientes foram identificados no PMG. A maior expressão de proteínas que neutralizam as espécies reativas de oxigênio, como superóxido dismutase e catalase no AMG, indica que esta

região auxilia na manutenção da homeostase, preservando bactérias comensais que possam estar presentes.

O PMG de *T. theobaldi* é o local onde a expressão de proteases é maior, o que também foi observado no intestino dos mosquitos hematófagos e em *D. melanogaster*. O número elevado de transcritos para transportadores de aminoácidos e proteínas indica que o processo de síntese e degradação é intenso nessa região. A detecção de transcritos para catepsinas lisossomais e vários peptídeos antimicrobianos é um indício de que os micro-organismos podem ser utilizados para suplementar a dieta de *T. theobaldi*, principalmente com aminoácidos e lipídeos, devido à baixa concentração desses nutrientes no néctar e exudatos ingeridos por esse mosquito.

A independência do sangue para a reprodução/produção de ovos em *T. theobaldi* provavelmente é possível pelo fato de sua larva ser predadora e conseguir acumular grande quantidade de lipídeos e proteínas, utilizadas para o desenvolvimento dos folículos ovarianos do adulto. A condição autógena de *T. theobaldi* provavelmente foi herdada do ancestral não hematófago devido à presença de características comportamentais (larva predadora voraz), fisiológicas tais como presença de MP constitutiva, além de diversas proteases incluindo as catepsinas lisossomais, lipases e carboidrases que garantem o melhor aproveitamento dos nutrientes e morfológicas (adulto possui probóscide curvada para baixo). Outra evidência que suporta essa hipótese é a menor diversidade de transcritos envolvidos na neutralização do ferro/heme no PMG de *T. theobaldi* em relação aos mosquitos hematófagos. As diferenças observadas nesse mosquito fazem dele um modelo muito interessante para entender os mecanismos que permitiram o sucesso dos mosquitos hematófagos para a alimentação sanguínea.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Santiago, P. B. *et al.* Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity - a review. *Parasit. Vectors* **10**, 79 (2017).
2. Zhou, X., Rinker, D. C., Pitts, R. J., Rokas, A. & Zwiebel, L. J. Divergent and Conserved Elements Comprise the Chemoreceptive Repertoire of the Nonblood-Feeding Mosquito *Toxorhynchites amboinensis*. *Genome Biol. Evol.* **6**, 2883–2896 (2014).
3. Bradshaw, W. E. *et al.* Evolutionary transition from blood feeding to obligate nonbiting in a mosquito. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 1009–1014 (2018).
4. Ribeiro, H. Systematics and Identification of Afrotropical *Toxorhynchitinae* (Diptera: Culicidae). *Evolution J. Med. Entomol* **42** (6), 953–958 (2005).
5. Schreiber, E. T. *Toxorhynchites*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **23**, 129–132 (2007).
6. Steffan, W. A. & Evenhuis, N. L. Biology of *Toxorhynchites*. *Annu. Rev. Entomol.* **26**, 159–81 (1981).
7. Pascini, T. *et al.* Changes in the fat body during the post-embryonic development of the predator *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab) (Diptera: Culicidae). *Neotrop. Entomol.* **40**, 456–461 (2011).
8. Wheeler, D. E. & Buck, N. A. A role for storage proteins in autogenous reproduction in *Aedes atropalpus*. *J. Insect Physiol.* **42**, 961–966 (1996).
9. Korochkina, S. E., Gordadze, A. V, Zakharkin, S. O. & Beneš, H. Differential Accumulation and Tissue Distribution of Mosquito Hexamerins During Metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, 813–824 (1997).
10. Hernández-Martínez, S. *et al.* Juvenile hormone controls ovarian development in female *Anopheles albimanus* mosquitoes. *Sci. Rep.* **9**(1), 2127 (2019).
11. Dana, A. N. *et al.* Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* **6**, 5 (2005).

12. Talyuli, O. A. C. *et al.* The use of a chemically defined artificial diet as a tool to study *Aedes aegypti* physiology. *J. Insect Physiol.* **83**, 1–7 (2015).
13. Foster, W. A. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. *Annu. Rev. Entomol.* **40**, 443–474 (1995).
14. Warr, E., Aguilar, R., Dong, Y., Mahairaki, V. & Dimopoulos, G. Spatial and sex-specific dissection of the *Anopheles gambiae* midgut transcriptome. *BMC Genomics* **8**, 37 (2007).
15. Okuda, K., Caroci, A. d. S., Ribolla, P. E. M., de Bianchi, A. G. & Bijovsky, A. T. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue Cell* **34**, 210–219 (2002).
16. Birol, I. *et al.* De novo transcriptome assembly with ABySS. *Bioinformatics* **25**, 2872–2877 (2009).
17. Simpson, J. T. *et al.* ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res.* **19**, 1117–1123 (2009).
18. Zhao, Q. Y. *et al.* Optimizing de novo transcriptome assembly from short-read RNA-Seq data: a comparative study. *BMC Bioinformatics* **12 Suppl 14**, (2011).
19. Luo, R. *et al.* SOAPdenovo2: An empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *GigaScience* **1 (1)**, 18 (2012).
20. Karim, S., Singh, P. & Ribeiro, J. M. C. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One* **6** (12), p. e28525 (2011).
21. Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng.* **12**, 3–9 (1999).
22. Sonnhammer, E. L., von Heijne, G. & Krogh, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **6**, 175–82 (1998).
23. Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R. & Brunak, S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*

- 15**, 153–164 (2005).
24. Duckert, P., Brunak, S. & Blom, N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 107–112 (2004).
  25. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402 (1997).
  26. Trapnell, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–578 (2012).
  27. Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* **30**, 1–7 (2017).
  28. Castresana, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 540–552 (2000).
  29. Ronquist, F. *et al.* MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **61**, 539–542 (2012).
  30. Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. *Gatew. Comput. Environ. Work* 1-8 (2010).
  31. Xu, L. *et al.* OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Res.* **47**, W52–W58 (2019).
  32. Rambaut, A. FigTree v1.4.4. Available at: <https://github.com/rambaut/figtree/releases/tag/v1.4.4>. (Accessed: 8th June 2019)
  33. Padrón, A. *et al.* In depth annotation of the *Anopheles gambiae* mosquito midgut transcriptome. *BMC Genomics*. **15**, 1-14 (2014).
  34. Martínez-Barnette, J. *et al.* Transcriptome of the adult female malaria mosquito vector *Anopheles albimanus*. *BMC Genomics* **13**, 207 (2012).
  35. Bonizzoni, M. *et al.* RNA-seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* **12** (1), 82 (2011).

36. Ribeiro, J. M. C. A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**, 865–882 (2003).
37. William R. Reid<sup>1,2</sup>, L. Z. and N. L. Temporal Gene Expression Profiles of Pre Blood-Fed Adult Females Immediately Following Eclosion in the Southern House Mosquito *Culex Quinquefasciatus*. *Int. J. Biol. Sci* **11**, (2015).
38. Sarauer, B. L., Gillott, C. & Hegedus, D. Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Mol. Biol.* **12**(4), 333-343 (2003).
39. Calvo, E., Pham, V. M. & Ribeiro, J. M. C. An insight into the sialotranscriptome of the non-blood feeding *Toxorhynchites amboinensis* mosquito. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 499–507 (2008).
40. Waterhouse, R. M. *et al.* Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science* **316**, 1738–43 (2007).
41. Koonin, E. V. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 309–338 (2005).
42. Forslund, K., Pekkari, I. & Li Sonnhammer, E. *Domain architecture conservation in orthologs*. **12** (1), 326 (2011).
43. Gabaldón, T. & Koonin, E. V. Functional and evolutionary implications of gene orthology HHS Public Access. *Nat Rev Genet* **14**, 360–366 (2013).
44. Godoy, R. S. M., Fernandes, K. M. & Martins, G. F. Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae). *Sci. Rep.* **5**, 1–16 (2015).
45. Rodgers, F. H., Gendrin, M., Wyer, C. A. S. & Christophides, G. K. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathog.* **13**, 1–22 (2017).
46. Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., Arakane, Y. & Kramer, K. J. Chitin Metabolism in Insects. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. 193–235 (2012).

47. Morlais, I. & Severson, D. W. Identification of a Polymorphic Mucin-like Gene Expressed in the Midgut of the Mosquito, *Aedes aegypti*, Using an Integrated Bulk Segregant and Differential Display Analysis. *Genetics*. **158**, 1125–1136 (2001).
48. Whiten, S. R., Eggleston, H. & Adelman, Z. N. Ironing out the Details: Exploring the Role of Iron and Heme in Blood-Sucking Arthropods. *Front. Physiol.* **8**, 1134 (2018).
49. Whiten, S. R., Ray, W. K., Helm, R. F. & Adelman, Z. N. Characterization of the adult *Aedes aegypti* early midgut peritrophic matrix proteome using LC-MS. *PLoS One* **13**, e0194734 (2018).
50. Elvin, C. M. *et al.* Characterization of a Major Peritrophic Membrane Protein, Peritrophin-44, from the Larvae of *Lucilia cuprina* cDNA and deduced amino acid sequences. *J. Biol. Chem.* **271**:8925–35 (1996).
51. Wu, P. *et al.* A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness to Arboviruses. *Cell Host Microbe* **25**, 101-112.e5 (2019).
52. Kantor, A. M. *et al.* Identification and initial characterization of matrix metalloproteinases in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **26**, 113–126 (2017).
53. Pa Wu, A. *et al.* A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness to Arboviruses. *Cell Host Microbe* **25**, 101–112 (2019).
54. Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C. & Toprak, U. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annu. Rev. Entomol.* **54**, 285–302 (2009).
55. Dana, A. N. *et al.* Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* **6**, 5 (2005).
56. Okuda, K. *et al.* Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *J. Insect Physiol.* **51**, 769–776 (2005).
57. Toprak, U., Erlandson, M. & Hegedus, D. *Peritrophic matrix proteins*. *Trends in Entomology* **6**, 23–51 (2010b).
58. Thompson, S. N. Trehalose - The Insect ‘Blood’ Sugar. *Advances in Insect Physiology* **31**,

205–85 (2003).

59. Kunieda, T. *et al.* Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: Insights from the honey bee genome. *Insect Mol. Biol.* **15**(5), 563-576 (2006).
60. Bradshaw, W. E. *et al.* Evolutionary transition from blood feeding to obligate nonbiting in a mosquito. *PNAS* **115**, 1009–1014 (2018).
61. Da Lage, J.-L. The Amylases of Insects. *Int. J. Insect Sci.* **10**, 117954331880478 (2018).
62. Souza-Neto, J. A., Machado, F. P., Lima, J. B., Valle, D. & Ribolla, P. E. M. Sugar digestion in mosquitoes: Identification and characterization of three midgut  $\alpha$ -glucosidases of the neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **147**, 993–1000 (2007).
63. Erkosar, B., Leulier, F., Kasper, L. H. & Just, W. Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: Novel insights from the *Drosophila* model. *FEBS Lett.* **588**, 4250–4257 (2014).
64. Terra, W.R., Ferreira, C. Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L.I., Iatrov, K., Gill, S. (Org.). *Comprehensive Molecular Insect Science*, **4**, 171–224 (2005).
65. Ribeiro, J. M. C. *et al.* An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2594 (2014).
66. Kunieda, T. *et al.* Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Mol. Biol.* **15**, 563–576 (2006).
67. Zhu, Q. *et al.* Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 452–466 (2008).
68. Arakane, Y. & Muthukrishnan, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **67** (2), 201–216 (2010).
69. Walker-Nasir, E., Ahmad, I., Saleem, M. & Hoessli, D. C. *Glycosyltransferase and Glypiation Inhibitors.* *Current Organic Chemistry* **11** (7), 591-607 (2007).

70. Wilkins, S. & Billingsley, P. F. Partial characterization of oligosaccharides expressed on midgut microvillar glycoproteins of the mosquito, *Anopheles stephensi* liston. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31** (10), 937-948 (2001).
71. Broderick, N. A. A common origin for immunity and digestion. *Front. Immunol.* **6**, 72 (2015).
72. Minard, G., Mavingui, P. & Moro, C. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit. Vectors* **6**, 146 (2013).
73. Kuldeep Gupta, M. K., Sanjeev Kumar, L. G., Gupta, L. & Kumar, S. A Fine-Tuned Management between Physiology and Immunity Maintains the Gut Microbiota in Insects. *Biochem. Physiol. Open Access* **04**, 1–8 (2015).
74. Salem, H. *et al.* Vitamin supplementation by gut symbionts ensures metabolic homeostasis in an insect host. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **281**, (2014).
75. Wang, Y.-H., Chang, M.-M., Wang, X.-L. & Zheng, A.-H. The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. *Dev. Comp. Immunol.* **83**, 12–21 (2018).
76. Sterkel, M. *et al.* Tyrosine Detoxification Is an Essential Trait in the Life History of Blood-Feeding Arthropods. *Curr. Biol.* **26**, 2188–2193 (2016).
77. Pang, X. *et al.* Mosquito C-type lectins maintain gut microbiome homeostasis. *Nat. Microbiol.* **1**, 16023 (2016).
78. Gendrin, M. *et al.* The Peptidoglycan Recognition Proteins PGRPLA and PGRPLB Regulate *Anopheles* Immunity to Bacteria and Affect Infection by *Plasmodium*. *J. Innate Immun.* **9** (4), 333-342 (2017).
79. Wang, Y. H., Chang, M. M., Wang, X. L., Zheng, A. H. & Zou, Z. The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. *Dev. Comp. Immunol.* (2018).
80. Patil, D. P. *et al.* Generation, annotation, and analysis of ESTs from midgut tissue of adult female *Anopheles stephensi* mosquitoes. *BMC Genomics* **10**, 386 (2009).

82. Engel, P. & Moran, N. A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 699–735 (2013).
83. Champion, C. J. & Xu, J. The impact of metagenomic interplay on the mosquito redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* **105**, 79–85 (2017).
84. Yang, H.-T. *et al.* Catalase eliminates reactive oxygen species and influences the intestinal microbiota of shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* **47**, 63–73 (2015).
85. Engel, P. & Moran, N. A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 699–735 (2013).
86. Hlavica, P. Insect cytochromes P450: Topology of structural elements predicted to govern catalytic versatility. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 1354–1364 (2011).
87. Ribeiro, J. M. C. A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**, 865–882 (2003).
88. Sanders, H. R., Evans, A. M., Ross, L. S. & Gill, S. S. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**, 1105–1122 (2003).
89. Benoit, J. B. *et al.* Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **108** (19), 8026–8029 (2011).
90. Gong, W. J. & Golic, K. G. Loss of Hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics.* **172**(1), 275–286 (2006).
91. Rivera-Pérez, C., Clifton, M. E. & Noriega, F. G. How micronutrients influence the physiology of mosquitoes. *Curr. Opin. Insect Sci.* **23**, 112–117 (2017).
92. Tang, X. & Zhou, B. Iron homeostasis in insects: Insights from *Drosophila* studies. *IUBMB Life* **65**, 863–872 (2013).
93. Zhou, G. *et al.* Fate of blood meal iron in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* **53**(11), 1169–1178 (2007).

94. Okuda, K. *et al.* Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *J. Insect Physiol.* **51**, 769–776 (2005).
95. Walter-Nuno, A. B., Taracena, M. L., Mesquita, R. D., Oliveira, P. L. & Paiva-Silva, G. O. Silencing of iron and heme-related genes revealed a paramount role of iron in the physiology of the hematophagous vector *Rhodnius prolixus*. *Front. Genet.* **9** (19) (2018).
96. Cui, L. *et al.* Relevant expression of *Drosophila* heme oxygenase is necessary for the normal development of insect tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 1156–61 (2008).
97. Bonizzoni, M. *et al.* RNA-seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* **12**, 82 (2011).
98. Sterkel, M., Oliveira, J. H. M., Bottino-Rojas, V., Paiva-Silva, G. O. & Oliveira, P. L. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. *Trends Parasitol.* **33**, 633–644 (2017).
99. Francischetti, I. M. B., Valenzuela, J. G., Pham, V. M., Garfield, M. K. & Ribeiro, J. M. C. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* **205**, 2429–51 (2002).
100. Ribeiro, J. M. C., Martin-Martin, I., Arcà, B. & Calvo, E. A Deep Insight into the Sialome of Male and Female *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS One* **11**, e0151400 (2016).
101. Mans, B. J., Louw, A. I. & Neitz, A. W. H. Evolution of hematophagy in ticks: Common-origins for blood coagulation and platelet aggregation inhibitors from soft ticks of the genus *Ornithodoros*. *Molecular Biology and Evolution.* **19**(10), 1695-1705. (2002).
102. Paiva-Silva, G. O. *et al.* A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. **103**(21), 8030-8035 (2006).
103. Azar, D. & Nel, A. Evolution of hematophagy in “non-biting midges” (Diptera: Chironomidae). *Terr. Arthropod Rev.* **5**, 15–34 (2012).
104. Nepi, M. *et al.* Amino acids and protein profile in floral nectar: Much more than a simple reward. *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **207**, 475–481 (2012).

105. Kabil, H., Kabil, O., Banerjee, R., Harshman, L. G. & Pletcher, S. D. Increased transsulfuration mediates longevity and dietary restriction in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**(40), 16831-16836. (2011).
106. Škovierová, H. *et al.* The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *International Journal of Molecular Sciences*. **17**(10), 1733 (2016).
107. Bing, X. *et al.* Unravelling the relationship between the tsetse fly and its obligate symbiont *Wigglesworthia*: transcriptomic and metabolomic landscapes reveal highly integrated physiological networks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **284** (857), 20170360, 2017.
108. Zhu, Y. *et al.* Blood meal acquisition enhances arbovirus replication in mosquitoes through activation of the GABAergic system. *Nat. Commun.* **8**, 1262 (2017).
109. Lampe, L. & Levashina, E. A. MicroRNA Tissue Atlas of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *G3 (Bethesda)*. **8**, 185–193 (2018).
110. Short, S. M., Mongodin, E. F., MacLeod, H. J., Talyuli, O. A. C. & Dimopoulos, G. Amino acid metabolic signaling influences *Aedes aegypti* midgut microbiome variability. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005677 (2017).
111. Varma, D., Bülow, M. H., Pesch, Y. Y., Loch, G. & Hoch, M. Forkhead, a new cross regulator of metabolism and innate immunity downstream of TOR in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* **69**, 80–88 (2014).
112. Han, Q., Beerntsen, B. T. & Li, J. The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. *J. Insect Physiol.* **53**, 254–263 (2007).
113. Han, Q. & Li, J. 3-Hydroxykynurenine Transaminase Identity with Alanine Glyoxylate Transaminase Enzyme View project kynurenic acid synthesis in mouse brain view project. *Artic. J. Biol. Chem.* **277**(18), 15781-15787 (2002).
114. Han, Q., Kim, S. R., Ding, H. & Li, J. Evolution of two alanine glyoxylate aminotransferases in mosquito. *Biochem. J.* **397**, 473–481 (2006).

115. von Dungern P & Briegel. Protein catabolism in mosquitoes: ureotely and uricotely in larval and imaginal *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **47**, 131–141 (2001).
116. Scaraffia, P. Y. *et al.* Discovery of an alternate metabolic pathway for urea synthesis in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(2), 518-523 (2008).
117. Isoe, J. & Scaraffia, P. Y. Urea synthesis and excretion in *Aedes aegypti* mosquitoes are regulated by a unique cross-talk mechanism. *PLoS One* **8**, e65393 (2013).
118. Scaraffia, P. Y., Zhang, Q., Thorson, K., Wysocki, V. H. & Miesfeld, R. L. Differential ammonia metabolism in *Aedes aegypti* fat body and midgut tissues. *J. Insect Physiol.* **56**(9), 1040-1049 (2010).
119. Giulivi, C., Ross-Inta, C., Horton, A. A. & Luckhart, S. Metabolic pathways in *Anopheles stephensi* mitochondria. *Biochem. J* **415**, 309–316 (2008).
120. Scaraffia, P. Y., Isoe, J., Murillo, A. & Wells, M. A. Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 491–503 (2005).
121. Dias-Lopes, G. *et al.* Expression of active trypsin-like serine peptidases in the midgut of sugar-feeding female *Anopheles aquasalis*. *Parasit. Vectors* **8**, 296 (2015).
122. Wu, D. D., Wang, G. D., Irwin, D. M., & Zhang, Y. P. (2009). A profound role for the expansion of trypsin-like serine protease family in the evolution of hematophagy in mosquito. *Molecular biology and evolution*, **26**(10), 2333-2341 (2010).
123. Borges-Veloso, A. *et al.* In-depth characterization of trypsin-like serine peptidases in the midgut of the sugar fed *Culex quinquefasciatus*. *Parasit. Vectors* **8**, 373 (2015).
124. Saboia-Vahia, L. *et al.* The midgut of *Aedes albopictus* females expresses active trypsin-like serine peptidases. *Parasit. Vectors* **7**, 253 (2014).
125. Matilde, L. S. V. & Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, R. B. Análise da expressão protéica e de peptidases em formas pré-imaginais e imagos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Diss. (2013).

126. Vizioli, J., Catteruccia, F., Della Torre, A. & Müller, H.-M. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins e-learning tools production in animal biology teaching View project Field analysis of Mosquito swarming to control mating View project. *Article in European Journal of Biochemistry*. **268(14)**, 4027-4035. (2001).
127. Reid, W. R., Zhang, L. & Liu, N. Temporal Gene Expression Profiles of Pre Blood-Fed Adult Females Immediately Following Eclosion in the Southern House Mosquito *Culex Quinquefasciatus*. *Int. J. Biol. Sci.* **11**, 1306–13 (2015).
128. Huang, W.-C. *et al.* Review 1800011 (1 of 15) Adjuvant and Antigen Systems for Malaria Transmission-Blocking Vaccines Transmission-Blocking Vaccines. *Advanced Biosystems*, **2 (10)**, 1800011 (2018).
129. Terra, W. R., Dias, R. O. & Ferreira, C. Recruited lysosomal enzymes as major digestive enzymes in insects. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 615–623 (2019).
130. Yazdani, E., Zibae, A. & Sendi, J. J. Digestive proteases of *Papilio demoleus*: Compartmentalization and characterization. *Phytoparasitica*. **42(1)**, 121-133 (2014).
131. Martinez, M. *et al.* Molecular Sciences Phytocystatins: Defense Proteins against Phytophagous Insects and Acari. *Int. J. Mol. Sci* **17**, (2016).
132. Henriques, B. S. *et al.* Genome wide mapping of peptidases in *Rhodnius prolixus*: Identification of protease gene duplications, horizontally transferred proteases and analysis of peptidase a1 structures, with considerations on their role in the evolution of hematophagy in triatominae. *Front. Physiol.* **17(10)**, 1747 (2017).
133. Wu, D. D., Wang, G. D., Irwin, D. M., & Zhang, Y. P. A profound role for the expansion of trypsin-like serine protease family in the evolution of hematophagy in mosquito. *Molecular biology and evolution*, **26(10)**, 2333-2341 (2009).
134. Zhao, A., Li, Y., Leng, C., Wang, P. & Li, Y. Inhibitory effect of protease inhibitors on larval midgut protease activities and the performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Front. Physiol.* **9**, 1963 (2018).

135. Gubb, D., Sanz-Parra, A., Barcena, L., Troxler, L. & Fullaondo, A. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Biochimie*. **92**, 1749–1759 (2010).
136. Gulley, M. M., Zhang, X. & Michel, K. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. *J. Insect Physiol.* **59**, 138–147 (2013).
137. Soares, T. S. *et al.* A Kazal-type inhibitor is modulated by *Trypanosoma cruzi* to control microbiota inside the anterior midgut of *Rhodnius prolixus*. *Biochimie*. **112**, 41–48 (2015).
138. Martins, L. A. *et al.* *Culex quinquefasciatus* Storage Proteins. *PLoS One*. **8**, e77664 (2013).
139. Gordadze, A. V. *et al.* Molecular cloning and expression of two hexamerin cDNAs from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **8**, 55–66 (1999).
140. Telang, A., Peterson, B., Frame, L., Baker, E. & Brown, M. R. Analysis of molecular markers for metamorphic competency and their response to starvation or feeding in the mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Insect Physiol.* **56**, 1925–1934 (2010).
141. Boudko, D. Y. *et al.* Substrate specificity and transport mechanism of amino-acid transceptor Slimfast from *Aedes aegypti*. *Nat. Commun.* **6**, 8546 (2015).
142. Hennig, K. M., Colombani, J. & Neufeld, T. P. TOR coordinates bulk and targeted endocytosis in the *Drosophila melanogaster* fat body to regulate cell growth. *J. Cell Biol.* **173**(6), 963-974 (2006).
143. Predel, R. *et al.* Neuropeptidomics of the Mosquito *Aedes aegypti*. *J. Proteome Res.* **9**, 2006–2015 (2010).
144. Nässel, D. R. & Wegener, C. A comparative review of short and long neuropeptide F signaling in invertebrates: Any similarities to vertebrate neuropeptide y signaling? *Peptides*. **32**, 1335–1355 (2011).
145. Shafer, O. T. & Yao, Z. Pigment-dispersing factor signaling and circadian rhythms in insect locomotor activity. *Current Opinion in Insect Science* **1**, 73-80 (2014).
146. Fadda, M. *et al.* Regulation of feeding and metabolism by neuropeptide F and short neuropeptide F in invertebrates. *Frontiers in Endocrinology*. **10**, 64 (2019).

147. Veenstra, J. A., Agricola, H. J. & Sellami, A. Regulatory peptides in fruit fly midgut. *Cell Tissue Res.* **334**(3), 499-516 (2008).
148. Harzsch, S., Dirksen, H. & Beltz, B. S. Development of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the American lobster: Homology to the insect circadian pacemaker system? *Cell Tissue Res.* **335**(2), 417-429 (2009).
149. Rahman, M. M., Franch-Marro, X., Maestro, J. L., Martin, D. & Casali, A. Local Juvenile Hormone activity regulates gut homeostasis and tumor growth in adult *Drosophila*. *Sci. Rep.* **7**(1), 11677 (2017).
150. Noriega, F. G. Juvenile Hormone Biosynthesis in Insects: What Is New, What Do We Know, and What Questions Remain? *Int. Sch. Res. Not.* **2014**, 1–16 (2014).
151. Hwan Kim, I. *et al.* A mosquito hemolymph odorant-binding protein family member specifically binds juvenile hormone. *Journal of Biological Chemistry.* **292**(37), 15329-15339 (2017).
152. Kim, I. H. *et al.* A mosquito hemolymph odorant-binding protein family member specifically binds juvenile hormone. *Journal of Biological Chemistry.* **292**, 15329–15339 (2017).
153. Arrese, E. L. *et al.* Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 7–17 (2001).
154. Wäckers, F. L., Romeis, J. & van Rijn, P. Nectar and Pollen Feeding by Insect Herbivores and Implications for Multitrophic Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* **52**, 301-323 (2007).
155. Zibae, A., Alborzi, Z. & Hoda, H. A review on digestive TAG-lipases of insects. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **47**, 2187–2192 (2014).
156. Grillo, L. A. M., Majerowicz, D. & Gondim, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**, 579–588 (2007).
157. Horne, I., Haritos, V. S. & Oakeshott, J. G. Comparative and functional genomics of lipases

- in holometabolous insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39(8)**, 547-567 (2009).
158. Barletta, A. B. F. *et al.* Emerging role of lipid droplets in *Aedes aegypti* immune response against bacteria and Dengue virus. *Sci. Rep.* **6**, 19928 (2016).
159. Van Der Horst, D. J. & Rodenburg, K. W. Lipoprotein assembly and function in an evolutionary perspective. *BioMol Concepts* **1**, 165–183 (2010).
160. Majerowicz, D. & Gondim, K. C. In: Recent Trends in Gene Expression Insect Lipid Metabolism: Insights Into Gene Expression Regulation. *Recent Trends in Gene Expression*. Nova Science Publishers. 147-190, (2013).
161. Hou, Y. *et al.* Temporal Coordination of Carbohydrate Metabolism during Mosquito Reproduction. *PLoS genetics*, **11(7)**, e1005309 (2015).
162. Dhawan, R. *et al.* Apolipoprotein-III acts as a positive regulator of Plasmodium development in *Anopheles stephensi*. *Front. Physiol.* **8**, 185 (2017).
163. Fruttero, L. L., Demartini, D. R., Rubiolo, E. R., Carlini, C. R. & Canavoso, L. E.  $\beta$ -chain of ATP synthase as a lipophorin binding protein and its role in lipid transfer in the midgut of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **52**, 1–12 (2014).
164. Behmer, S. T. & Nes, W. D. Insect Sterol Nutrition and Physiology: A Global Overview. *Adv. Insect Physiol.* **31**, 1-72, 2003.
165. Huang, X., Warren, J. T. & Gilbert, L. I. New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *Journal of Genetics and Genomics*, **35(1)**, 1-10 (2008).
166. Dermauw, W. & Van Leeuwen, T. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **45**, 89-110 (2014).
167. Roy, S., Saha, T. T., Zou, Z. & Raikhel, A. S. Regulatory Pathways Controlling Female Insect Reproduction. *Annu. Rev. Entomol.* **63**, 489–511 (2018).
168. Perner, J. *et al.* RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus*

- ticks. *Scientific reports*. 6, 36695 (2016).
169. Wirtz, K. W. A. Phospholipid transfer proteins in perspective. *FEBS Letters*. **580(23)**, 5436-5441 (2006).
170. Gibellini, F. & Smith, T. K. The Kennedy pathway-de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* **62(6)**, 414-428. (2010).
171. Boudko, D. Y. Molecular basis of essential amino acid transport from studies of insect nutrient amino acid transporters of the SLC6 family (NAT-SLC6). *J. Insect Physiol.* **58**, 433-449 (2012).
172. Carpenter, V. K. *et al.* SLC7 amino acid transporters of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and their role in fat body TOR signaling and reproduction. *J. Insect Physiol.* **58**, 513-522 (2012).
173. Patrick, M. L., Aimanova, K., Sanders, H. R. & Gill, S. S. P-type Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and V-type H<sup>+</sup>-ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* **209**, 4638-4651 (2006).
174. Pacey, E. K. & O'Donnell, M. J. Transport of H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across the posterior midgut of blood-fed mosquitoes (*Aedes aegypti*). *J. Insect Physiol.* **61**, 42-50 (2014).
175. Dixon, D. P., Van Ekeris, L. & Linser, P. J. Characterization of carbonic anhydrase 9 in the alimentary canal of *Aedes aegypti* and its relationship to homologous mosquito carbonic anhydrases. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14(2)**, 213 (2017).
176. Noriega, F. G., Colonna, A. E. & Wells, M. Increase in the size of the amino acid pool is sufficient to activate translation of early trypsin mRNA in *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 243-247 (1999).
177. Borovsky, D. Biosynthesis and Control of Mosquito Gut Proteases. *IUBMB life*, **55(8)**, 435-441.
178. Wiegmann, B. M. *et al.* Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108(14)**, 5690-5695 (2011).

179. Mostovski, M. B. Hematophagous Insects in the Fossil Record Palaeartic scuttle flies (Diptera: Phoridae) View project Afrotropical scuttle flies (Diptera: Phoridae) View project. *Translated from Paleontologicheskii Zhurnal* **37**, (2003).
180. Reidenbach, K. R. *et al.* Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. **9(1)**, 298 (2009).
181. Cowley, M. & Oakey, R. J. Transposable elements re-wire and fine-tune the transcriptome. *PLoS genetics*, **9 (1)**, e1003234 (2013).
182. Minard, G., Mavingui, P., & Moro, C. V. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & vectors*, **6(1)**, 146. (2013).
183. Moraes, C. D. S., Diaz-Albiter, H. M., Faria, M. D. V., Sant'Anna, M. R., Dillon, R. J., & Genta, F. A.. Expression pattern of glycoside hydrolase genes in *Lutzomyia longipalpis* reveals key enzymes involved in larval digestion. *Frontiers in physiology*, **5**, 276 (2014).
184. Porretta, D., Mastrantonio, V., Crasta, G., Bellini, R., Comandatore, F., Rossi, P., ... & Urbanelli, S. (2016). Intra-instar larval cannibalism in *Anopheles gambiae* (ss.) and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, **9(1)**, 566.

## ANEXO

### Primers utilizados na reação qRT-PCR

<b>Contigs</b>	<b>Proteína</b>	<b>Foward</b>	<b>Reverse</b>
Tt-28334_FR3_60-659	Alfa-amilase	CAGCTCATTTGCTGGTTTCA	CTTGCTGGCTGTTTGTTCAG
Tt-51617_FR3_36-285	Ferritina	TTGCTGCTCTCCTCCGTTTT	CCCAGGCTTTGTCCGAGATT
TxSigpSigP-30727_FR4_217-393	Peritrofina 1	CGATCCGTTGATTGCCGTTT	CCACTAGCTGACCCCAACTG
Tt-51443_FR6_55-439	Metionina aminopeptidase	AATACCGGATATGAGGCCGC	ATCGCCATGAAATCCACGGT
Tt-62962_FR4_136-382	Tripsina	CACTGGTTTGCCCGATACCT	ATACCTTCTTGTCCGCAGCC
Tt-25992_FR1_55-581	Catalase	TCGCCAACCATCTGAGCAAT	CTTCGGACAGTTGACGTCCA
TxSigpSigP-65655_FR5_25-87	Cecropina A2	GCTGAAGAACTCGGCAAGA	CCGATCGCTTTATAACCAGC
Tt-62593_FR5_49-217	Superóxido dismutase	CTGAAAGCAGGCAACCATGG	TTGCCGTGTGGGTTGAAATG
Tt-39953_FR5_13-155	Triacilglicerol lipase	ATCTGCCGATTTCTATCCGA	ACGAACAATTTCCAGGAACG
<b>Endógeno</b>			
TxSigpSigP-55608_FR2_4-326_1	40S Proteína ribossomal S7	CGGAGGTTTCTGAGCTGGAA	CGCAGATGGATTGGTGACCT

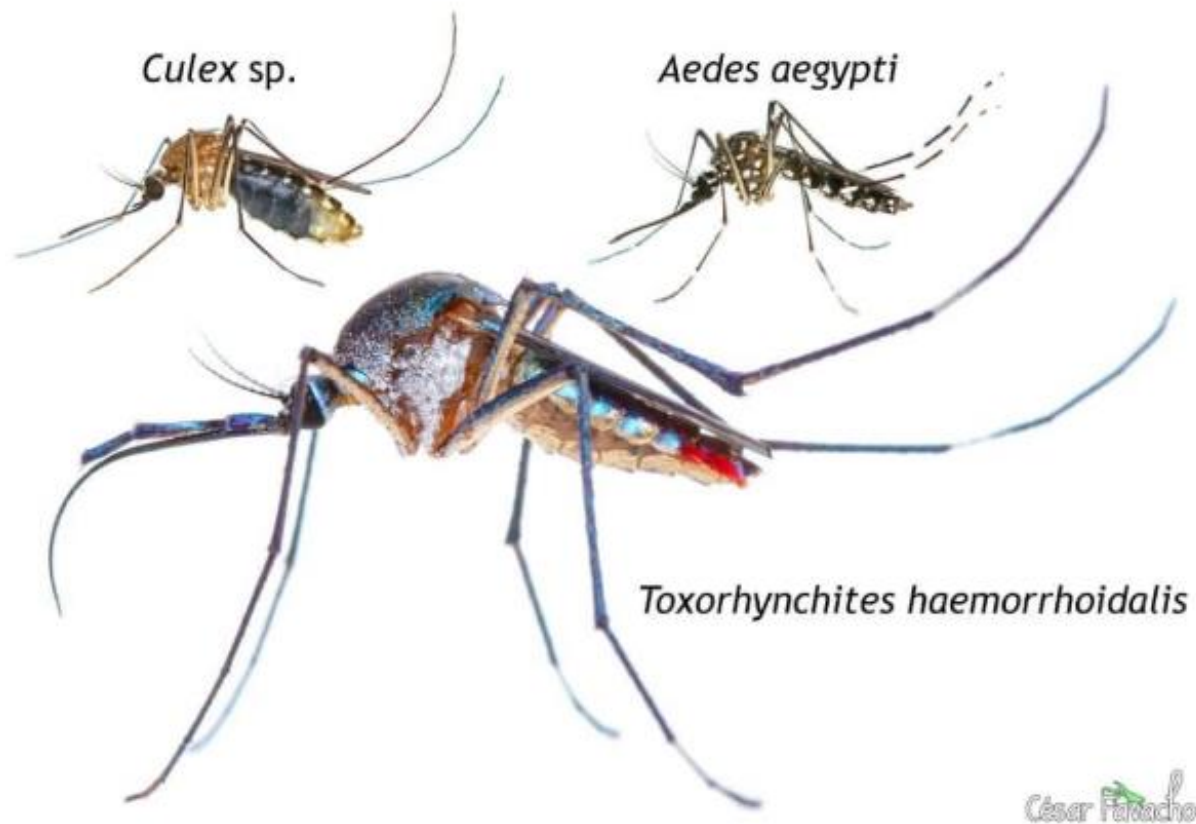


Ilustração das fêmeas dos culicídeos *Culex sp.*, *Ae. aegypti* e *T. haemorrhoidalis* onde é possível observar a diferença de tamanho entre *Toxorhynchites* e os demais mosquitos, razão pela qual ele recebeu o nome de mosquito elefante. Fonte: Cesar Favacho