

ÍTALO MENDES DELAZARI

**MESTRE DAS MARIONETES: ESTUDO DO MECANISMO DE
MANIPULAÇÃO COMPORTAMENTAL DE ARANHAS POR PARASITAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Thiago Gechel Kloss

Coorientador: Luiz Marcelo Ribeiro Tomé

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

D343m
2024
Delazari, Ítalo Mendes, 1996-
Mestre das marionetes: estudo do mecanismo de
manipulação comportamental de aranhas por parasitas / Ítalo
Mendes Delazari. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (90 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Thiago Gechel Kloss.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.450>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Aranhas - Parasitos. 2. Aranhas - Comportamento.
3. Ecdise. 4. Hormônios de muda. 5. Regulação da expressão
gênica. I. Kloss, Thiago Gechel, 1987-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Ecologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.44


ÍTALO MENDES DELAZARI

**MESTRE DAS MARIONETES: ESTUDO DO MECANISMO DE
MANIPULAÇÃO COMPORTAMENTAL DE ARANHAS POR PARASITAS**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **ÍTALO MENDES DELAZARI**
Data: 01/08/2024 20:42:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ítalo Mendes Delazari
Autor

Documento assinado digitalmente
 **THIAGO GEHEL KLOSS**
Data: 02/08/2024 09:14:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Thiago Gechel Kloss
Orientador

À todas as pessoas que levo no coração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valéria e Gilmar, que com todo o apoio que sempre me deram possibilitaram a realização deste trabalho e todas as realizações da minha vida até aqui. Nada que eu faça ou fale seria capaz de retribuir isso. Sem eles nada seria possível. Meus pilares.

À minha namorada e grande amor, Dhayane, que em todo esse tempo sempre esteve comigo, me apoiando e ajudando em todos momentos, em cada comemoração e em cada surto. Foi quem me fez apaixonar pela Biologia. Sem ela jamais estaria aqui. Só tenho a agradecer!

Aos meus avós Laura e Paulo e à minha tia Eloisa, que em todos os momentos me auxiliaram de várias formas e ajudaram a me guiar até aqui. Muito obrigado por tudo!

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e possibilitar um grande aprendizado ao longo desse tempo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro que permitiu este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, essencial para a sobrevivência dos pós-graduandos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.675248/2022-00.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, por todas as oportunidades vivências, aprendizados e pessoas que hoje me inspiram.

Ao Laboratório de Ecologia e Comportamento, pelas pessoas incríveis, por todo o auxílio e pela oportunidade de realizar esse trabalho, além da leveza que conseguimos manter no dia a dia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Gechel Kloss, que nesse tempo de trabalho juntos e momentos de descontração se tornou uma grande inspiração e referência para mim, tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Agradeço por todo aprendizado, pelo apoio, pelas oportunidades e pela ótima orientação que foi essencial para que chegasse até aqui e que levarei para toda a vida.

Ao meu coorientador, Dr. Luiz Marcelo Ribeiro Tomé, e à Dra. Thairine Mendes, por todas as orientações, pelo auxílio nos experimentos e análises e pelo aprendizado em

uma área que até então era quase que completamente nova para mim. E mesmo com todas as dores de cabeça e imprevistos durante o processo valeu muito a experiência.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos da UFMG, pela parceria que possibilitou a realização de etapas essenciais deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Bertram Brenig, do Dept. of Molecular Biology of Livestock da Georg August University Göttingen pela parceria que possibilitou a realização de etapas importantes deste trabalho.

À meu amigo e colega de trabalho, Alexander, pelas discussões, pelas trocas de ideias, revisões e toda a ajuda que me forneceu até aqui.

À todos os meus amigos e colegas que estiveram juntos comigo, pelas conversas (as importantes e as “jogadas fora”), pelas descontrações e momentos que passamos juntos que sem eles seria impossível manter a sanidade, pelo apoio e ensinamentos da vida. Em especial, agradeço a todo meu moto clube Apparatus cujos membros, mesmo não citando diretamente aqui, considero como irmãos e são de grande inspiração para mim. Aos meus amigos músicos, que também não consigo citar todos, por cada som e cada música que pudemos tocar juntos, que apesar de todo o perrengue que passamos é uma das coisas que mais me ajuda a levar a vida.

Não sou muito bom com agradecimentos e palavras bonitas e sei que posso ter deixado de citar muitas pessoas e falar coisas que gostaria. Jamais será possível agradecer a todos como deveria. Mesmo assim agradeço imensamente a todas as pessoas que mesmo não citando nominalmente aqui foram importantes e possibilitaram, de alguma forma, direta ou indiretamente, a realização deste trabalho e a conclusão desta etapa da minha vida.

“Não considere nenhuma prática como imutável. Mude e esteja pronto a mudar novamente. Não aceite verdade eterna. Experimente.”.

(B. F. Skinner)

RESUMO

DELAZARI, Ítalo Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Mestre das marionetes: estudo do mecanismo de manipulação comportamental de aranhas por parasitas.** Orientador: Thiago Gechel Kloss. Coorientador: Luiz Marcelo Ribeiro Tomé.

Parasitas com estratégias de transmissão complexas podem alterar o comportamento dos seus hospedeiros, favorecendo sua aptidão. Contudo, sabemos pouco sobre os mecanismos envolvidos nesse processo e evidências recentes sugerem que os parasitas podem utilizar vias pré-programadas no hospedeiro. Aranhas são parasitadas por diferentes organismos, como fungos, dípteros e vespas. Alguns desses inimigos naturais são capazes de alterar o comportamento das aranhas, caracterizado pela construção de teias modificadas antes de sua morte, o que pode fornecer segurança e estabilidade para seu desenvolvimento até a fase de dispersão. Adicionalmente, as teias modificadas construídas por aranhas hospedeiras durante o desenvolvimento de diferentes parasitas frequentemente se assemelham às suas teias construídas durante a ecdise. Além disso, a construção das teias modificadas por algumas aranhas parasitadas por vespas *Polysphinctine* (Ichneumonidae) parece ocorrer devido a ativação anacrônica do processo de ecdise nas aranhas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se parasitas filogeneticamente distantes apresentam uma convergência no mecanismo de manipulação de suas aranhas hospedeira, através da ativação anacrônica da ecdise e produção de ecdisteroides no próprio hospedeiro, assim como analisar a expressão gênica de aranhas parasitas por vespas *Polysphinctine*. Dessa forma, no primeiro capítulo foi conduzida uma revisão sistemática de literatura, examinando as evidências que sustentam essa hipótese para três grupos de parasitas de aranhas: vespas, dípteros e fungos. Encontramos diversas evidências que sugerem que os parasitas estudados possam utilizar o mecanismo de ecdise das aranhas em benefício próprio. Além disso, propomos duas vias principais de ativação desse mecanismo: por meio do sistema neuro-imune das aranhas e pela interação de micróbios presentes nos parasitas com os hospedeiros. Por fim, identificamos possíveis ecdisteroides que possam atuar no processo de manipulação e traçamos direcionamentos para futuros trabalhos que procurem testar essa hipótese. No segundo capítulo, investigamos possíveis diferenças na expressão gênica entre aranhas não parasitadas e parasitadas com o comportamento alterado. Para isso realizamos análises transcritômicas utilizando aranhas *Trichonephila clavipes* (Araneidae) não parasitadas e parasitadas pela

vespa *Hymenoepimecis bicolor* (Ichneumonidae). Também analisamos a expressão dos genes relacionados a rota da ecdise nas aranhas (*Halloween genes*). Obtivemos 1421 genes expressos diferencialmente entre aranhas parasitadas com o comportamento alterado e aranhas não parasitadas. Dentre eles, estão genes relacionados com o sistema nervoso, imune e motor. Destacamos os 50 genes com maior diferença na expressão e identificamos alguns deles como potenciais responsáveis pelo comportamento alterado nas aranhas, como os codificadores da Sialina e da Neprilisina-2, que agem no sistema nervoso. Contudo, os genes relacionados à rota da ecdise não apresentaram diferenças entre as aranhas e tiveram baixa regulação em geral. Isso sugere que o mecanismo da ecdise pode não estar diretamente relacionado com a modificação comportamental das aranhas ou que ele seja ativado em etapas anteriores do parasitismo. O mecanismo de manipulação comportamental de aranhas pelas vespas parasitas parece ser muito mais complexo do que esperávamos e pode envolver a ativação de múltiplos sistemas do hospedeiro. Com uma abordagem inédita no estudo de interações vespa-aranha, este trabalho fornece uma nova perspectiva para entender quais os mecanismos envolvidos nas interações envolvendo manipulação.

Palavras-chave: Aranhas - Parasitos; Aranhas - Comportamento; Ecdise; Hormônios de muda; Regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

DELAZARI, Ítalo Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2024. **Master of puppets: study of the mechanism of behavioral manipulation of spiders by parasites.** Adviser: Thiago Gechel Kloss. Co-adviser: Luiz Marcelo Ribeiro Tomé.

Parasites with complex transmission strategies can alter their hosts' behavior, favoring their fitness. However, we know little about the mechanisms involved in this process, but evidence suggests that parasites can use pre-programmed pathways in the host. Spiders are parasitized by different organisms, such as fungi, dipterans and wasps. Some of these natural enemies are capable of altering the behavior of spiders, characterized by the construction of modified webs before their death, which can provide security and stability for their development until the dispersal phase. Additionally, the modified webs built by host spiders during the development of different parasites often resemble their webs built during ecdysis. Furthermore, the construction of modified webs by some spiders parasitized by Polysphinctine wasps (Ichneumonidae) appears to occur due to the anachronistic activation of the ecdysis process in spiders. Therefore, the objective of this study was to evaluate whether phylogenetically distant parasites present a convergence in the manipulation mechanism of their host spiders, through the anachronistic activation of ecdysis and production of ecdysteroids in the host itself, as well as to analyze the gene expression of spiders parasitized by Polysphinctine wasps. Hence, in the first chapter a systematic literature review was conducted, examining the evidence that supports this hypothesis for three groups of spider parasites: wasps, dipterans and fungi. We found several pieces of evidence that suggest that the parasites studied may use the spiders' ecdysis mechanism to their own benefit. Furthermore, we propose two main pathways for activating this mechanism: through the neuroimmune system of spiders and through the interaction of microbes present in parasites with hosts. Finally, we identified possible ecdysteroids that could act in the manipulation process and outlined directions for future work that seeks to test this hypothesis. In the second chapter, we investigated possible differences in gene expression between non-parasitized and parasitized spiders with altered behavior. To do this, we performed transcriptomic analyzes using non-parasitized spiders *Trichonephila clavipes* (Araneidae) and those parasitized by the wasp *Hymenoepimecis bicolor* (Ichneumonidae). We also analyzed the expression of genes related to the ecdysis pathway in spiders (Halloween genes). We obtained 1421 genes differentially expressed between parasitized spiders with altered behavior and non-

parasitized spiders. Among them are genes related to the nervous, immune and motor systems. We highlighted the 50 genes with the greatest difference in expression and identified some of them as potentially responsible for altered behavior in spiders, such as those encoding Sialin and Neprilysin-2, which act in the nervous system. However, genes related to the ecdysis pathway showed no differences between spiders and were downregulated in general. This suggests that the ecdysis mechanism is not directly related to the behavioral modification of spiders or that it is activated in previous stages of parasitism. The mechanism of behavioral manipulation of spiders by parasitic wasps appears to be much more complex than we expected and may involve multiple host systems. With an unprecedented approach to the study of wasp-spider interactions, this work provides a new perspective to understand the mechanisms involved in interactions involving manipulation.

Keywords: Spiders - Parasites; Spiders - Behavior; Ecdysis; Molting hormones; Regulation of gene expression.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
CAPÍTULO 1	16
Masters of puppets: could ecdysteroids route be a common pathway for behavioral manipulation in spiders by different parasites?.....	17
Abstract.....	18
1. Introduction	19
2. Methods	21
3. An overview of the interactions between spiders and the different groups of natural enemies	22
3.1. Parasitoid wasps.....	22
3.2. Diptera.....	24
3.3. Arthropod pathogenic fungi.....	25
4. The potential convergence of strategies among different spider parasites.....	27
5. Synthesis and functions of ecdysteroids in spiders and other arthropods	30
6. How could spider parasites activate molting behaviors to manipulate their host	31
6.1. Neuro-immune system: resource consumption and stress induction	31
6.2. Parasitic microbes	33
7. What are the possible ecdysteroids involved in the process of behavioral manipulation of spiders?	36
8. Conclusions and future directions.....	37
Reference.....	39
Supplementary Information	45
References	47
CAPÍTULO 2.....	60
Modificação comportamental de aranhas por vespas parasitoides: sequenciamento do transcrito e análise de expressão gênica diferencial (DGE) dos hospedeiros.....	61
Resumo	62
Introdução.....	63
Materiais e métodos	65
Espécies de estudo.....	65
Áreas de coleta.....	66

Coleta e preparação das amostras	66
Resultados	69
Discussão	76
Referências	81
Material Suplementar	86
CONCLUSÕES GERAIS	88
REFERÊNCIAS	89

INTRODUÇÃO GERAL

As interações do tipo parasita-hospedeiro são amplamente distribuídas no planeta e constituem uma extensa parte da história evolutiva dos seres vivos. O longo processo evolutivo gerou, em alguns casos, maneiras complexas e sofisticadas de disputa por recursos. De um lado, o parasita para consumir os recursos do hospedeiro e, do outro lado, o hospedeiro para se proteger dos danos gerados pelo parasitismo. Dentro dessa disputa, algumas estratégias são favorecidas, muitas vezes complexas e elaboradas. Nesse contexto, alguns parasitas desenvolveram a capacidade de provocar alterações fenotípicas em seus hospedeiros, podendo ser físicas, fisiológicas ou comportamentais. Essas alterações podem ser apenas um subproduto ou resposta do hospedeiro devido a presença ou ação direta do parasita (Thomas *et al.*, 2010).

Quando as alterações fenotípicas no hospedeiro ocorrem em seu comportamento e beneficiam o parasita de alguma maneira, consideramos isso uma manipulação comportamental do hospedeiro pelo parasita (Moore, 2002; Poulin, 2010). Além disso, o comportamento alterado exibido pelo hospedeiro também pode ser considerado como um “fenótipo estendido” do parasita expresso através do fenótipo do hospedeiro (Dawkins, 1982). Então, como o parasita consegue alterar o comportamento do hospedeiro a seu favor? Esta é a questão central deste trabalho. Isso porque apesar das muitas possíveis respostas para essa pergunta, no geral, os mecanismos proximais de manipulação ainda não são bem compreendidos.

Contudo, algumas evidências nos sugerem certas pistas. Por exemplo, é possível que os parasitas utilizem como “fatores de manipulação”, alguns mecanismos pré-programados do próprio hospedeiro e explorem vias já conhecidas, como o sistema imune e o sistema nervoso central dos hospedeiros. Outras evidências indicam que diferentes parasitas que infectam um mesmo grupo de hospedeiros possam explorar mecanismos semelhantes, já que os fenótipos comportamentais exibidos por seus hospedeiros são muito semelhantes entre si. É o que parece ocorrer com duas espécies de amphípodes gammarídeos infectados pelo trematoda *Microphallus papillorobustus* e pelo acanthocephala *Polymorphus minutus*, que ativam os mesmos conjuntos de proteínas relacionadas a conexões neuroimunes para fazer com que seus hospedeiros subam até a superfície da água e fiquem mais susceptíveis a predação por aves (hospedeiros definitivos dos parasitas) (Ponton *et al.*, 2006). Esse fenômeno mostra que embora possam existir múltiplas respostas para a questão de como os parasitas alteram o

comportamento de seus hospedeiros em seu benefício, em alguns casos diferentes parasitas parecem utilizar o mesmo mecanismo.

Dentro desse contexto, aranhas são alvos de diferentes parasitas que podem causar alterações no seu comportamento. Dentre esses parasitas estão: fungos, dípteros, nematomorfos e vespas (Durkin *et al.*, 2021). A maior parte das alterações comportamentais observadas em aranhas infectadas por alguns desses grupos de parasitas consiste na construção de teias modificadas que podem oferecer algum tipo de benefício aos parasitas. Além disso, algumas espécies de aranhas apresentam comportamentos e arquiteturas de teias modificadas que lembram seus comportamentos pré-ecdise (Eberhard; Gonzaga, 2019). Outro ponto é que a construção de teias modificadas por algumas aranhas parasitadas por vespas Ichneumonidae parece estar relacionada a ativação anacrônica da ecdise, devido a um aumento observado nos níveis do hormônio ecdisona em aranhas com o comportamento alterado (Kloss *et al.*, 2017). Assim, possivelmente há uma relação entre os comportamentos alterados das aranhas infectadas e a ativação da ecdise nas aranhas causadas pela presença dos parasitas. Entretanto, investigações mais aprofundadas a respeito do mecanismo de manipulação, como análises moleculares, ainda não foram realizadas e podem ser a chave para compreender como os parasitas manipulam o comportamento das aranhas.

Neste trabalho sugerimos uma hipótese central, a de que diferentes parasitas de aranhas apresentam uma convergência no mecanismo para manipular o comportamento de seus hospedeiros. Mais precisamente, através da ativação anacrônica do mecanismo pré-programado da ecdise das aranhas, possivelmente induzida pela produção de ecdisteroides no organismo dos hospedeiros. Nesse sentido, este trabalho foi dividido em dois capítulos com duas diferentes abordagens. O primeiro capítulo é uma revisão sistemática de literatura onde investigamos a possibilidade de uma convergência no mecanismo de manipulação entre três grupos de parasitas, vespas (Ichneumonidae e Pompilidae), dípteros e fungos. Através dessa revisão buscamos evidências na literatura que possam sustentar essa hipótese. Apresentamos também um novo traço do fenótipo estendido de fungos que parasitam aranhas. Além disso, sugerimos as possíveis vias de ativação desse mecanismo, bem como direcionamentos para trabalhos que venham testar essa hipótese. No segundo capítulo, com uma abordagem mais prática, buscamos verificar as alterações que ocorrem na expressão gênica de aranhas parasitadas por vespas *Polysphincta* (Ichneumonidae). Investigamos também a expressão dos genes relacionados a rota da ecdise, para verificar se são realmente ativados nas aranhas

parasitadas. Para isso, realizamos análises de transcriptômica com aranhas *Trichonephila clavipes* com o comportamento alterado parasitadas por larvas da vespa *Hymenoepimecis bicolor* e não parasitadas com o comportamento normal. Os resultados obtidos pelas análises mostram que diversos genes são regulados diferentemente em aranhas parasitadas com o comportamento alterado e aranhas não parasitadas. Dentre eles, identificamos cerca de 13 genes potencialmente envolvidos na manipulação comportamental que se relacionam com diversos sistemas fisiológicos das aranhas. Assim, os resultados que apresentamos trazem uma nova perspectiva para o entendimento de como parasitas manipulam o comportamento de seus hospedeiros em seu benefício. Esses mecanismos podem ser muito mais complexos e elaborados do que esperávamos, envolvendo alterações em diferentes sistemas dos hospedeiros que geram o fenótipo estendido do parasita.

CAPÍTULO 1

Masters of puppets: could ecdysteroids route be a common pathway for behavioral manipulation in spiders by different parasites?

Paper to be submitted to Biological Journal of the Linnean Society

Masters of puppets: could ecdysteroids route be a common pathway for behavioral manipulation in spiders by different parasites?

Ítalo M. Delazari¹, Thairine Mendes-Pereira², Stephen J. Saltamachia³, Thiago G. Kloss^{1*}

¹ Laboratory of Ecology and Behavior, Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brazil.

² Laboratory of Insect-Microbe Interactions, Department of Entomology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, Brazil

³ Department of Biology, University of Louisiana at Lafayette, 104 East University Avenue, Lafayette, Louisiana 70504.

ORCID: [IMD, 0000-0002-8413-4705](https://orcid.org/0000-0002-8413-4705); [TMP, 0000-0002-3707-9790](https://orcid.org/0000-0002-3707-9790); [SJS, 0000-0003-3336-6247](https://orcid.org/0000-0003-3336-6247); [TGK, 0000-0003-0958-1748](https://orcid.org/0000-0003-0958-1748)

*Author for correspondence: Thiago G. Kloss, Department of General Biology, Federal University of Viçosa. E-mail: thiago.kloss@ufv.br

Abstract

Certain parasites improve their fitness by manipulating their host's behavior. Some evidences suggests that parasites exploit innate pathways in the host to manipulate their behavior. Furthermore, phylogenetically unrelated parasites can generate similar behavioral changes in hosts from the same taxonomic group. Spiders are host to several parasites that appear to induce behavioral changes, such as building of modified webs which may benefit the parasites. Additionally, some observations on spiders parasitized by Ichneumonidae wasps suggest that the construction of modified webs may merely be the result of the anachronistic activation of the innate ecdysis process. Considering that different parasites may use similar manipulation pathways, we review and examine evidence in the literature that phylogenetically distant parasites (wasps, dipterans, and fungi) may converge on the manipulation mechanism of host spiders through the anachronistic activation of ecdysis. Also, we suggest that webs built by fungus-infected spiders represent an extended phenotype of these parasites. We conclude that the strategy of behavioral manipulation through activation of innate ecdysis in hosts may have converged in the different spider parasites, which have been favored over evolutionary time. Therefore, we propose possible pathways for activating this mechanism, as well as provisions for future investigations to test these hypotheses.

Keywords – Behavioral manipulation; Host manipulation; Molting behavior; Ecdysteroids; Parasites; Evolutionary convergence; Convergent mechanisms.

1. Introduction

Some parasites are capable of altering the phenotype of their hosts, but most of the mechanisms used by the parasites are still not entirely clear (Herbison, 2017). The phenotypic changes induced by parasites can be characterized by physical, physiological or behavioral modifications (Moore, 2002; Poulin, 2010). When changes in host behavior increase parasite fitness, this phenomenon is considered an adaptive behavioral manipulation (Poulin, 2010). In this context, the altered host behavior under the influence of the parasite can also be considered an “extended phenotype” of the parasite (Dawkins, 1982), that is, the expression of parasite genes manifested in the infected host's behavioral phenotype (Libersat, *et al.*, 2018). Diverse groups of organisms, from viruses to arthropods, are capable of manipulating the behavior of their hosts (Thomas, *et al.*, 2010). The ways in which parasites manipulate the behavior of hosts can be divided into four types (Poulin, 2010): (I) trophic transmission, when the parasite alters the behavior of their intermediate host increasing the likelihood to be preyed by their final host; (II) spatial displacement, when the host moves to a location that facilitates the dispersion of the parasite; (III) vector manipulation, in which the parasite appears to induce an increase in vector foraging activity; and (IV) manipulation involving protection, when changing the host's behavior results in greater protection for the parasite, whether active protection or construction of structures that provide this protection.

Despite the few information on the mechanisms of host behavioral manipulation, existing evidence suggests that parasites mainly use the endocrine (induction of the production of certain hormones), immune (activation of the host's immune response in favor of the parasite), neural (direct action on the host's central nervous system or through neuromodulators) and genetic (through epigenetic mechanisms) pathways (Adamo, 2013). However, due to the interconnection of the host's physiological systems (Lafferty, Shaw, 2013), understanding the exact mechanism of manipulation is difficult, as several systems can be activated simultaneously (Adamo, *et al.*, 2016).

An important factor to understand the mechanism of behavioral manipulation is investigate hosts that are attacked by different parasites. It is known that some phylogenetically distant parasites present similar manipulation strategies on the same host species (Ponton, *et al.*, 2006; Mohan, Sinu, 2022). For example, the trematode *Microphallus papillorobustus* and the acanthocephalan *Polymorphus minutus*, which appear to induce changes in molecules related to immunoneural connections in their

gammarid hosts, *Gammarus insensibilis* and *Gammarus pulex*, by manipulating the behavior of crustaceans to forage on the surface of the water, making them more susceptible to predation by birds, the parasites' definitive hosts (Ponton, *et al.*, 2006). Therefore, investigating interactions between different groups of parasites that infect the same group of hosts can help understand stereotypical behaviors displayed by infected hosts. This similarity in altered behaviors may be related to the fact that hosts, especially those from the same taxonomic group, possibly by sharing the same physiological mechanisms, can generate similar selective pressures on parasites.

A possible convergence of behavioral manipulation strategies may occur with parasites that infect arthropods, which are attacked by different parasites capable of generating similar behaviors in their hosts. In this sense, spiders are the target of many different species of parasites and parasitoids, making this group an excellent model for evaluating generalizations in the manipulation mechanism. These hosts are attacked by nematodes, fungi, dipterans, and parasitoid wasps of the Polysphinctine clade (Ichneumonidae) (Durkin, *et al.*, 2021). The behavioral manipulation induced by parasitoid wasps has a wide record in the literature. The changes induced by this group of insects are characterized by the construction of modified webs, which are more resistant and can increase the survival chances of parasitoid pupae, which develop attached to these webs (Matsumoto, 2009; Kloss, *et al.*, 2016; Korenko, *et al.*, 2022). Some evidence suggests that the induction of behavioral changes by these parasitoids appears to be related to the anachronistic activation of the innate ecdysis mechanism (Kloss, *et al.*, 2017). These evidences are based on the similarity between modified and ecdysis webs, in addition to the fact that levels of ecdysteroids (hormones related to ecdysis) have also been observed in some spiders parasitized by wasps of the Polysphinctine clade (Kloss, *et al.*, 2017; Takasuka, *et al.*, 2015; Eberhard, Gonzaga, 2019). However, spiders infected by Pompilidae wasps, fungi, and dipterans also are prone to build silken structures before being killed by these natural enemies (Pekár, Lubin, 2020; Arruda, *et al.*, 2021; Benamú, *et al.*, 2020). Considering that the physiological systems responsible for ecdysis on spiders is characterized by more than one pathway and are activated in moments that requires protection, it is possible that different parasites can exploit the pre-programmed mechanism of ecdysis in spiders to benefit from the structures built by them before death.

Therefore, our objective was to discuss the possibility of the existence of a convergence in the manipulation mechanism induced by phylogenetically distinct spider parasites and parasitoids. Here, we suggest and discuss the possibility of the existence of a convergence of behavioral manipulation strategies based on the anachronistic activation of ecdysis. To evaluate this, the possibilities presented in this work were obtained through a systematic review of existing records in the literature (see Fig. S1) that may indicate this convergence of strategies. We focused on interactions in which parasitized spiders appear to build webs before dying, which involve three groups of parasites: Ichneumonidae and Pompilidae wasps, Diptera and fungi. We evaluated, through the descriptions and images presented in the studies found, evidence of the similarity between the behaviors exhibited by parasitized and non-parasitized spiders. We present the details of the interactions between spiders and each group of parasites, such as form of infection, parasite development and reported behaviors, as well as a discussion of the functioning and possible activation pathways of this mechanism, outlining directions for future works in this research area.

2. Methods

We carried out a systematic literature review following the PRISMA flow diagram (Page *et al.*, 2021). The searches were carried out using Scopus (Elsevier) and ISI Web of Knowledge (Clarivate) databases, searching for terms related to interactions with groups of parasites, altered and molting behaviors and possible mechanisms involved in manipulation. The terms utilized were: Acroceridae AND spider; Ascomycota AND spider; “behavioral manipulation” AND “molting web”; “behavioral manipulation” AND spider; Cordycipitaceae AND spider; ecdysis AND spider; ecdysone AND spider; entomopathogen AND spider; *Gibellula* AND spider; Hypocreales AND spider; Ichneumonidae AND spider; juvenile hormone AND spider; “molting web”; *Polysphincta* AND spider; Pompilidae AND spider; spider flies AND spider. No type of filter was used to search the databases. Some studies added by other sources were also included, such as websites, recommendations by third parties and citations found in works collected in database searches. The search for studies was carried out until middle February 2023. The publications found in each search were exported to files in RIS format and later uploaded to the tool for systematic reviews and meta-analyses Rayyan (<http://rayyan.qcri.org>).

3. An overview of the interactions between spiders and the different groups of natural enemies

As a result of the searches carried out in the databases, we obtained a total of 1471 studies and a further 85 obtained by other means. After screening, we considered 112 works resulting from the searches and 66 studies from those found by other means. Among those considered in this review, 70 studies contained descriptions of interactions between spiders and Ichneumonidae wasps; six contained descriptions of interactions between spiders and Pompilidae wasps; 15 contained descriptions of interactions between spiders and dipterans; and nine contained descriptions or just images of interactions between spiders and fungi. Furthermore, works obtained that contained studies on mechanisms of behavioral manipulation and those that provided relevant information on ecdysteroids and other possible pathways that could be used in manipulation were also considered in the review (see Figure S1). In the following sections, we analyze the information from the studies and explore potential convergence in the activation pathways of spider behavior manipulation mechanisms induced by different groups of parasites.

3.1. Parasitoid wasps

Parasitoid wasps are widely known for their ability to alter the behavior of their hosts spiders (Libersat, *et al.*, 2009). Two families of ectoparasitoid wasps are capable of inducing behavioral changes in spiders, Ichneumonidae (“Darwin wasps”) and Pompilidae (“spider wasps”) (Eberhard, 2000; El-Hennawy, 1996). Species of Ichneumonidae that manipulate behavior belong to a group of the subfamily Pimplinae, the genus group *Polysphincta* (hereafter Polysphinctine) (Gauld, Dubois, 2006; Takasuka, Broad, 2024). The group has 294 species (Takasuka, Broad, 2024) that are exclusively ectoparasitoids of spiders. In general, parasitism by these wasps begins with the adult female attacking the spider and paralyzing it by injecting a substance generally in the mouth or between the spider's thighs (Kloss, *et al.*, 2016; Gonzaga, *et al.*, 2015; Gaione-Costa, *et al.*, 2022; Eberhard, 2001). Subsequently, the wasp deposits an egg on the back of the spider's abdomen, from where a larva hatches and feeds on the host's hemolymph through small perforations caused by its mouthparts in the spider's integument (Eberhard, 2001). The behavioral change observed in the host occurs in the last instar of larval development of the wasp (Eberhard, 2010). At that moment, the spider builds a modified web, called a “cocoon web” (Eberhard, 2000). In general, the cocoon

web is more reinforced (*e.g.* fewer radii, greater number of reinforced radii and addition of v-radii) and does not have prey capture structures (*e.g.* sticky spirals). After building the modified web, the wasp larva kills the host spider and completely consumes it. Then, the larva builds its cocoon attached to the strands of the modified web or inside the web shelter that was used by the spider (Eberhard, 2000; Gonzaga, *et al.*, 2015; Kloss, *et al.*, 2018). Furthermore, variations of modified webs may exist according to the spider species, such as funnel-shaped webs (Matsumoto, 2009), complex three-dimensional structures (Eberhard, 2010), total suppression of the web threads, leaving only the leaf shelter and the main thread that connects it to vegetation (Kloss, *et al.*, 2018) or adding threads that reinforce the main thread that holds the shelter (Kloss, *et al.*, 2024).

Although there are exceptions (Eberhard, Gonzaga, 2019), cocoon webs are often described to closely resemble webs normally constructed by spiders during periods of vulnerability, such as during ecdysis (Takasuka, *et al.*, 2015; Kloss, *et al.*, 2017; Eberhard, Gonzaga, 2019) (Fig. 1a), hibernation or during reproductive periods (Korenko, Pekár, 2011). Some of the published studies are of main relevance in demonstrating this similarity, quantifying the structures of both webs in detail, or even providing good visual descriptions through photos (Korenko, *et al.*, 2022; Kloss, *et al.*, 2017; Takasuka, *et al.*, 2015; Eberhard, Gonzaga, 2019; Korenko, Pekár, 2011). However, one of these studies in particular showed that the construction of cocoon webs in two species of *Cyclosa* spiders parasitized by wasps of the genus *Polysphincta* is related to increased levels of 20-OH-ecdysone (20E), a hormone active in the ecdysis process (Kloss, *et al.*, 2017). This is important evidence that the manipulation mechanism used by Ichneumonidae wasps is based on the activation of innate host behaviors.

Pompilidae koinobionts wasps have a wide variety of host spiders, mainly cursorial, such as tarantulas and wolf spiders (El-Hennawy, 1996; Pollard, 1982; Da Silva Souza, *et al.*, 2015). Parasitism within this group frequently involves the wasp launching a direct attack on the host spider. The spider is rendered immobile through the injection of a paralyzing substance controlled by the wasp (Benamú, *et al.*, 2020; El-Hennawy, 1996; Da Silva Souza, *et al.*, 2015). Then, the wasp lays an egg in the spider's abdomen. Subsequently, a larva hatches from the egg and consumes the host's hemolymph until it kills the host spider. Finally, the larva proceeds to construct a cocoon, where it undergoes developing during the pupal stage (El-Hennawy, 1996; Da Silva Souza, *et al.*, 2015). There is little information about the ability of wasps from the Pompilidae family to

manipulate the behavior of spiders, which generally consist of paralyzing the host's motor functions (in the case of idiobiont wasps) while the larva feeds on its tissues (Benamú, *et al.*, 2020; El-Hennawy, 1996; Pollard, 1982; Gabellone, *et al.*, 2020). However, spiders that continue their activities freely after the wasp attack may present some changes in behavior shortly before their death and formation of the parasitoid cocoon (Benamú, *et al.*, 2020; El-Hennawy, 1996), as occurs with some Lycosidae spiders parasitized by *Paracyphononyx* and *Minagenia* wasps (Benamú, *et al.*, 2020). In these cases, the spiders' altered behavior consists of the construction of a dense tangle of silk, in which the wasp larva finishes consuming the spider and constructs its pupa (Fig. 1b) (Benamú, *et al.*, 2020; El-Hennawy, 1996). However, none of the studies available has investigated the mechanisms behind these behaviors.

3.2. Diptera

Some dipteran species are commonly associated with spider, called “spider flies”, mainly from the Acroceridae family (Gillung, Borkent, 2017; Sýkora, *et al.*, 2022). This family of flies are endoparasitoids of several families of spiders, whether adults or eggs (Cady, *et al.*, 1993). Infection by these parasites often appears to occur indirectly, because the parasitoid lays its eggs in the soil or in places close to where its host spiders reside and does not attack them directly (Sýkora, *et al.*, 2022; Nielsen, *et al.*, 1999). When the spider comes into contact with this area, the deposited egg on the substrate adheres to the spider's body (Sýkora, *et al.*, 2022; Nielsen, *et al.*, 1999). A larva then hatches from this egg, which pierces the spider's cuticle and feeds on their hemolymph (Nielsen, *et al.*, 1999). After its first ecdysis, the larva expands the opening created previously and enters the spider's abdomen, where it will develop by feeding on the host's hemolymph and tissues (Sýkora, *et al.*, 2022; Nielsen, *et al.*, 1999; Cady, *et al.*, 1993). Upon reaching the prepupal stage, the fly larva emerges from the host and finishes consuming its internal tissues, resulting in the death of the spider (Sýkora, *et al.*, 2022; Nielsen, *et al.*, 1999; Cady, *et al.*, 1993; Gillung, Borkent, 2017).

There is still no consensus on a manipulation of spider behavior by dipteran Acroceridae, but some behavioral changes are usually reported (Sýkora, *et al.*, 2022). Besides being an endoparasitoid, several changes in infected spiders occur very close to the emergence of the parasitoid larvae, which makes it difficult to identify infected individuals and the hosts of these parasitoids in order to describe them more accurately

(Sýkora, *et al.*, 2022; Cady, *et al.*, 1993; Gillung, Borkent, 2017). Such changes in host spider behavior typically include spasms, disorientation when walking, and suppression of feeding some time before death (Cady, *et al.*, 1993). However, some records (n = 12) also describe the construction of a web and the adoption of a “molting posture” in some spiders from the families Agelenidae (Cady, *et al.*, 1993), Araneidae (Gillung, Borkent, 2017), Philodromidae (Kehlmaier, *et al.*, 2012) and Theraphosidae (Barneche, *et al.*, 2013). Furthermore, a recent work shows the construction of a shelter by the spider *Pax islamita* (Zodariidae) parasitized by a larva of *Ogcodes* sp., before the emergence of the parasitoid (Fig. 1c) and where it generally carries out its ecdysis process (Pekár, Lubin, 2020). In all records, it was observed that the larva produced its cocoon within structures built by the hosts (Pekár, Lubin, 2020; Gillung, Borkent, 2017; Cady, *et al.*, 1993; Barneche, *et al.*, 2013), which could favor the survival of the parasitoid during the pupa stage.

3.3. Arthropod pathogenic fungi

Fungi from the family Cordycipitaceae represent a group of parasitic organisms well known for infecting and manipulating the behavior of their arthropod hosts (Durkin, *et al.*, 2021; Hughes, *et al.*, 2016; Mendes-Pereira, *et al.*, 2022). Within this family, four genera (*Akanthomyces*, *Torrubiella*, *Hevansia* and *Gibellula*) are dominantly or exclusively spider parasites (Durkin, *et al.*, 2021; Shrestha, *et al.*, 2019; Mendes-Pereira, *et al.*, 2023). However, the vast majority of studies focus on the description of these spider pathogens and their phylogenetic relationships and few of them have description of the host behavior (Durkin, *et al.*, 2021). The only reported evidence of induced behavioral changes in spiders is associated with fungi of the genus *Gibellula* (Arruda, *et al.*, 2021; Mendes-Pereira, *et al.*, 2023). The suggested change in host behavior occurs before host death and emergence of the fungus (Durkin, *et al.*, 2021). As recorded in entomopathogenic fungi (Hughes, *et al.*, 2016), there would be a spatial displacement of the host, which rises to a certain elevation of the soil and attaches itself to the abaxial part of leaves or other structures, such as branches, until it is killed by the fungus (Arruda, *et al.*, 2021; Mendes-Pereira, *et al.*, 2023; Durkin, *et al.*, 2021).

Additionally, we observed in the field that *Colonus* sp. (Salticidae) spiders parasitized by *Gibellula* sp. build a type of bed of silk threads on the abaxial surface of the leaves where they die, called a “death-bed” (Fig. 1d). Although this behavioral

characteristic was not shown in published works, we can often identify the “death-bed” from the images of interactions between fungi and host spiders (Shrestha, *et al.*, 2019; Mongkolsamrit, *et al.*, 2018; Johnson, *et al.*, 2009). For example, we found that the presence of these silk threads can be observed in *Macrophyes pacoti* (Anyphaenidae) infected by *Gibellula aurea* (Arruda, *et al.*, 2021; Mendes-Pereira, *et al.*, 2022), in different spiders parasitized by *Torrubiella* sp. (Johnson, *et al.*, 2009), in *Lyssomanes viridis* parasitized by *Gibellula* sp. (Durkin, *et al.*, 2021) and spiders parasitized by *Akanthomyces sulphureus* (Mongkolsamrit, *et al.*, 2018). This behavior appears to be related to the attachment of the host to the substrate (leaf). Attachment to leaves is a common feature in the final stages of behavior manipulation induced by some entomopathogenic fungi, especially in hosts parasitized by *Ophiocordyceps*, which need to cling to the substrate with their jaws or legs (Andersen, *et al.*, 2009), culminating in a ‘death-grip’ that commonly perforate the leaf. However, an interesting distinction in the case of spiders infected by *Gibellula* sp. is that the “death-bed” woven by the spider constitutes a fixation substrate without damaging the leaf where the spider is attached on. Therefore, it is possible that, unlike what occurs with *Ophiocordyceps*, the fungal hyphae of *Gibellula* do not penetrate plant tissues, as has been previously suggested (Selçuk, *et al.*, 2004). It is possible that the construction of the silk structure represents part of the parasite's extended phenotype, which may ensure that hosts die safely affixed in ideal locations for fungal spore dispersal.

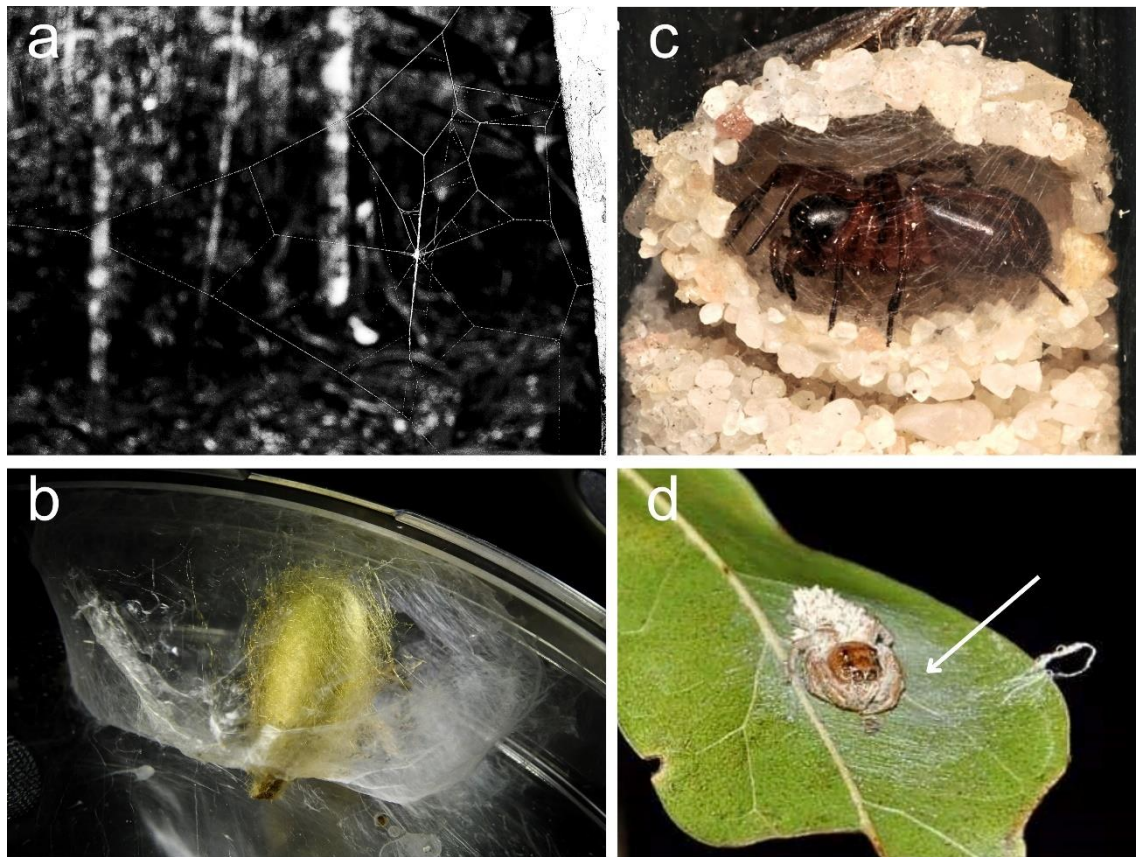


Figure 1. Silk structures built by spiders with altered behavior parasitized by different parasites. (a) Cocoon web similar to the molting web of *Cyclosa* sp. parasitized by an *Polysphincta* wasp (Ichneumonidae) (Photo credits: Thiago G. Kloss). (b) Pupa of the wasp *Minagenia* sp. (Pompilidae) attached to the web of webs built by the spider *Lycosa* sp. (Lycosidae) before being killed by the parasitoid, typically seen during molting in uninfected spiders (Photo credits: Marco A. Benamú). (c) *Pax islamita* (Zodariidae) spider parasitized by the dipteran *Ogcodes* sp. (Acroceridae) inside the shelter similar to the one used during the molt that was built before its death by the parasite (Photo credits: Pekár, Lubin, 2020). (d) Spider *Colonus* sp. (Salticidae) infected by the fungus *Gibellula* sp. (Cordycipitaceae) (Photo credits: Stephen J. Saltamachia). The arrow indicates the “death bed” built by the spider before being killed by the fungus.

4. The potential convergence of strategies among different spider parasites

According to the descriptions found in our review, we observed that several behaviors exhibited by parasitized spiders can be associated with their respective molt behaviors. However, all cases found are still based on few observations, with taxonomic restrictions and few studies that cover natural variations in host behavior, such as other types of webs built throughout the spiders' lives. Even though the relationship between these behaviors and increased 20E levels has only been found in spiders parasitized by Polysphinctine wasps (Kloss, *et al.*, 2017), the similarities observed in other interactions suggest that this mechanism might be generalized.

As occurs with Polysphinctine wasps, in some interactions recorded between spiders and Pompilidae wasps, it was observed that the host spiders, shortly before being killed by the larvae of these wasps, performed behaviors related to the pre-molting phase, normally exhibited by non-parasitized individuals during their development (Benamú, *et al.*, 2020; El-Hennawy, 1996). The pre-molt behaviors of these spiders also appear to consist of constructing a “bed” or tangle of silk threads, adopting a belly-up posture, and twitching. Furthermore, although there are no experiments testing whether the structures built by spiders present a benefit to Pompilidae wasps, the authors suggest that they may act as a protection for the parasitoid pupa, which builds the cocoon attached to the structures (Benamú, *et al.*, 2020) (Fig. 1b). The great similarity shown between the webs constructed by some parasitized spiders close to death and ecdysis suggests that they are the expression of a very similar phenotype. In these cases, the authors themselves commonly refer to these behaviors as pre-molt behaviors, as in Lycosidae spiders (Benamú, *et al.*, 2020; El-Hennawy, 1996; Gabellone, *et al.*, 2020) but details of the webs are not provided to make precise comparisons. It is possible that even though they are from different families, wasps with koinobiont habits that use spiders as hosts have suffered similar selective pressures that led them to explore the same manipulation strategy. This process can be explained because their larvae do not have pre-provided shelters to develop during the pupal stage, which may have led them to exploit their hosts' defense mechanisms. Furthermore, especially for wasps, other families of parasitoids, such as Braconidae, may use ecdysteroids to manipulate their insect hosts (Herbison, 2017; Adamo, 2019). This suggests that the possibility of generalization of this mechanism, at least in parasitoid wasps, is not far off.

In the case of parasitoid dipterans, the descriptions provided by the authors also relate the structures built and the behaviors displayed before death by infected spiders with pre-molting behaviors (Sýkora, *et al.*, 2022), such as the construction of a “bed” or silk tangle by Theraphosidae spiders (Barneche, *et al.*, 2013). However, although we cannot yet define it as a behavioral manipulation by these parasites, the frequency with which these behaviors are exhibited by parasitized spiders means that they do not appear to be random behaviors, but may constitute the extended phenotype of these parasites. (see Gillung, Borkent, 2017; Sýkora, *et al.*, 2022). Furthermore, it is interesting to note that although the larvae of these parasitoids are endoparasites, unlike the larvae of Polysphinctine and Pompilidae wasps, they probably present great vulnerability in the

pupal stage. Therefore, the similarity between the constructed webs and the way they appear to explore the structures built by the hosts (building their pupa inside of shelter or attached to structure, see fig. 1c) suggests the induction of ecdysis behavior in host spiders and that may be relevant for the survival of the pupae of these dipterans.

On the other hand, an interesting point in the interactions between fungi and their hosts is that the altered behaviors displayed by infected arthropods are generally associated with not being part of the behavioral repertoire of uninfected individuals (Hughes, *et al.*, 2016). For example, some ants infected by *Ophiocordyceps* fungi exhibit the behavior of climbing and biting to higher vegetation, such as branches and leaves, a phenomenon generally associated only with infected ants (Lovett, *et al.*, 2020). However, these behaviors can also be exhibited at specific times of quiescence, during the ecdysis process in young individuals and during a sleep state in adults (Lovett, *et al.*, 2020). Although it has not yet been confirmed for ants, other arthropods such as caterpillars, wasps and bees commonly perform such climb behaviors during these same periods (Lovett, *et al.*, 2020; MacWilliam, *et al.*, 2015), which are directly linked to moments in their circadian rhythm such as ecdysis.

Similarly, the behavior of sheltering in the abaxial part of leaves and the construction of webs visually similar to “death-beds” (Fig. 1d) or silk shelters, seem to be commonly adopted during the molting period of many species of spiders that are infected by fungi (*e.g.* Salticidae) (Hill, *et al.*, 2019; Rößler, *et al.*, 2021). Ecdysis in these spiders is usually preceded by the construction of a bed of silk threads or molting “sacks” (silk wrappings), or even nocturnal retreat webs (Hill, *et al.*, 2019; Rößler, *et al.*, 2021) on the abaxial part of leaves (Hill, *et al.*, 2019). When they do not perform ecdysis within the silk envelopes, immediately after building the “bed” of threads, the spiders hang from a support thread attached to this “bed”, using gravity to help detach themselves from the exoskeleton (Hill, *et al.*, 2019). Therefore, this suggests that the construction of the “death-bed” could be the induction of the initial stage of ecdysis behavior, which probably is interrupted by the lethal action of the parasite fungus.

Araneopathogenic fungi seem to use the structures built by spiders not as protection, but for fixation and stability on a substrate, which could improve the propagation efficiency of their spores. However, the molting structures of spiders must also naturally perform this function, mainly due to the process of shedding their exoskeleton (Rößler, *et al.*, 2021). We suggest that even if fungi explore the behaviors

performed by their hosts in a different way, these organisms might have found the same solution as wasps to generate phenotypes that are results of the activation of the pre-programmed ecdysis mechanism.

In summary, the behaviors displayed by host spiders, as well as their webs built during pre-molting, have the capacity to provide protection and stability to the parasites. In this way, by exploiting this resource already present in their hosts, parasites can gain an advantage in their development. Nonetheless, ecdysteroids perform diverse functions in the organism and are intrinsically related to other physiological systems in arthropods (Sawadro, *et al.*, 2017). The mechanisms by which each parasite analyzed here can activate ecdysis in spiders may vary, primarily due to their different forms of infection and methods of consuming host resources. Still, it is not completely clear how advantageous such a strategy can be for different groups of parasites and parasitoids. To discuss these points, we present below a summary of the role of ecdysteroids in spiders, the possible pathways for activating this innate mechanism in spiders and other arthropods, and why this induction can be advantageous for the fitness of spiders' natural enemies.

5. Synthesis and functions of ecdysteroids in spiders and other arthropods

Ecdysteroids are present in all arthropods and play a fundamental role in the physiology of these organisms, acting on growth, metamorphosis, ecdysis, diapause and reproduction (Sawadro, *et al.*, 2017; Yang, *et al.*, 2021). These steroids, as well as sesquiterpenoids (juvenile hormones and methyl farnesoate), are synthesized from cholesterol by the prothoracic gland in insects and probably by the molting organ (MO) in spiders (Sawadro, *et al.*, 2017). Its effects on arthropod tissues are mediated by the ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracular protein (USP) (Sawadro, *et al.*, 2017). In arthropods, ecdysteroid synthesis is carried out by a group of genes called “Halloween genes” (Yamanaka, 2021). However, in arachnids it is not yet fully established how they are synthesized, especially during the beginning of the synthesis, which occurs through the group of genes called “black box” (Yang, *et al.*, 2021; Yamanaka, 2021).

Among the types of existing ecdysteroids, the most commonly found active in arthropods is 20-hydroxyecdysone (20E) (Sawadro, *et al.*, 2017). Outside the normal conditions of the developmental stages, fluctuations in the levels of ecdysteroids such as 20E can also occur according to the stress and nutritional condition of the animal (Adamo,

2019; Yamanaka, 2021; Terashima, *et al.*, 2005; Moen, *et al.*, 2022). Fluctuations in the levels of these hormones are related to physiological and behavioral changes in individuals. Among these changes are alterations in the production and development of ovaries, activation of a state of quiescence and specifically in spiders, the production of molting webs, differences in investment in webs, development time, as well as post-copulation cannibalism (Terashima, *et al.*, 2005; Moen, *et al.*, 2022; MacWilliam, *et al.*, 2015; Tralalon, *et al.*, 1998; Krishnakumaran, Schneiderman, 1970; Mohan, Sinu, 2022). In addition, the increase in ecdysteroids and juvenile hormones and their analogues are highly linked to the activation of the arthropod immune system, although these two groups of hormones appear to have opposite effects on the organism (Mohan, Sinu, 2022; Adamo, 2019; Sawadro, *et al.*, 2017; Dai, *et al.*, 2022). Therefore, several evidences found show that the behavioral effects observed in spiders and other parasitized arthropods (*e.g.* adopting molting behaviors and a state of quiescence) are compatible with those generated by fluctuations in ecdysteroid levels (Mohan, Sinu, 2022; Adamo, 2019; Sawadro, *et al.*, 2017; Dai, *et al.*, 2022; Adamo, *et al.*, 2016). However, the ways and pathways by which parasites access and induce the production of ecdysteroids in the host may vary, as discussed in the following topics.

6. How could spider parasites activate molting behaviors to manipulate their host

Based on knowledge about manipulation mechanisms and metabolic routes for steroid production, we suggest two possible basic pathways by which parasites could induce the production and activation of ecdysteroids in spiders (summarized in Figure 2): (i) through activation of the neuro-immune system, with immune responses due to resource consumption, tissue damage and stress caused by parasites (Mohan, Sinu, 2022; Adamo, 2019; Sawadro, *et al.*, 2017; Dai, *et al.*, 2022; Cheng, *et al.*, 2017) and, a little more complex, (ii) through a symbiosis between the parasite and microbes associated, whose organisms are able to access the host's Central Nervous System (CNS) and activate several physiological effects (Adamo, 2019; Biron, *et al.*, 2015; Dheilly, *et al.*, 2015; Coyle, *et al.*, 2018; Poulin, *et al.*, 2022).

6.1. Neuro-immune system: resource consumption and stress induction

Ecdysteroids are highly related to the nervous and immune systems in arthropods (Adamo, 2019; Yamanaka, 2021). The production and activation of ecdysteroids, as well as the adoption of molting behavior, are common in situations of stress, physical damage or low nutrition (MacWilliam, *et al.*, 2015; Krishnakumaran, Schneiderman, 1970; Cheng, *et al.*, 2017; Bonaric, De Reggil, 1977; Jensen, *et al.*, 2023). Changes in behavior similar to those displayed by pre-molt spiders are also seen in caterpillars parasitized by wasps and dipterans when they are in the pre-molt state (Mohan, Sinu, 2022; Dai, *et al.*, 2022). Furthermore, stereotypical behaviors called molting sleep state, such as suppression of feeding days before molting or presenting decreased locomotion and greater aggression (MacWilliam, *et al.*, 2015) can be observed in animals in a state of stress, which can be induced by the parasite that uses this to its advantage (Mohan, Sinu, 2022). Likewise, spiders in a thermal stress environment have changes in the levels of ecdysone and juvenile hormone, in addition to presenting altered inter-molting time and differences in web construction (Moen, *et al.*, 2022). Such evidence may suggest that the modified behaviors may represent an organism's response to infection by the parasites (Jensen, *et al.*, 2023) (Fig. 2).

On the other side, the nutritional condition of the individual can influence its behavior and the ecdysis process, especially in post-maturity (Sawadro, *et al.*, 2017; Cheng, *et al.*, 2017; Yang, *et al.*, 2022) (Fig. 2). This can be easily understood, as ecdysteroids are synthesized from cholesterol by arthropod fat bodies or molting organs (Sawadro, *et al.*, 2017; Cheng, *et al.*, 2017; Yang, *et al.*, 2022). Considering this, the spider could begin the ecdysis process as an immune response of the organism to the large energy deficit (Fig. 2). This response can be performed since spiders change their behavior shortly before dying due to the emergence of the parasite or its total consumption, a stage where the parasite consumes a greater amount of the host's resources. However, it has already been observed in some spiders parasitized by Polysphinctine wasps that the change in behavior does not occur in spiders deprived of food resources for 21 days, approximately (Gonzaga, *et al.*, 2010; Kloss, *et al.*, 2016). In contrast, food deprivation for a small period of time may not be enough to generate a nutritional deficit of the same level caused by parasites and induce molting in spiders. In addition, it may be necessary to combine nutritional deficiency with stress due to the presence and damage caused by parasites, acting with the activation of the host's immune system for the spider to have its behavior altered.

6.2. Parasitic microbes

The role of microorganisms in parasites is still unclear. Many may present a hyperparasitism relationship or even a mutualistic relationship between them. This is because at the same time that the microorganisms associated with the parasites seem to consume the parasite's resources and also manipulate its behavior, the parasites themselves benefit from this relationship by increasing their fitness. In general, microbes typically found in organisms with mutualistic or commensalistic relationships are considered part of the “natural” or “healthy” microbiome of their hosts (Biron, *et al.*, 2015). Although little addressed in studies on behavioral manipulation, the microbiome of parasites can act as crucial symbionts in this process (Burke, Stand, 2012; Biron, *et al.*, 2015; Poulin, *et al.*, 2022) (Fig. 2). Parasites containing certain taxa of microorganisms can alter the host response and benefit from this (Poulin, *et al.*, 2022). Moreover, in some cases, behavioral changes can be caused exclusively by host's microorganisms and not by the parasites (Biron, *et al.*, 2015; Dheilly, *et al.*, 2015) (Fig. 2).

The site of infection may be essential for a parasite to manipulate the behavior of its hosts. Therefore, microorganisms that can directly access the host's CNS may be more successful in behavioral manipulation (Herbison, 2017; Maure, *et al.*, 2013; Poulin, *et al.*, 2022; Mangold, Hughes, 2021) (Fig. 2). Most of the work that shows the influence of symbionts on altering the behavior of hosts occurs in vertebrates (Biron, *et al.*, 2015; Mangold, Hughes, 2021). However, strong evidence of the influence of symbionts on host behavioral changes has been presented for interactions between arthropods, such as insects, crustaceans and their parasites (Burke, Stand, 2012; Dheilly, *et al.*, 2015; Poulin, *et al.*, 2022). For example, in the interaction between the parasitoid wasp *Dinocampus coccinellae* and its host, the ladybug *Coleomegilla maculata*, where a bodyguard-type manipulation occurs, in which the ladybug protects the parasitoid pupa (Dheilly, *et al.*, 2015). In this interaction, a Polydnavirus, *DcPV*, can play a crucial role in inducing behavioral changes. This virus, present in the ovipositor region of the adult *D. coccinellae* wasp, is transmitted vertically to its eggs, which are deposited in the host. When the larva hatches from the virus-infected egg, enters the host's body and starts feeding on its hemolymph, this causes the ladybug to become infected with the virus (Dheilly, *et al.*, 2015). From there, the virus replicates in the host's CNS and the ladybug presents altered behavior, which only returns to normal when virus replication stops (Dheilly, *et al.*,

2015). The behavioral manipulation that occurs in this interaction may be an indication of the activation of ecdysteroids in the host's body. This is because the ladybug's altered behavior resembles stress-induced sleep on arthropods or molting sleep, also observed in other arthropods, which has a strong relationship with ecdysteroids (Mohan, Sinu, 2022; MacWilliam, *et al.*, 2015) (Fig. 2). Furthermore, the same group of Polydnaviruses found in *D. coccinellae* are also identified as part of the microbiome of Ichneumonidae wasps as *Ichnovirus* (Burke, Stand, 2012). This suggests that these viruses may also play a role in altering the behavior of spiders parasitized by parasitoid wasps.

Other evidence of the use of ecdysteroids in behavioral modification caused by viruses that also activate molting behavior occurs with the caterpillar *Lymantria dispar*, infected by a baculovirus (Adamo, 2019; Hoover, *et al.*, 2011). The baculovirus carries a gene called *egt*, essential for behavioral manipulation, which activates the production of the 20E hormone, but prevents its binding to the CNS and inactivates the hormone's effects on the cuticle (Hoover, *et al.*, 2011). The caterpillar performs all behaviors related to the molting process (*e.g.* sheltering on the underside of leaves or branches in higher regions of the plants, suppression of feeding and movement, similar to a state of quiescence), but dies before completing the process of exoskeleton replacement (Adamo, 2019; Hoover, *et al.*, 2011). The pre-molt behavior of moving to the highest part of the plant helps in the dispersion of the virus through the air (Adamo, 2019; Hoover, *et al.*, 2011), as occurs with arthropods infected by fungi.

Although the influence of any microorganism on the interaction between the silk caterpillar *Bombyx mori* and the parasitic fly *Exorista japonica* has not been reported, the mechanism of gene activation induced by the parasite, interrupting the host's molting, is similar to that employed by baculoviruses. The parasite *E. japonica* presents the same ability to induce the production of ecdysteroids and inactivate their function in the host *B. mori* through epigenetic mechanisms (Dai, *et al.*, 2022). When the parasite is present, the molting process of *B. mori* is interrupted, leading to its death (Dai, *et al.*, 2022). Therefore, spider parasitoid wasps and dipterans could carry viruses and other microbes capable of containing genes that cause pre-molting behaviors and the inactivation of molting hormones, preventing their effectiveness (Fig. 2). For ectoparasitoids such as Polysphinctine and Pompilidae wasps, interrupting the host's molting process may be important and the interaction with viruses normally present in these wasps (Burke, Stand, 2012) may play this role. This is because if the host molts, it is possible that it will remove

the parasitoid egg or larva along with the old exoskeleton, or even cause the host to die in the process, as has already been reported with the *Colpomeria kincaidii* wasps parasitizing *Tetragnatha laboriosa* (Howell, Pienkowski, 1972) and *Hymenoepimecis bicolor* infecting *Trichonephila clavipes* (Gonzaga, *et al.*, 2010). Additionally, removing the parasite from hosts preventing its complete development also harms the viruses and other microorganisms associated to the parasite, as they depend on them for their dispersion.

Finally, fungi alone are able to access the most sensitive areas of the host, such as muscle cells and the CNS, to manipulate its behavior (Hughes, *et al.*, 2016). However, they can also benefit from interactions with another microorganisms, as the presence of an iflavivirus was recently reported in a fungus that infects dipterans (Coyle, *et al.*, 2018) (Fig. 2). Other iflaviruses are also found isolated in insects and can also cause behavioral changes in the host, such as *Kakugo* virus, related to aggressiveness in bees (Coyle, *et al.*, 2018) and *DcPV* involved with paralysis of *C. maculata* (Dheilly, *et al.*, 2015). With this, Coyle, *et al.* (2018) suggest that these viruses may play a key role in the behavioral manipulation seen in fungus-infected arthropods. Therefore, by using their symbiotic microbes as a way of manipulating the behavior of their host spiders, different parasites (wasps, dipterans and fungi) could act as vectors of this microbes (such as viruses) that have spiders as definitive hosts.

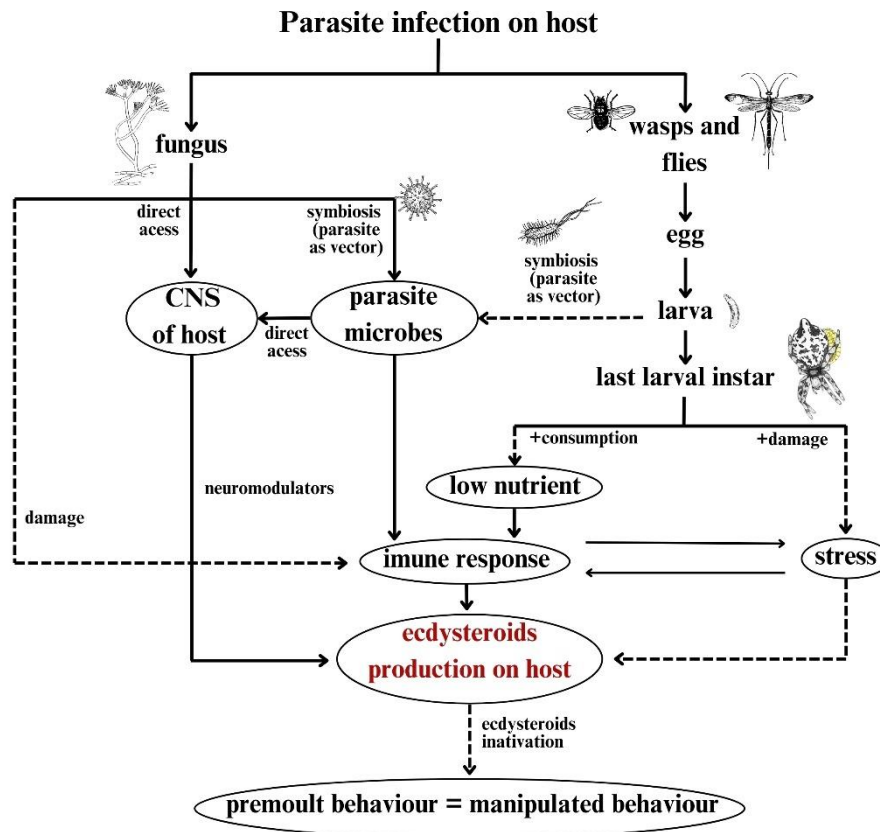


Figure 2. Schematic synthesis showing the possible pathways of ecdysteroid activation in hosts by different parasites according to the form of infection of each parasite resulting in manipulated behavior similar to pre-molt behavior. Dashed lines indicate possible pathways but still lack further evidence, while solid lines show possible pathways with stronger evidence. The (+) represents an increase in effect, such as damage and consumption.

7. What are the possible ecdysteroids involved in the process of behavioral manipulation of spiders?

If the hypothesis that the mechanism of behavioral manipulation of spiders by different parasites is based on the activation of ecdysis in the spider by ecdysteroids, what could be acting in this process? This question is mainly raised because, despite the similarity between the modified and ecdysis webs of several spiders manipulated by Polysphinctine wasps, there are still exceptions (Eberhard, Gonzaga, 2019). Also, some species build cocoon webs that vary greatly from each other and differ from their molting webs, as seen in some spiders of the genus *Leucauge* (Eberhard, Gonzaga, 2019). However, certain elements of the orb webs (e.g. absence of spirals, reduced number of radii and presence of barrier threads) are similar in both webs built by *Leucauge*, which could indicate a possible role of ecdysteroids in the modified behavior (Eberhard, Gonzaga, 2019).

The modification of behavior may not be based exclusively on the increase in 20E, as other analogues of this hormone may be involved in activating the cocoon web construction process. For example, Yang *et al.* (2021) through molecular and gene expression analyzes in the spider *Pardosa pseudoannulata*, comparing with the genome of other spiders from different families, suggests that the main ecdysteroid acting in arachnids is Ponasterone A (PoA). PoA has an effect similar to 20E on the organism of some arthropods such as mites, ticks and crustaceans (Yang, *et al.*, 2021; Yamanaka, 2021; Krishnakumaran, Schneiderman, 1970). The same occurs with other ecdysteroids such as Ecdisone, Makisterone A, Inokosterone, among others (Yang, *et al.*, 2021; Yamanaka, 2021; Krishnakumaran, Schneiderman, 1970). However, the big problem in understanding the role of these substances on arachnid behavior is that there is little knowledge about which ecdysteroids are synthesized and used by spiders and whether more than one form of these hormones can occur together in the same organism. Another point to consider is that these ecdysteroids seem to vary between individuals of the same group, such as mites, where some species present PoA and others 20E (Yang, *et al.*, 2021). Therefore, with this variation in hormones between species, regardless of the parasite, the activated hormone and consequently the variations found in its levels can be different in each host.

8. Conclusions and future directions

Parasite-host interactions are complex and involve diverse strategies by both parasites and hosts to avoid infection and further damage, which makes it more difficult to trace evolutionary patterns of strategies. From the studies investigated, we see that the activation of ecdysteroids in conjunction with the host's immune system appears to be highly related to behavioral changes in various host-parasite systems, including spiders and their parasites (Mohan, Sinu, 2022; Adamo, 2019; MacWilliam, *et al.*, 2015). Several evidences suggest this relationship, mainly due to stereotypical behaviors of spiders and other groups of arthropods infected by different parasites. These evidences may represent a possible convergence of evolutionary strategies of groups of parasites that exploit spiders as hosts. Thus, phylogenetically distant parasites that managed to access the ecdysis mechanism of their hosts, consequently, may have benefited from behaviors generated and selected over evolutionary time. The exploitation of this mechanism could be viable, because it is a way for the parasite to reduce its costs, compared to those it

would have to produce new molecules and inject them into the host to manipulate its behavior (Maure, *et al.*, 2013). However, how parasites are able to access and activate ecdysteroids is still unclear. Ecdysteroids can be activated simply due to an adaptive immune response of the host to the type of infection caused by the parasites (Jensen, *et al.*, 2023), or even by acting in conjunction with the parasite's symbionts (Poulin, *et al.*, 2022) (Fig. 2). Therefore, the hypothesis raised here and reinforced through evidence present in the literature still needs to be tested considering these two perspectives. Despite the number of studies on spider parasites having increased considerably in the last two decades, more detailed behavioral studies with more standardized descriptions are still necessary to enrich the basic information about these interactions. Another question that requires new investigations is how the symbiotic microbes of parasites can act in these interactions and their effects on hosts. The presence of these microorganisms and viruses in the parasites may have acted as a strong selective pressure to enable an increase in their fitness by acting together to use the host's resources in order to benefit the parasite that acts as its disperser. Finally, more studies are needed regarding which hormones are most active in the physiology of spiders, showing the functions of each of them in their organism and their effects on behavior in different phases of parasitism. Research using molecular techniques, such as genomics, transcriptomics and proteomics, can help to elucidate questions regarding these mechanisms.

Acknowledgements

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for making the research possible with funding. We also thank Postgraduate Program in Ecology at the Federal University of Viçosa for the support and resources provided. We thank Alexander Gaione-Costa, Renato Chaves Macedo-Rego, Marcelo Oliveira Gonzaga and Paula Luize Camargos Fonseca for your reviews and comments. We would also like to thank Marco Antonio Benamú and Pekár, Lubin, 2020 who made it possible to use the photographs mentioned in Figure 1.

CRedit Statement

Ítalo Mendes Delazari (conception, formal analyses, investigation, writing — original draft), Thairine Mendes-Pereira (writing — review and editing), Stephen James

Saltamachia (conception, investigation and review), and Thiago Gechel Kloss (conception, supervision, validation, funding, writing — review and editing).

Supplementary Data

Additional supporting information may be found in the supplementary information.

Figure S1. Prisma flow diagram for systematic reviews. List of included records. n = number of articles.

Conflict of interest declaration

We declare that we have no conflicting interests.

Funding. This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) granted by Programa de Demanda Social (DS 88887.675248/2022-00), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ 00935-18), and The National Geographic Society Grant Level I (EC-107006R-23).

Data Availability Statement

Data used in this study are available from the supplementary information.

Reference

- Adamo SA, Parasites: Evolution's neurobiologists, *Journal of Experimental Biology* 2013; **216**: 3-10.
- Adamo SA, Turning your victim into a collaborator: exploitation of insect behavioral control systems by parasitic manipulators, *Current Opinion in Insect Science* 2019; **33**: 25-29.
- Adamo SA, Kovalko I, Turnbull KF, *et al.*, The parasitic wasp *Cotesia congregata* uses multiple mechanisms to control host (*Manduca sexta*) behaviour, *Journal of Experimental Biology* 2016; **219**: 3750-3758.
- Andersen SB, Gerritsma S, Yusah, KM, *et al.*, The life of a dead ant: the expression of an adaptive extended phenotype, *The American Naturalist* 2009; **174**.
- Arruda IDP, Villanueva-Bonilla GA, Faustino ML, *et al.*, Behavioral manipulation of the spider *Macrophyes pacoti* (Araneae: Anyphaenidae) by the araneopathogenic fungus *Gibellula* sp. (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Canadian Journal of Zoology* 2021; **99**: 401-408.
- Barneche JA, Gillung JP, González A, Description and host interactions of a new species of *Exetasis* walker (Diptera: Acroceridae), with a key to species of the genus, *Zootaxa* 2013; **3664**: 525-536.

- Benamú M, García LF, Viera C, *et al.*, Koinobiont life style of the spider wasp *Minagenia* (Hymenoptera, Pompilidae) and its consequences for host selection and sex allocation, *Zoology* 2020; **140**.
- Biron DG, Bonhomme L, Coulon M, *et al.*, Microbiomes, plausible players or not in alteration of host behaviour, *Frontiers in Microbiology* 2015.
- Bonaric JC, De Reggil M. Changes in ecdysone levels in the spider *Pisaura mirabilis* nymphs (Araneae, Pisauridae), *Specialia*, 1977; 1664-1665.
- Burke G, Strand M, Polydnaviruses of parasitic wasps: domestication of viruses to act as gene delivery vectors. *Insects* 2012; **3**: 91-119.
- Cady A, Leech R, Stratton G, *et al.*, Acrocerid (Insecta: Diptera) life histories, behaviors, host spiders (Arachnida: Araneidae), and distribution records, *The Canadian Entomologist* 1993; **125**: 931-944.
- Cheng RC, Zhang S, Chen YC, *et al.*, Nutrient intake determines post-maturity molting in the golden orb-web spider *Nephila pilipes* (Araneae: Araneidae), *Journal of Experimental Biology* 2017; **220**: 2260-2264.
- Coyle MC, Elya CN, Bronski M, *et al.*, Entomophthovirus: An insect-derived iflavivirus that infects a behavior manipulating fungal pathogen of dipterans, *bioRxiv* 2018.
- Da Silva Souza H, Messas YF, Masago F, *et al.*, *Paracyphononyx scapulatus* (Hymenoptera, Pompilidae), a koinobiont ectoparasitoid of *Trochosa* sp. (Araneae, Lycosidae), *Journal of Hymenoptera Research* 2015; **46**: 165-172.
- Dai ML, Ye WT, Jiang XJ, *et al.*, Effect of tachinid parasitoid *Exorista japonica* on the larval development and pupation of the host silkworm *Bombyx mori*, *Frontiers in Physiology* 2022; **13**.
- Dawkins R, *The Extended Phenotype*, Oxford: Oxford University Press, 1982.
- Dheilly NM, Maure F, Ravallec M, *et al.*, Who is the puppet master? Replication of a parasitic wasp-associated virus correlates with host behaviour manipulation, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2015; **282**: 1-10.
- Durkin ES, Cassidy ST, Gilbert R, *et al.*, Parasites of spiders: their impacts on host behavior and Ecology, *Journal of Arachnology* 2021; **49**: 281-298.
- Eberhard WG, Spider manipulation by a wasp larva, *Nature* 2000; **406**: 255-2056.
- Eberhard WG, Under the influence: Webs and building behavior of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera, Ichneumonidae), *Journal of Arachnology* 2001; **29**: 354-366.
- Eberhard WG, New types of behavioral manipulation of host spiders by a parasitoid wasp, *Psyche* 2010; 1-4.
- Eberhard WG, Gonzaga MO, Evidence that Polysphincta-group wasps (Hymenoptera: Ichneumonidae) use ecdysteroids to manipulate the web-construction behaviour of their spider hosts, *Biological Journal of the Linnean Society* 2019; **127**: 429–471.
- El-Hennawy HK, A spider (*Lycosa?* sp.) (Araneida: Lycosidae) providing a shelter for its predator *Paracyphononyx ruficrus* (Klug, 1834) (Hymenoptera: Pompilidae), *Revue Suisse de Zoologie* 1996; 185-188.
- Gabellone CS, Barneche JA, González A, Interaction between *Epipompilus platensis* (Hymenoptera: Pompilidae) and *Ariadna mollis* (Araneae: Segestridae), *Revista Peruana de Biología* 2020; **27**: 183-188.

- Gaione-Costa A, Pádua DG, Delazari IM, *et al.*, Redescription and oviposition behavior of an orb-weaver spider parasitoid *Hymenoepimecis cameroni* Townes, 1966 (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Zootaxa* 2022; **5134**: 415-425.
- Gauld ID, Dubois J, Phylogeny of the Polysphincta group of genera (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): A taxonomic revision of spider ectoparasitoids, *Systematic Entomology* 2006; **31**: 529-564.
- Gillung JP, Borkent CJ, Death comes on two wings: A review of dipteran natural enemies of arachnids, *Journal of Arachnology* 2017; **45**: 1-19.
- Gonzaga MO, Rios-Moura R, Teixeira-Pêgo P, *et al.*, Changes to web architecture of *Leucauge volupis* (Araneae: Tetragnathidae) induced by the parasitoid *Hymenoepimecis jordanensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Behaviour* 2015; **152**: 181-193.
- Gonzaga MO, Sobczak JF, Pentead-Dias AM, *et al.*, Modification of *Nephila clavipes* (Araneae Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and *H. robertsae* (Hymenoptera Ichneumonidae), *Ethology Ecology and Evolution* 2010; **22**: 151-165.
- Herbison RE, 2017. Lessons in mind control: trends in research on the molecular mechanisms behind parasite-host behavioral manipulation, *Frontiers in Ecology and Evolution* 2017; **102**: 1-15.
- Hill DE, P.C.A. A, Krishna P, *et al.*, Construction of orb webs as nocturnal retreats by jumping spiders (Araneae: Salticidae: cf. *Anarrhotus*) in southwestern India, *Peckhamia* 2019; **182.2**: 1-13.
- Hoover K, Grove M, Gardner M, *et al.*, A Gene for an Extended Phenotype, *Science* 2011; **333**: 1401.
- Howell JO, Pienkowski RL, Notes on the biology of a spider parasite *Colpomera kincaidii* Ashmead (Hymenoptera : Ichneumonidae), *Entomophaga* 1972; **17**: 5-7.
- Hughes DP, Araújo JPM, Loreto RG, *et al.*, From so simple a beginning. The evolution of behavioral manipulation by fungi, *Advances in Genetics* 2016; **94**: 437-469.
- Jensen CH, Weidner J, Giske J, *et al.*, Adaptive host responses to infection can resemble parasitic manipulation, *Ecology and Evolution* 2023; **13**: e10318.
- Johnson D, Sung GH, Hywel-Jones NL, *et al.*, Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota), *Mycological Research* 2009; **113**: 279-289.
- Kehlmaier C, Michalko R, Korenko S, *Ogcodes fumatus* (Diptera: Acroceridae) reared from *Philodromus cespitum* (Araneae: Philodromidae), and first evidence of *Wolbachia alphasproteobacteria* in acroceridae, *Annales Zoologici* 2012; **62**: 281-286.
- Kloss TG, Gonzaga MO, De Oliveira LL, *et al.*, Proximate mechanism of behavioral manipulation of an orb-weaver spider host by a parasitoid wasp. *PLoS ONE* 2017; **12**: e0171336.
- Kloss TG, Gonzaga MO, Mendes-Pereira T, *et al.*, Deluded zombies: induced behavioral modification in a cobweb spider does not increase the survival of its parasitoid wasp, *Behavioral Ecology and Sociobiology* 2024; **78**: 13.
- Kloss TG, Gonzaga MO, Roxinol JAM, *et al.*, Host behavioural manipulation of two orb-weaver spiders by parasitoid wasps, *Animal Behaviour* 2016; **111**: 289-296.

- Kloss TG, Pádua DG, Lacerda FG, *et al.*, Suppression of orb-web building behavior of the spider *Metazygia laticeps* (O. Pickard-Cambridge, 1889) (Araneae: Araneidae) by a new parasitoid wasp. *Zoologischer Anzeiger* 2018; **276**: 100-106.
- Korenko S, Černecká L, Dorková M, *et al.*, *Sinarachna nigricornis* and genus-specific host utilization of *Araneus* spiders by the genus *Sinarachna* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Journal of Arachnology* 2022; **50**: 51-55.
- Korenko S, Pekár S, A parasitoid wasp induces overwintering behaviour in its spider host, *PLoS ONE* 2011; **6**: 1-5.
- Krishnakumaran A, Schneiderman HA, Control of molting in mandibulate and chelicerate arthropods, *Biological Bulletin* 1970; **139**: 520-538.
- Lafferty KD, Shaw JC, Comparing mechanisms of host manipulation across host and parasite taxa, *The Journal of Experimental Biology* 2013; **216**: 56-66.
- Libersat F, Delago A, Gal R, Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites, *The Annual Review of Entomology* 2009; **54**: 189 - 207.
- Libersat F, Kaiser M, Emanuel S, Mind control: how parasites manipulate cognitive functions in their insect hosts, *Frontiers in Psychology* 2018; **9**.
- Lovett B, Leger RJS, Licht HHdF, Going gentle into that pathogen-induced goodnight, *Journal of Invertebrate Pathology* 2020; **174**: e107398.
- MacWilliam D, Arensburger P, Higa J, *et al.*, 2015. Behavioral and genomic characterization of molt-sleep in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2015; **62**: 154-167.
- Mangold CA, Hughes DP, Insect behavioral change and the potential contributions of neuroinflammation—a call for future research, *Genes* 2021; **12**: 465.
- Matsumoto R, "Veils" against predators: modified web structure of a host spider induced by an ichneumonid parasitoid, *Brachyzapus nikkoensis* (Uchida) (Hymenoptera), *Journal of Insect Behavior* 2009; **22**: 39-48.
- Maure F, Brodeur J, Hughes D, *et al.*, How much energy should manipulative parasites leave to their hosts to ensure altered behaviours?, *Journal of Experimental Biology* 2013; **216**: 43-46.
- Mendes-Pereira T, Araújo JPM, Kloss TG, *et al.*, Disentangling the taxonomy, systematics, and life history of the spider-parasitic fungus *Gibellula* (Cordycipitaceae, Hypocreales), *Journal of Fungi* 2023; **9**: 457.
- Mendes-Pereira T, Araújo JPM; Mendes FC, *et al.*, *Gibellula aurea* sp. nov. (Ascomycota, Cordycipitaceae): a new golden spider-devouring fungus from a Brazilian Atlantic Rainforest, *Phytotaxa* 2022; **573**: 85-102.
- Moen C, Chadwick Johnson J, Price JH, Ecdysteroid responses to urban heat island conditions during development of the western black widow spider (*Latrodectus hesperus*), *PLoS ONE* 2022; **17**.
- Mohan P, Sinu PA, Is direct bodyguard manipulation a parasitoid-induced stress sleep? A new perspective, *Biology Letters* 2022; **18**: 1-7.
- Mongkolsamrit S, Noisriboom W, Thanakitpipattana D, *et al.*, Disentangling cryptic species with *Isaria*-like morphs in Cordycipitaceae, *Mycologia* 2018; **110**: 230-257.
- Moore J, *Parasites and the behaviour of animals*, Oxford University Press, 2002.

- Nielsen BO, Funch P, Toft S, Self-injection of a dipteran parasitoid into a spider, *Naturwissenschaften* 1999; **86**: 530-532.
- Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, *et al.*, The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Systematic Reviews* 2021; **10**: 89.
- Pekár S, Lubin Y, *Pax islamita* (Araneae: Zodariidae) as a new host of an acrocerid fly from Israel, *Arachnologische Mitteilungen* 2020; **59**: 5-7.
- Pollard SD, *Epipompilus insularis* (Hymenoptera: Pompilidae), a parasitoid of hunting spiders, *New Zealand Journal of Zoology* 1982; **9**: 37-39.
- Ponton F, Lefevre T, Lebarbenchon C, *et al.*, Do distantly related parasites rely on the same proximate factors to alter the behaviour of their hosts?, *Proceedings of Royal Society B* 2006; **273**: 2869 - 2877.
- Poulin R, Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions, *In: Brockmann HJ, et al., Advances in the Study of Behavior*, Burlington: Academic Press, 2010; **41**: 151-186.
- Poulin R, Jorge F, Salloum PM, Inter-individual variation in parasite manipulation of host phenotype: a role for parasite microbiomes?, *Journal of Animal Ecology* 2022; **00**: 807-812.
- Rößler DC, De Agrò M, Biundo E, *et al.*, Hanging by a thread: unusual nocturnal resting behaviour in a jumping spider, *Frontiers in Zoology* 2021; **18**.
- Sawadro M, Bednarek A, Babczyńska A, The current state of knowledge on the neuroactive compounds that affect the development, mating and reproduction of spiders (Araneae) compared to insects, *Invertebrate Neuroscience* 2017; **17**.
- Selçuk F, Hüseyin E, Gaffaroğlu M, Occurrence of the araneogenous fungus *Gibellula pulchra* in Turkey, *Mycologia Balcanica* 2004; **1**: 61 - 62.
- Shrestha B, Kubátová A, Tanaka E, *et al.*, Spider-pathogenic fungi within Hypocreales (Ascomycota): their current nomenclature, diversity, and distribution, *Mycological Progress* 2019; **18**: 983-1003.
- Sýkora J, Barták M, Heneberg P, *et al.*, Evolutionary aspects of the parasitoid life strategy, with a particular emphasis on fly–spider interactions, *Biological Journal of the Linnean Society* 2022; **137**: 569–582.
- Takasuka K, Broad GR, A bionomic overview of spider parasitoids and pseudo-parasitoids of the ichneumonid wasp subfamily Pimplinae, *Contributions to Zoology* 2024; 1-106.
- Takasuka K, Yasui T, Ishigami T, *et al.*, Host manipulation by an ichneumonid spider ectoparasitoid that takes advantage of preprogrammed web-building behaviour for its cocoon protection, *Journal of Experimental Biology* 2015; **218**: 2326-2332.
- Terashima J, Takaki K, Sakurai S, *et al.*, Nutritional status affects 20-hydroxyecdysone concentration and progression of oogenesis in *Drosophila melanogaster*, *Journal of Endocrinology* 2005; **187**: 69-79.
- Thomas F, Poulin R, Brodeur J, Host manipulation by parasites: A multidimensional phenomenon, *Oikos* 2010; **119**: 1217-1223.
- Trabalon M, Pourié G, Hartmann N, Relationships among cannibalism, contact signals, ovarian development and ecdysteroid levels in *Tegenaria atrica* (Araneae, Agelenidae), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1998; **28**: 751-758.

- Yamanaka N, Ecdysteroid signalling in insects—From biosynthesis to gene expression regulation. *Advances in Insect Physiology: Genes and Endocrine Signaling in Development and Homeostasis*. Academic Press Inc., 2021; 1-36.
- Yang ZM, Yu N, Wang SJ, *et al.*, Characterization of ecdysteroid biosynthesis in the pond wolf spider, *Pardosa pseudoannulata*, *Insect Molecular Biology* 2021; **30**: 71-80.
- Yang, Z, Wu Y, Yan Y, *et al.*, Regulation of juvenile hormone and ecdysteroid analogues on the development of the predatory spider, *Pardosa pseudoannulata*, and its regulatory mechanisms, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2022; **242**.

Supplementary Information

Masters of puppets: could ecdysteroids route be a common pathway for behavioral manipulation in spiders by different parasites?

Ítalo M. Delazari¹, Thairine Mendes-Pereira², Stephen J. Saltamachia³, Thiago G. Kloss^{1*}

¹ Laboratory of Ecology and Behavior, Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brazil.

² Laboratory of Insect-Microbe Interactions, Department of Entomology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, Brazil

³ Department of Biology, University of Louisiana at Lafayette, 104 East University Avenue, Lafayette, Louisiana 70504.

ORCID: [IMD, 0000-0002-8413-4705](https://orcid.org/0000-0002-8413-4705); [TMP, 0000-0002-3707-9790](https://orcid.org/0000-0002-3707-9790); [SJS, 0000-0003-3336-6247](https://orcid.org/0000-0003-3336-6247); [TGK, 0000-0003-0958-1748](https://orcid.org/0000-0003-0958-1748)

*Author for correspondence: Thiago G. Kloss, Department of General Biology, Federal University of Viçosa. E-mail: thiago.kloss@ufv.br

Prisma flow diagram for systematic review

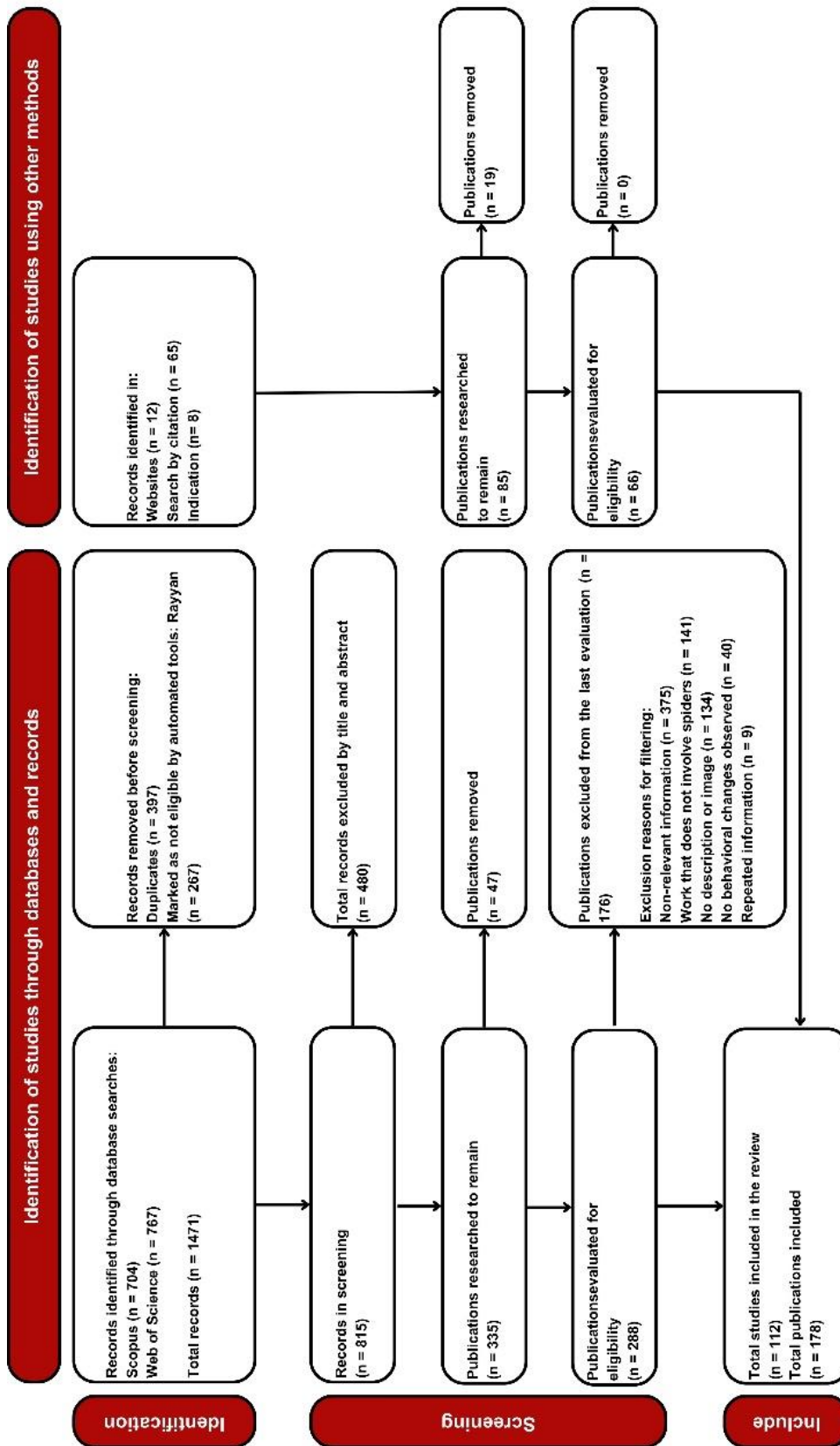


Figure S2. List of included records on systematic review. n = number of articles.

References

- APC A, Hill DE, Ramesh S, Hunchback flies (Diptera: Acroceridae) as endopredators of jumping spiders (Araneae: Salticidae). *Pecckhamia* 2022, **274**: 1-6.
- Adamo SA, Modulating the modulators: Parasites, neuromodulators and host behavioral change. *Brain, Behavior and Evolution* 2002; **60**: 370-377. doi:10.1159/000067790
- Adamo SA, Parasites: Evolution's neurobiologists, *Journal of Experimental Biology* 2013; **216**: 3-10. doi:10.1242/jeb.073601
- Adamo SA, Turning your victim into a collaborator: exploitation of insect behavioral control systems by parasitic manipulators, *Current Opinion in Insect Science* 2019; **33**: 25-29. doi:10.1016/j.cois.2019.01.004
- Adamo SA, Dividing up the bill: Interactions between how parasitoids manipulate host behaviour and who pays the cost. *Functional Ecology* 2022; **00**: 1-8. doi:10.1111/1365-2435.14150
- Adamo SA, Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). *Brain, Behavior, and Immunity* 2010; **24**: 194–200. doi:10.1016/j.bbi.2009.08.003
- Adamo SA, Kovalko I, Turnbull KF, *et al.*, The parasitic wasp *Cotesia congregata* uses multiple mechanisms to control host (*Manduca sexta*) behaviour, *Journal of Experimental Biology* 2016; **219**: 3750-3758. doi:10.1242/jeb.145300
- Andersen SB, Gerritsma S, Yusah, KM, *et al.*, The life of a dead ant: the expression of an adaptive extended phenotype, *The American Naturalist* 2009; **174**. doi:10.1086/603640
- Anotaux M, Marchal J, Châline N, *et al.*, Ageing alters spider orb-web construction. *Animal Behaviour* 2012; **84**: 1113-1121. doi:10.1016/j.anbehav.2012.08.017
- Arruda IDP, Villanueva-Bonilla GA, Faustino ML, *et al.*, Behavioral manipulation of the spider *Macrophyes pacoti* (Araneae: Anyphaenidae) by the araneopathogenic fungus *Gibellula* sp. (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Canadian Journal of Zoology* 2021; **99**: 401-408. doi:10.1139/cjz-2020-0232
- Barneche JA, Gillung JP, González A, Description and host interactions of a new species of *Exetasis walker* (Diptera: Acroceridae), with a key to species of the genus, *Zootaxa* 2013; **3664**: 525-536. doi:10.11646/zootaxa.3664.4.6
- Barrantes G, Eberhard WG, Extreme behavioral adjustments by an orb-web spider to restricted spaces, *Ethology* 2012; **118**: 438-449. doi:10.1111/j.1439-0310.2012.02029.x
- Barrantes G, Eberhard WG, Weng JL, Seasonal patterns of parasitism of the tropical spiders *Theridion evexum* (Araneae, Theridiidae) and *Allocyclosa bifurca* (Araneae, Araneidae) by the wasps *Zatypota petronae* and *Polysphincta gutfreundi* (Hymenoptera, Ichneumonidae), *International Journal of Tropical Biology* 2008; **56**: 749-754. doi:10.15517/rbt.v56i2.5621
- Barrantes G, Jiménez-Conejo N, Rojas-Malavasi G, *et al.*, *Messua* sp. (Salticidae), the Host Spider of the Polysphinctine *Inbioia pivai* (Ichneumonidae: Pimplinae), *Arachnology* 2019; **18**: 28-31. doi:10.13156/arac.2018.18.1.28

- Barrantes G, Quirós-Castegnaro A, Taylor-Rojas A, *et al.*, First record of an *Acanthepeira* spider (Araneae: Araneidae) parasitized by a koinobiont wasp of the Polysphincta genus group (Ichneumonidae: Pimplinae), *Arachnology* 2022; **19**: 628-633. doi:10.13156/arac.2022.19.3.628
- Barrantes G, Sandoval L, Hanson P, Cocoon web induced by *Eruga telljohanni* (Ichneumonidae: Pimplinae) in *Leucauge* sp. (Tetragnathidae), *Arachnology* 2017; **17**: 245-247. doi:10.13156/arac.2017.17.5.245
- Barrantes G, Segura-Hernández L, Solano-Brenes D, *et al.*, When a little is enough: Cocoon web of *Kapogea cyrtophoroides* (Araneae: Araneidae) induced by *Hymenoepimecis heidyae* (Ichneumonidae: Pimplinae), *Arachnologische Mitteilungen* 2018; **55**: 30-35. doi:10.30963/aramit5505
- Beckerson WC, Krider C, Mohammad UA, *et al.*, 28 minutes later: investigating the role of aflatrem-like compounds in *Ophiocordyceps* parasite manipulation of zombie ants, *Animal Behaviour* 2023; **203**: 225-240. doi:10.1016/j.anbehav.2023.06.011
- Benamú M, García LF, Viera C, *et al.*, Koinobiont life style of the spider wasp *Minagenia* (Hymenoptera, Pompilidae) and its consequences for host selection and sex allocation, *Zoology* 2020; **140**. doi:10.1016/j.zool.2020.125797
- Biron DG, Bonhomme L, Coulon M, *et al.*, Microbiomes, plausible players or not in alteration of host behaviour, *Frontiers in Microbiology* 2015; **5**: 775. doi:10.3389/fmicb.2014.00775
- Biron DG, Ponton F, Marché L, *et al.*, 'Suicide' of crickets harbouring hairworms: A proteomics investigation. *Insect Molecular Biology* 2006, **15**: 731-742. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00671.x
- Bonaric J, Effects of ecdysterone on the molting mechanisms and duration of the intermolt period in *Pisaura mirabilis* Cl. *General and Comparative Endocrinology* 1976; **30**: 267-212.
- Bonaric JC, De Reggil M. Changes in ecdysone levels in the spider *Pisaura mirabilis* nymphs (Araneae, Pisauridae), *Specialia* 1977; **33**: 1664-1665.
- Burke G, Strand M, Polydnviruses of parasitic wasps: domestication of viruses to act as gene delivery vectors. *Insects* 2012; **3**: 91-119. doi:10.3390/insects3010091
- Cady A, Leech R, Stratton G, *et al.*, Acrocerid (Insecta: Diptera) life histories, behaviors, host spiders (Arachnida: Araneidae), and distribution records, *The Canadian Entomologist* 1993; **125**: 931-944. doi:10.4039/Ent125931-5
- Cheng RC, Zhang S, Chen YC, *et al.*, Nutrient intake determines post-maturity molting in the golden orb-web spider *Nephila pilipes* (Araneae: Araneidae), *Journal of Experimental Biology* 2017; **220**: 2260-2264. doi:10.1242/jeb.153569
- Connat JL, Diehl P, Probable occurrence of ecdysteroid fatty acid esters in different classes of arthropods, *Insect Biochemistry* 1986; **16**: 91-97. doi:10.1016/0020-1790(86)90082-X
- Connat JL, Furst PA, Zweilin M, Detoxification of injected and ingested ecdysteroids in spiders. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 1988; **91B**: 257-265. doi:10.1016/0305-0491(88)90140-X
- Coyle MC, Elya CN, Bronski M, *et al.*, Entomophthovirus: An insect-derived iflavivirus that infects a behavior manipulating fungal pathogen of dipterans, *bioRxiv* 2018. doi:10.1101/371526

- Da Silva Souza H, Messas YF, Masago F, *et al.*, *Paracyphononyx scapulatus* (Hymenoptera, Pompilidae), a koinobiont ectoparasitoid of *Trochosa* sp. (Araneae, Lycosidae), *Journal of Hymenoptera Research* 2015; **46**: 165-172. doi:10.3897/JHR.46.5833
- Dai ML, Ye WT, Jiang XJ, *et al.*, Effect of tachinid parasitoid *Exorista japonica* on the larval development and pupation of the host silkworm *Bombyx mori*, *Frontiers in Physiology* 2022; **13**. doi:10.3389/fphys.2022.824203
- Dawkins R, *The Extended Phenotype*, Oxford: Oxford University Press, 1982.
- Debat H, An RNA virome associated to the golden orb-weaver spider *Nephila clavipes*, *Frontiers in Microbiology* 2017; **8**. doi: 10.3389/fmicb.2017.02097
- Dheilly NM, Maure F, Ravallec M, *et al.*, Who is the puppet master? Replication of a parasitic wasp-associated virus correlates with host behaviour manipulation, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2015; **282**: 1-10. doi:10.1098/rspb.2014.2773
- Durkin ES, Cassidy ST, Gilbert R, *et al.*, Parasites of spiders: their impacts on host behavior and Ecology, *Journal of Arachnology* 2021; **49**: 281-298. doi:10.1636/JoA-S-20-087
- Eason RR, Peck WB, Whitcomb WH, Notes on spider parasites, including a reference list, *Journal of the Kansas Entomological Society* 1967; **40**: 422-434.
- Eberhard WG, Spider manipulation by a wasp larva, *Nature* 2000; **406**: 255-2056. doi:10.1038/35018636
- Eberhard WG, Under the influence: Webs and building behavior of *Plesiometa argyra* (Araneae, Tetragnathidae) when parasitized by *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera, Ichneumonidae), *Journal of Arachnology* 2001; **29**: 354-366. doi:10.1636/0161-8202(2001)029[0354:utiwab]2.0.co;2
- Eberhard WG, New types of behavioral manipulation of host spiders by a parasitoid wasp, *Psyche* 2010; 1-4. doi:10.1155/2010/950614
- Eberhard WG, Recovery of spiders from the effects of parasitic wasps: implications for fine-tuned mechanisms of manipulation. *Animal Behaviour* 2010; **79**: 375-383. doi:10.1016/j.anbehav.2009.10.033
- Eberhard WG, The polysphinctine wasps *Acrotaphus tibialis*, *Eruga* ca. *gutfreundi*, and *Hymenoepimecis tedfordi* (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) induce their host spiders to build modified webs. *Annals of the Entomological Society of America* 2013; **106**: 652-660. doi:10.1603/AN12147
- Eberhard WG, Hunting behavior of the wasp *Polysphincta gutfreundi* and related Polysphinctine wasps (Hymenoptera, Ichneumonidae), *Journal of the Kansas Entomological Society* 2019; **91**: 177-191. doi:10.2317/0022-8567-91.3.177
- Eberhard WG, Zombie spiders and ecdysone: Manipulation of *Allocyclosa bifurca* (Araneae: Araneidae) behavior by a parasitic wasp, *Journal of Arachnology* 2021; **49**: 250-252. doi:10.1636/JoA-S-19-046
- Eberhard WG, The natural history and behaviour of *Hymenoepimecis argyraphaga* (Hymenoptera: Ichneumonidae) a parasitoid of *Plesiometa argyra* (Araneae: Tetragnathidae), *Journal of Hymenopteran Research* 2000; **9**: 220-240.
- Eberhard WG, Gonzaga MO, Evidence that Polysphincta-group wasps (Hymenoptera: Ichneumonidae) use ecdysteroids to manipulate the web-construction behaviour

- of their spider hosts, *Biological Journal of the Linnean Society* 2019; **127**: 429–471. doi:10.1093/biolinnean/blz044/5480918
- Eggleton P, Belshaw R, Insect parasitoids: an evolutionary overview, *Philosophical Transactions - Royal Society of London, B* 1992; **337**: 1-20. doi:10.1098/rstb.1992.0079
- El-Hennawy HK, A spider (*Lycosa?* sp.) (Araneida: Lycosidae) providing a shelter for its predator *Paracyphononyx ruficrus* (Klug, 1834) (Hymenoptera: Pompilidae), *Revue Suisse de Zoologie* 1996; 185-188.
- Feener D, Brown B, Diptera as parasitoids, *Annual Review of Entomology* 1997; **42**: 73-97. doi:10.1146/annurev.ento.42.1.73
- Fernandez-Fournier P, Straus S, Sharpe R, *et al.*, Behavioural modification of a social spider by a parasitoid wasp, *Ecological Entomology* 2019; **44**: 157-162. doi:10.1111/een.12698
- Fritzén N, Two new species of the Polysphincta genus-group (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae) reared from their spider (Araneae) hosts in Europe, *Zootaxa* 2014; **3894**: 117-130. doi:10.11646/zootaxa.3894.1.9
- Gabellone CS, Barneche JA, González A, Interaction between *Epipompilus platensis* (Hymenoptera: Pompilidae) and *Ariadna mollis* (Araneae: Segestridae), *Revista Peruana de Biología* 2020; **27**: 183-188. doi:10.15381/rpb.v27i2.16932
- Gaione-Costa A, Pádua DG, Delazari IM, *et al.*, Redescription and oviposition behavior of an orb-weaver spider parasitoid *Hymenoepimecis cameroni* Townes, 1966 (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Zootaxa* 2022; **5134**: 415-425. doi:10.11646/zootaxa.5134.3.5
- Gauld ID, Dubois J, Phylogeny of the Polysphincta group of genera (Hymenoptera: Ichneumonidae; Pimplinae): A taxonomic revision of spider ectoparasitoids, *Systematic Entomology* 2006; **31**: 529-564. doi:10.1111/j.1365-3113.2006.00334.x
- Gillung J, Family Acroceridae, *Zootaxa* 2016; **4122**: 346-349. doi:10.11646/zootaxa.4122.1.28
- Gillung JP, Borkent CJ, Death comes on two wings: A review of dipteran natural enemies of arachnids, *Journal of Arachnology* 2017; **45**: 1-19. doi:10.1636/JoA-S-16-085.1
- Gonzaga MO, Sobczak JF, Parasitoid-induced mortality of *Araneus omnicolor* (Araneae, Araneidae) by *Hymenoepimecis* sp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) in southeastern Brazil, *Naturwissenschaften* 2007, **94**: 223-227. doi:10.1007/s00114-006-0177-z
- Gonzaga MO, Sobczak JF, Behavioral manipulation of the orb-weaver spider *Argiope argentata* (Araneae: Araneidae) by *Acrotaphus chedelae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Entomological Science* 2011; **14**: 220-223. doi:10.1111/j.1479-8298.2010.00436.x
- Gonzaga MO, Kloss TG, Sobczak JF, Host behavioural manipulation of spiders by ichneumonid wasps, *Behaviour and Ecology of Spiders: Contributions from the Neotropical Region*, Springer International Publishing, 2017; 417-437. doi:10.1007/978-3-319-65717-2_16
- Gonzaga MO, Loffredo APS, Penteadó-Dias A, *et al.*, Host behavior modification of *Achaearanea tingo* (Araneae: Theridiidae) induced by the parasitoid wasp

- Zatypota alborhombarta* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Entomological Science* 2016; **19**: 133-137. doi:10.1111/ens.12178
- Gonzaga MO, Pádua DG, Quero A, Inclusion of an alien species in the host range of the Neotropical parasitoid *Hymenoepimecis bicolor* (Brullé, 1846) (Hymenoptera, Ichneumonidae), *Journal of Hymenoptera Research* 2022; **89**: 9-18. doi:10.3897/jhr.89.76620
- Gonzaga MO, Rios-Moura R, Teixeira-Pêgo P, *et al.*, Changes to web architecture of *Leucauge volupis* (Araneae: Tetragnathidae) induced by the parasitoid *Hymenoepimecis jordanensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Behaviour* 2015; **152**: 181-193. doi:10.1163/1568539X-00003238
- Gonzaga MO, Sobczak JF, Penteadó-Dias AM, *et al.*, Modification of *Nephila clavipes* (Araneae Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and *H. robertsae* (Hymenoptera Ichneumonidae), *Ethology Ecology and Evolution* 2010; **22**: 151-165. doi:10.1080/03949371003707836
- Heil M, Host manipulation by parasites: cases, patterns, and remaining doubts, *Frontiers in Ecology and Evolution* 2016; **80**: 1-15. doi:10.3389/fevo.2016.00080
- Herbison RE, 2017. Lessons in mind control: trends in research on the molecular mechanisms behind parasite-host behavioral manipulation, *Frontiers in Ecology and Evolution* 2017; **102**: 1-15. doi:10.3389/fevo.2017.00102
- Herbison RE, Lagrue C, Poulin R, The missing link in parasite manipulation of host behaviour, *Parasites and Vectors* 2018; **11**. doi:10.1186/s13071-018-2805-9
- Higgins L, Variation in foraging investment during the intermolt interval and before egg-laying in the spider *Nephila clavipes* (Araneae: Araneidae), *Journal of Insect Behavior* 1990; **3**: 773–783. doi:10.1007/BF01065965
- Hill AJ, Mansfield R, Lopez JM, *et al.*, Cellular stress induces a protective sleep-like state in *C. elegans*, *Current Biology* 2014; **24**: 2399–2405. doi:10.1016/j.cub.2014.08.040
- Hill DE, P.C.A. A, Krishna P, *et al.*, Construction of orb webs as nocturnal retreats by jumping spiders (Araneae: Salticidae: cf. Anarrhotus) in southwestern India, *Peckhamia* 2019; **182.2**: 1-13.
- Honda Y, Ishiguro W, Ogihara M, *et al.*, Identification and expression of nuclear receptor genes and ecdysteroid titers during nymphal development in the spider *Agelena silvatica*, *General and Comparative Endocrinology* 2017; **247**: 183-198. doi:10.1016/j.ygcen.2017.01.032
- Hoover K, Grove M, Gardner M, *et al.*, A gene for an extended phenotype, *Science* 2011; **333**: 1401. doi:10.1126/science.1209199
- Howell JO, Pienkowski RL, Notes on the biology of a spider parasite *Colpomeria kincaidii* Ashmead (Hymenoptera : Ichneumonidae), *Entomophaga* 1972; **17**: 5-7. doi:10.1007/BF02371069
- Hrček J, McLean A, Godfray H, Symbionts modify interactions between insects and natural enemies in the field, *Journal of Animal Ecology* 2016; **85**: 1605-1612. doi:10.1111/1365-2656.12586
- Hughes DP, Araújo JPM, Loreto RG, *et al.*, From so simple a beginning. The evolution of behavioral manipulation by fungi, *Advances in Genetics* 2016; **94**: 437-469. doi:10.1016/bs.adgen.2016.01.004

- Jensen CH, Weidner J, Giske J, *et al.*, Adaptive host responses to infection can resemble parasitic manipulation, *Ecology and Evolution* 2023; **13**: e10318. doi:10.1002/ece3.10318
- Johnson D, Sung GH, Hywel-Jones NL, *et al.*, Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota), *Mycological Research* 2009; **113**: 279-289. doi:10.1016/j.mycres.2008.09.008
- Kehlmaier C, Almeida J, New host records for European Acroceridae (Diptera), with discussion of species limits of *Acrocer orbiculus* (Fabricius) based on DNA-barcoding, *Zootaxa* 2014; **3780**: 135-152. doi:10.11646/zootaxa.3780.1.5
- Kehlmaier C, Michalko R, Korenko S, *Ogcodes fumatus* (Diptera: Acroceridae) reared from *Philodromus cespitum* (Araneae: Philodromidae), and first evidence of *Wolbachia alphasproteobacteria* in acroceridae, *Annales Zoologici* 2012; **62**: 281-286. doi:10.3161/000345412X652819
- Kloss TG, Gonzaga MO, Mendes-Pereira T, *et al.*, Deluded zombies: induced behavioral modification in a cobweb spider does not increase the survival of its parasitoid wasp, *Behavioral Ecology and Sociobiology* 2024; **78**: 13. doi:10.1007/s00265-024-03428-9
- Kloss TG, Gonzaga MO, De Oliveira LL, *et al.*, Proximate mechanism of behavioral manipulation of an orb-weaver spider host by a parasitoid wasp. *PLoS ONE* 2017; **12**: e0171336. doi:10.1371/journal.pone.0171336
- Kloss TG, Gonzaga MO, Roxinol JAM, *et al.*, Host behavioural manipulation of two orb-weaver spiders by parasitoid wasps, *Animal Behaviour* 2016; **111**: 289-296. doi:10.1016/j.anbehav.2015.11.001
- Kloss TG, Pádua DG, Almeida S, *et al.*, A new Darwin wasp (Hymenoptera: Ichneumonidae) and new records of behavioral manipulation of the host spider *Leucauge volupis* (Araneae: Tetragnathidae), *Neotropical Entomology* 2022; **51**: 821-829. doi:10.1007/s13744-022-00991-6
- Kloss TG, Pádua DG, Lacerda FG, *et al.*, Suppression of orb-web building behavior of the spider *Metazygia laticeps* (O. Pickard-Cambridge, 1889) (Araneae: Araneidae) by a new parasitoid wasp, *Zoologischer Anzeiger* 2018; **276**: 100-106. doi:10.1016/j.jcz.2018.06.005
- Korenko S, Web architecture alteration of the orb web weaving spider *Metellina merianae* (Araneae, Tetragnathidae) induced by the parasitoid *Megaetaira madida* (Ichneumonidae, Polysphincta group), *Arachnologische Mitteilungen* 2016; **52**: 35-37. doi:10.5431/aramit5207
- Korenko S, First record from Italy of *Zatypota anomala* (Ichneumonidae, Ephialtini), a parasitoid of the cribellate spider *Dictyna pusilla* (Araneae, Dictynidae), *Arachnologische Mitteilungen* 2017; **54**: 1-4. doi:10.5431/aramit5401
- Korenko S, Pekár S, A parasitoid wasp induces overwintering behaviour in its spider host, *PLoS ONE* 2011; **6**: 1-5. doi:10.1371/journal.pone.0024628
- Korenko S, Černecká L, Dorková M, *et al.*, *Sinarachna nigricornis* and genus-specific host utilization of *Araneus* spiders by the genus *Sinarachna* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Journal of Arachnology* 2022; **50**: 51-55. doi:10.1636/JoA-S-21-012
- Korenko S, Hamouzová K, Kysilková K, *et al.*, Divergence in host utilisation by two spider ectoparasitoids within the genus *Eriostethus* (Ichneumonidae, Pimplinae), *Zoologischer Anzeiger* 2017; **272**: 1-5. doi:10.1016/j.jcz.2017.11.006

- Korenko S, Isaia M, Satrapová J, *et al.*, Parasitoid genus-specific manipulation of orb-web host spiders (Araneae, Araneidae), *Ecological Entomology* 2014; **39**: 30-38. doi:10.1111/een.12067
- Korenko S, Korenková B, Satrapová J, *et al.*, Modification of *Tetragnatha montana* (Araneae, Tetragnathidae) web architecture induced by larva of the parasitoid *Acrodactyla quadrisculpta* (Hymenoptera, Ichneumonidae, Polysphincta genus-group), *Zoological Studies* 2015; **54**: 1-7. doi:10.1186/2Fs40555-015-0119-6
- Korenko S, Kysilková K, Černecká L, Further records of two spider-parasitoids of the genus *Polysphincta* (Hymenoptera, Ichneumonidae, Ephialtini) from Central Europe, with notes on their host interactions, *Arachnologische Mitteilungen* 2017; **54**: 28-32. doi:10.5431/aramit5406
- Korenko S, Michalková V, Zwakhals K, *et al.*, Host specificity and temporal and seasonal shifts in host preference of a web-spider parasitoid *Zatypota percontatoria*, *Journal of Insect Science* 2011; **101**: 1-12. doi:10.1673/031.011.10101
- Korenko S, Potopová V, Satrapová J, *et al.*, Life history of the spider parasitoid *Zatypota percontatoria* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Entomological Science* 2016; **19**: 104-111. doi:10.1111/ens.12171
- Korenko S, Satrapová J, Zwakhals K, Manipulation of araneid spider web architecture by the polysphinctine parasitoid *Zatypota picticollis* (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae), *Entomological Science* 2015; **18**: 383-388. doi:10.1111/ens.12132
- Korenko S, Schmidt S, Schwarz M, *et al.*, Hymenopteran parasitoids of the ant-eating spider *Zodarion styliferum* (Simon) (Araneae, Zodariidae), *ZooKeys* 2013, **262**: 1-15. doi:10.3897/zookeys.262.3857
- Korenko S, Spasojevic T, Pekár S, *et al.*, One generalist or several specialist species? Wide host range and diverse manipulations of the hosts' web-building behaviour in the true spider parasitoid *Zatypota kauros* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Insect Conservation and Diversity* 2018; **11**: 587-599. doi:10.1111/icad.12307
- Krishnakumaran A, Schneiderman H, Chemical control of moulting in arthropods, *Nature* 1968; **220**: 601-603. doi:10.1038/220601a0
- Krishnakumaran A, Schneiderman HA, Control of molting in mandibulate and chelicerate arthropods, *Biological Bulletin* 1970; **139**: 520-538. doi:10.2307/1540371
- Kuephadunphan W, Petcharad B, Tasanathai K, *et al.*, Multi-locus phylogeny unmasks hidden species within the specialised spider-parasitic fungus, *Gibellula* (Hypocreales, Cordycipitaceae) in Thailand, *Studies in Mycology* 2022; **101**: 245-286. doi:10.3114/sim.2022.101.04
- Kuephadunphan W, Tasanathai K, Petcharad B, *et al.*, Phylogeny- and morphology-based recognition of new species in the spider-parasitic genus *Gibellula* (Hypocreales, Cordycipitaceae) from Thailand, *MycKeys* 2020; **72**: 17-42. doi:10.3897/mycokeys.72.55088
- Lafferty KD, Shaw JC, Comparing mechanisms of host manipulation across host and parasite taxa, *The Journal of Experimental Biology* 2013; **216**: 56-66. doi:10.1242/jeb.073668

- Laufer H, Biggers W, Unifying concepts learned from Methyl Farnesoate for invertebrate reproduction and post-embryonic development, *American Zoologist* 2001; **41**: 442-457. doi:10.1668/0003-1569(2001)041[0442:UCLFMF]2.0.CO;2
- Lefèvre T, Adamo SA, Biron D, *et al.*, Invasion of the body snatchers: the diversity and evolution of manipulative strategies in host-parasite interactions, *Advances in Parasitology* 2009; **68**: 45-83. doi:10.1016/s0065-308x(08)00603-9
- Libersat F, Delago A, Gal R, Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites, *The Annual Review of Entomology* 2009; **54**: 189 - 207. doi:10.1146/annurev.ento.54.110807.090556
- Libersat F, Kaiser M, Emanuel S, Mind control: how parasites manipulate cognitive functions in their insect hosts, *Frontiers in Psychology* 2018; **9**. doi:10.3389/fpsyg.2018.00572
- Lidsky P, Andino R, Could aging evolve as a pathogen control strategy?, *Trends in Ecology and Evolution* 2022; **37**: 1046-1057. doi:10.1016/j.tree.2022.08.003
- Lovett B, Leger RJS, Licht HHdF, Going gentle into that pathogen-induced goodnight, *Journal of Invertebrate Pathology* 2020; **174**: e107398. doi:10.1016/j.jip.2020.107398
- MacWilliam D, Arensburger P, Higa J, *et al.*, 2015. Behavioral and genomic characterization of molt-sleep in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2015; **62**: 154-167. doi:10.1016/j.ibmb.2015.01.012
- Mangold CA, Ishler MJ, Loreto RG, *et al.*, Zombie ant death grip due to hypercontracted mandibular muscles, *Journal of Experimental Biology* 2019; **222**: jeb200683. doi:10.1242/jeb.200683
- Mangold CA, Hughes DP, Insect behavioral change and the potential contributions of neuroinflammation—a call for future research, *Genes* 2021; **12**: 465. doi:10.3390%2Fgenes12040465
- Masumoto T, Shimizu I, Konishi K, The first record of parasitism on *Neoscona scyuoides* (Araneae: Araneidae) by *Eriostethus rufus* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Acta Arachnologica* 2002; **51**: 5-6. doi:10.2476/asjaa.51.5
- Matsumoto R, "Veils" against predators: modified web structure of a host spider induced by an ichneumonid parasitoid, *Brachyzapus nikkoensis* (Uchida) (Hymenoptera), *Journal of Insect Behavior* 2009; **22**: 39-48. doi:10.1007/s10905-008-9152-1
- Matsumoto R, Konishi K, Life histories of two ichneumonid parasitoids of *Cyclosa octotuberculata* (Araneae): *Reclinervellus tuberculatus* (Uchida) and its new sympatric congener (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae), *Entomological Science* 2007; **10**: 267-278. doi:10.1111/j.1479-8298.2007.00223.x
- Matsumoto R, Takasuka K, A revision of the genus *Zatypota* Förster of Japan, with descriptions of nine new species and notes on their hosts (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae), *Zootaxa* 2010; **2522**: 1-43. doi:10.11646/zootaxa.2522.1.1
- Maure F, Brodeur J, Hughes D, *et al.*, How much energy should manipulative parasites leave to their hosts to ensure altered behaviours?, *Journal of Experimental Biology* 2013; **216**: 43-46. doi:10.1242/jeb.073163

- McGinley R, Mendez V, Taylor P, Natural history and display behaviour of *Servaea incana*, a common and widespread Australian jumping spider (Araneae:Salticidae), *Australian Journal of Zoology* 2015; **63**: 300-319. doi:10.1071/ZO15032
- Mendes-Pereira T, Araújo JPM, Kloss TG, *et al.*, Disentangling the taxonomy, systematics, and life history of the spider-parasitic fungus *Gibellula* (Cordycipitaceae, Hypocreales), *Journal of Fungi* 2023; **9**: 457. doi:10.3390/jof9040457
- Mendes-Pereira T, Araújo JPM; Mendes FC, *et al.*, *Gibellula aurea* sp. nov. (Ascomycota, Cordycipitaceae): a new golden spider-devouring fungus from a Brazilian Atlantic Rainforest, *Phytotaxa* 2022; **573**: 85-102. doi:10.11646/phytotaxa.573.1.5
- Messas YF, Sobczak J, Vasconcellos-Neto J, An alternative host of *Hymenoepimecis japi* (Hymenoptera, Ichneumonidae) on a novel family (Araneae, Araneidae), with notes on behavioral manipulations, *Journal of Hymenoptera Research* 2017; **60**: 111-118. doi:10.3897/jhr.60.14817
- Miller J, Belgers J, Beentjes K, *et al.*, Spider hosts (Arachnida, Araneae) and wasp parasitoids (Insecta, Hymenoptera, Ichneumonidae, Ephialtini) matched using DNA barcodes, *Biodiversity Data Journal* 2013; **1**. doi:10.3897/BDJ.1.e992
- Moen C, Chadwick Johnson J, Price JH, Ecdysteroid responses to urban heat island conditions during development of the western black widow spider (*Latrodectus hesperus*), *PLoS ONE* 2022; **17**. doi:10.1371/journal.pone.0267398
- Mohan P, Sinu PA, Is direct bodyguard manipulation a parasitoid-induced stress sleep? A new perspective, *Biology Letters* 2022; **18**: 1-7. doi:10.1098/rsbl.2022.0280
- Mongkolsamrit S, Noisripoom W, Thanakitpipattana D, *et al.*, Disentangling cryptic species with *Isaria*-like morphs in Cordycipitaceae, *Mycologia* 2018; **110**: 230-257. doi:10.1080/00275514.2018.1446651
- Moore J, *Parasites and the behaviour of animals*, Oxford University Press, 2002.
- Nicewicz A, Sawadro M, Nicewicz Ł, *et al.*, Juvenile hormone in spiders. Is this the solution to a mystery?, *General and Comparative Endocrinology* 2021; **308**. doi:10.1016/j.ygcen.2021.113781
- Nielsen BO, Funch P, Toft S, Self-injection of a dipteran parasitoid into a spider, *Naturwissenschaften* 1999; **86**: 530-532. doi:10.1007/s001140050668
- Pádua DG, Kloss TG, A new species of *Acrotaphus* Townes (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae) from the Brazilian Amazon, with notes on its host spider behavioral modification, *Zootaxa* 2020; **4810**: 161-168. doi:10.11646/zootaxa.4810.1.10
- Pádua DG, Salvatierra L, Sobczak JF, *et al.*, Parasitism of *Hymenoepimecis manauara* Pádua & Oliveira (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae) on *Leucauge henryi* Mello-Leitão (Araneae: Tetragnathidae) in Brazilian Amazonian, *Biodiversity Data Journal* 2016; **4**. doi:10.3897/BDJ.4.e11219
- Pasquet A, Toscani C, Anotaux M, Influence of aging on brain and web characteristics of an orb web spider, *Journal of Ethology* 2018; **36**: 85-91. doi:10.1007/s10164-017-0530-z

- Pekár S, Lubin Y, *Pax islamita* (Araneae: Zodariidae) as a new host of an acrocerid fly from Israel, *Arachnologische Mitteilungen* 2020; **59**: 5-7. doi:10.30963/aramit5902
- Pereira L, Villanueva-Bonilla GA, Azevedo R, *et al.*, (12 de 2022). Behavioral manipulation in two sheet web weaver-spider by the parasitoid wasp, *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, 2018 (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Entomological Science* 2022; **25**. doi:10.1111/ens.12523
- Perrot-Minnot M, Cézilly F, Investigating candidate neuromodulatory systems underlying parasitic manipulation: concepts, limitations and prospects, *Journal of Experimental Biology* 2013; **216**: 134-141. doi:10.1242/jeb.074146
- Pollard SD, *Epipompilus insularis* (Hymenoptera: Pompilidae), a parasitoid of hunting spiders, *New Zealand Journal of Zoology* 1982; **9**: 37-39. doi:10.1080/03014223.1982.10423835
- Ponton F, Lefevre T, Lebarbenchon C, *et al.*, Do distantly related parasites rely on the same proximate factors to alter the behaviour of their hosts?, *Proceedings of Royal Society B* 2006; **273**: 2869 - 2877. doi:10.1098/rspb.2006.3654
- Poulin R, Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions, *In: Brockmann HJ, et al., Advances in the Study of Behavior*, Burlington: Academic Press, 2010; **41**: 151-186. doi:10.1016/S0065-3454(10)41005-0
- Poulin R, Parasite manipulation of host personality and behavioural syndromes, *Journal of Experimental Biology* 2013; **216**: 18-26. doi:10.1242/jeb.073353
- Poulin R, Maure F, Host manipulation by parasites: a look back before moving forward, *Trends in Parasitology* 2015; **31**: 563-570. doi:10.1016/j.pt.2015.07.002
- Poulin R, Jorge F, Salloum PM, Inter-individual variation in parasite manipulation of host phenotype: a role for parasite microbiomes?, *Journal of Animal Ecology* 2022; **00**: 807-812. doi:10.1111/1365-2656.13764
- Qu Z, Bendena W, Tobe S, *et al.*, Juvenile hormone and sesquiterpenoids in arthropods: biosynthesis, signaling, and role of MicroRNA. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2018; **184**: 69-76. doi:10.1016/j.jsbmb.2018.01.013
- Rößler DC, De Agrò M, Biundo E, *et al.*, Hanging by a thread: unusual nocturnal resting behaviour in a jumping spider, *Frontiers in Zoology* 2021; **18**. doi:10.1186/s12983-021-00410-3
- Savić D, Grbić G, Bošković E, *et al.*, First records of fungi pathogenic on spiders for the Republic of Serbia, *Arachnologische Mitteilungen* 2016; **52**: 31-34. doi:10.5431/aramit5206
- Sawadro M, Bednarek A, Babczyńska A, The current state of knowledge on the neuroactive compounds that affect the development, mating and reproduction of spiders (Araneae) compared to insects, *Invertebrate Neuroscience* 2017; **17**. doi:10.1007/s10158-017-0197-8
- Schlinger EI, (1987). The Biology of Acroceridae (Diptera): true endoparasitoids of spiders, *Ecophysiology of Spiders*, Springer-Verlag, 1987; 319-330. doi:10.1007/978-3-642-71552-5
- Schmitt M, Richter D, Göbel D, *et al.*, Observations on the parasitism of orb-weaving spiders (Araneidae) by *Polysphincta rufipes* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Arachnologische Mitteilungen* 2012; **44**: 1-6. doi:10.5431/aramit4401

- Selçuk F, Hüseyin E, Gaffaroğlu M, Occurrence of the araneogenous fungus *Gibellula pulchra* in Turkey, *Mycologia Balcanica* 2004; **1**: 61 - 62.
doi:10.5281/zenodo.2545819
- Shrestha B, Kubátová A, Tanaka E, *et al.*, Spider-pathogenic fungi within Hypocreales (Ascomycota): their current nomenclature, diversity, and distribution, *Mycological Progress* 2019; **18**: 983-1003. doi:10.1007/s11557-019-01512-3
- Sobczak JF, Loffredo APS, Carmargo LF, *et al.*, *Hymenoepimecis neotropica* (Brues & Richardson) (Hymenoptera, Ichneumonidae, Pimplinae) parasitoid of *Araneus omnicolor* (Keyserling)(Araneae, Araneidae): first host record and new occurrence to Brazil, *Revista Brasileira de Entomologia* 2012; **56**: 390-392.
doi:10.1590/S0085-56262012005000055
- Sobczak JF, Pádua DG, Villanueva-Bonilla GA, *et al.*, Two new species of *Zatypota* (Hymenoptera: Ichneumonidae, Pimplinae) sharing the same host spider in Northeast Brazil, *Zootaxa* 2019; **4609**: 169-177. doi:10.11646/zootaxa.4609.1.9
- Sobczak JF, Loffredo APS, Penteado-Dias AM, Parasitism on *Araneus venatrix* (Koch, 1838) (Araneae: Araneidae) by *Hymenoepimecis silvanae* Loffredo and Penteado-Dias, 2009 (Ichneumonidae, Pimplinae) with description of male of the wasp, *Brazilian Journal of Biology* 2012; **72**: 221-223. doi: 10.1590/S1519-69842012000100028
- Sobczak JF, Loffredo APS, Penteado-Dias AM, *et al.*, Two new species of *Hymenoepimecis* (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae) with notes on their spider hosts and behaviour manipulation, *Zootaxa* 2009; **43**: 2691-2699.
doi:10.1080/00222930903244010
- Sobczak JF, Messas YF, Pádua DG, Parasitism of *Zatypota riverai* Gauld (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae) on *Anelosimus baeza* Agnarsson (Araneae: Theridiidae) in northeast Brazil, with a description of the male, *Zootaxa* 2017; **4247**: 78-82. doi:10.11646/zootaxa.4247.1.11
- Sobczak JF, Pádua DG, Costa L, *et al.*, The parasitoid wasp *Eruga unilabiana* Pádua & Sobczak, sp. nov. (Hymenoptera: Ichneumonidae) induces behavioral modification in its spider host, *Entomological Science* 2017; **21**: 59-65.
doi:10.1111/ens.12278
- Sobczak J, Arruda IDP, Pádua DG, *et al.*, Parasitism in *Theridion* sp. (Araneae: Theridiidae) by *Zatypota riverai* Gauld, 1991 (Hymenoptera: Ichneumonidae: Pimplinae), *Journal of Arachnology* 2019; **47**: 266-270. doi:10.1636/JoA-S-18-103
- Sobczak JF, Sobczak, JCMSM, Messas YF, *et al.*, A new record of a host-parasitoid interaction: *Hymenoepimecis veranii* Loffredo & Penteado-Dias, 2009 (Hymenoptera: Ichneumonidae) parasitizing *Araneus orgaos* Levi, 1991 (Araneae: Araneidae), *Journal of Insect Behavior* 2014; **27**: 753-758.
doi:10.1007/s10905-014-9467-z
- Sobczak JF, Villanueva-Bonilla GA, Pádua DG, *et al.*, The wasp *Flacopimpla varelae* Gauld (Ichneumonidae: Pimplinae), parasitoid of the spider *Achaearanea tingo* Levi (Theridiidae: Theridiinae), with description of the male wasp, *Zootaxa* 2017; **4365**: 594-599. doi:10.11646/zootaxa.4365.5.7
- Strand M, Burke G, Polydnaviruses: Nature's genetic engineers, *Annual Review of Virology* 2014; **1**: 333-354. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085451

- Sýkora J, Barták M, Heneberg P, *et al.*, Evolutionary aspects of the parasitoid life strategy, with a particular emphasis on fly–spider interactions, *Biological Journal of the Linnean Society* 2022; **137**: 569–582. doi:10.1093/biolinnean/blac113
- Takasuka K, *Cyclosa omonaga* (Araneae: Araneidae), an alternative host of the spider ectoparasitoid *Reclinervellus nielsenii* (Hymenoptera: Ichneumonidae), with notes on behavioural manipulation, *Arachnology* 2018; **17**: 406-409. doi:10.13156/arac.2017.17.8.406
- Takasuka K, Evaluation of manipulative effects by an ichneumonid spider-ectoparasitoid larva upon an orb-weaving spider host (Araneidae: *Cyclosa argenteoalba*) by means of surgical removal and transplantation, *Journal of Arachnology* 2019; **47**: 181-189. doi:10.1636/JoA-S-18-082
- Takasuka K, The second record of *Allagelena opulenta* (Araneae, Agelenidae) parasitized by the spider-ectoparasitoid, *Brachyzapus nikkoensis* (Hymenoptera, Ichneumonidae), *Acta Arachnologica* 2019; **68**: 77-80. doi:10.2476/asjaa.68.77
- Takasuka K, Broad GR, A bionomic overview of spider parasitoids and pseudo-parasitoids of the ichneumonid wasp subfamily Pimplinae, *Contributions to Zoology* 2024; 1-106. doi:10.1163/18759866-bja10053
- Takasuka K, Watanabe K, New records of *Zatypota albicoxa* (Hymenoptera, Ichneumonidae) and its potential host spider *Parasteatoda tepidariorum* (Araneae, Theridiidae) from Vietnam, *Japanese Journal of systematic Entomology* 2012; **18**: 447-450.
- Takasuka K, Korenko S, Kysilková K, *et al.*, Host utilization of koinobiont spider-ectoparasitoids (Ichneumonidae, Ephialtini, Polysphincta genus-group) associated with *Cyclosa* spp. (Araneae, Araneidae) across the Palaearctic, *Zoologischer Anzeiger* 2017; **267**: 8-14. doi:10.1016/j.jcz.2017.01.001
- Takasuka K, Matsumoto R, Ohbayashi N, Oviposition behavior of *Zatypota albicoxa* (Hymenoptera, Ichneumonidae), an ectoparasitoid of *Achaearanea tepidariorum* (Araneae, Theridiidae), *Entomological Science* 2009; **12**: 232-237. doi:10.1111/j.1479-8298.2009.00338.x
- Takasuka K, Yasui T, Ishigami T, *et al.*, Host manipulation by an ichneumonid spider ectoparasitoid that takes advantage of preprogrammed web-building behaviour for its cocoon protection, *Journal of Experimental Biology* 2015; **218**: 2326-2332. doi:10.1242/jeb.122739
- Takasuka K, Yoshida H, Nugroho P, *et al.*, A new record of *Zatypota albicoxa* (Hymenoptera: Ichneumonidae) from Indonesia, with description of a new species of its host spider (Araneae: Theridiidae), *Zootaxa* 2011; **2910**: 63–68. doi:10.11646/zootaxa.2910.1.3
- Terashima J, Takaki K, Sakurai S, *et al.*, Nutritional status affects 20-hydroxyecdysone concentration and progression of oogenesis in *Drosophila melanogaster*, *Journal of Endocrinology* 2005; **187**: 69-79. doi:10.1677/joe.1.06220
- Thomas F, Adamo SA, Moore J, Parasitic manipulation: Where are we and where should we go?, *Behavioural Processes* 2005, **68**: 185-199. doi:10.1016/j.beproc.2004.06.010
- Thomas F, Poulin R, Brodeur J, Host manipulation by parasites: A multidimensional phenomenon, *Oikos* 2010; **119**: 1217-1223. doi:10.1111/j.1600-0706.2009.18077.x

- Toft S, Nielsen B, Funch P, Parasitoid suppression and life-history modifications in a wolf spider following infection by larvae of an acrocerid fly, *Journal of Arachnology* 2012; **40**: 13-17. doi:10.1636/P11-28.1
- Trabalon M, Pourié G, Hartmann N, Relationships among cannibalism, contact signals, ovarian development and ecdysteroid levels in *Tegenaria atrica* (Araneae, Agelenidae), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1998; **28**: 751-758. doi:10.1016/S0965-1748(98)00066-6
- Van Houte S, Ros V, Van Oers M, Walking with insects: Molecular mechanisms behind parasitic manipulation of host behaviour. *Molecular Ecology* 2013; **22**: 3458-3475. doi:10.1111/mec.12307
- Villanueva-Bonilla GA, Brescovit AD, dos Santos EF, *et al.*, First record of *Epipompilus excelsus* (Bradley, 1944) (Hymenoptera, Pompilidae) as a koinobiont ectoparasitoid of *Ariadna mollis* (Holmberg, 1876) (Araneae, Segestriidae), *Journal of Hymenoptera Research* 2018; **66**: 15-21. doi:10.3897/jhr.66.28915
- Villanueva-Bonilla GA, Faustino M, dos Santos WR, *et al.*, Behavioral manipulation of a “Trashline Orb-weaving spider” *Cyclosa fililineata* (Araneidae) by the parasitoid wasp *Zatypota riverai* (Ichneumonidae: Pimplinae), *The Journal of Arachnology* 2021; **49**. doi:10.1636/JoA-S-20-043
- Weinersmith K, What's gotten into you?: a review of recent research on parasitoid manipulation of host behavior, *Current Opinion in Insect Science* 2019; **33**: 37-42. doi:10.1016/j.cois.2018.11.011
- Weng JL, Barrantes G, Natural history and larval behavior of the parasitoid *Zatypota petronae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Journal of Hymenoptera Research* 2007; **16**: 326-335.
- Yamanaka N, Ecdysteroid signalling in insects—From biosynthesis to gene expression regulation. *Advances in Insect Physiology: Genes and Endocrine Signaling in Development and Homeostasis*. Academic Press Inc., 2021; 1-36. doi:10.1016/bs.aiip.2021.03.002
- Yang Z, Wu Y, Yan Y, *et al.*, Regulation of juvenile hormone and ecdysteroid analogues on the development of the predatory spider, *Pardosa pseudoannulata*, and its regulatory mechanisms, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2022; **242**. doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113847
- Yang ZM, Yan Y, Wu Y, *et al.*, EcR/USP-1-mediated ecdysteroid signaling regulates wolf spider (*Pardosa pseudoannulata*) development and reproduction, *Zoological research* 2023; **44**: 43-52. doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2022.282
- Yang ZM, Yu N, Wang SJ, *et al.*, Characterization of ecdysteroid biosynthesis in the pond wolf spider, *Pardosa pseudoannulata*, *Insect Molecular Biology* 2021; **30**: 71-80. doi:10.1111/imb.12678
- Yuan D, Li X, Yeates D, *et al.*, Unlucky spider flies (Diptera: Acroceridae) trapped in a tomb of mud: an Australian predatory wasp (Sphecidae) provisions its nest with parasitised spiders (Salticidae), *Pan-Pacific Entomologist* 2019; **95**: 109-115. doi:10.3956/2019-95.3.109

CAPÍTULO 2

Modificação comportamental de aranhas por vespas parasitoides: sequenciamento do transcrito e análise de expressão gênica diferencial (DGE) dos hospedeiros

Artigo a ser submetido para Molecular Ecology

Modificação comportamental de aranhas por vespas parasitoides: sequenciamento do transcrito e análise de expressão gênica diferencial (DGE) dos hospedeiros

Autores: Ítalo Mendes Delazari¹, Luiz Marcelo Ribeiro Tomé², Thairine Mendes-Pereira², Bertram Brenig³, Aristóteles Góes-Neto², Vasco Ariston de Carvalho Azevedo⁴ and Thiago Gechel Kloss^{1*}

¹ Laboratory of Behavioral Ecology, Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brazil.

² Laboratory of Molecular and Computational Biology of Fungi, Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ Institute of Veterinary Medicine, Department of Molecular Biology of Livestock, Georg August University Göttingen, Göttingen 37077, Germany.

⁴ Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

ORCID: [IMD, 0000-0002-8413-4705](https://orcid.org/0000-0002-8413-4705); [LMRT, 0000-0002-1477-5558](https://orcid.org/0000-0002-1477-5558); [TM-P, 0000-0002-3707-9790](https://orcid.org/0000-0002-3707-9790); [BB, 0000-0002-7635-9656](https://orcid.org/0000-0002-7635-9656); [AG-N, 0000-0002-7692-6243](https://orcid.org/0000-0002-7692-6243); [VACA, 0000-0002-4775-2280](https://orcid.org/0000-0002-4775-2280); [TGK, 0000-0003-0958-1748](https://orcid.org/0000-0003-0958-1748)

***Autor para correspondência:** Thiago G Kloss, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. E-mail: thiago.kloss@ufv.br

Resumo

Induzir modificações comportamentais nos hospedeiros é um recurso que alguns parasitas desenvolveram, resultando no aumento da sua aptidão. Os mecanismos envolvidos na manipulação ainda não são claros, mas podem envolver alterações moleculares nos hospedeiros. Aranhas parasitadas por vespas *Polysphincta* (Ichneumonidae) constroem teias modificadas que frequentemente são similares às teias construídas durante a ecdise, sugerindo que a alteração comportamental das aranhas ocorre pela ativação do processo de ecdise. Contudo, ainda não existem investigações dessas interações a nível molecular, fator que pode ser chave para entender os mecanismos envolvidos no processo de manipulação. Portanto, utilizando a transcriptômica, o objetivo deste estudo foi analisar a expressão gênica diferencial (DGE) de aranhas *Trichonephila clavipes* (Araneidae) parasitadas por vespas *Hymenoepimecis bicolor* (Ichneumonidae) e com comportamento alterado comparadas a aranhas não parasitadas. Verificamos a DGE total e dos genes associados a ecdise (*Halloween genes*). Os resultados mostraram 1421 genes diferencialmente expressos entre aranhas parasitadas e não parasitadas. Identificamos alterações na expressão de genes relacionados ao sistema nervoso, imune e motor, caracterizando alguns desses como possíveis responsáveis pelas alterações comportamentais nas aranhas parasitadas. Entretanto, não houve diferenças na expressão dos *Halloween genes* entre as aranhas, sugerindo que a ativação da ecdise possivelmente não está envolvida na manipulação das aranhas pelas vespas ou que as alterações na expressão ocorram em etapas anteriores do parasitismo. Nossos resultados trazem novas perspectivas sobre como as vespas modificam o comportamento de suas aranhas hospedeiras. O mecanismo de manipulação comportamental parece ser muito complexo, envolvendo alterações em diversos sistemas fisiológicos do hospedeiro.

Palavras-chave: Manipulação comportamental; *Halloween genes*; vespas *Polysphincta*; Fenótipo estendido; Transcriptômica

Introdução

Parasitas exploram diversas estratégias que aumentam sua aptidão, podendo gerar alterações físicas, fisiológicas e comportamentais em seus hospedeiros (Moore 2002; Thomas *et al.* 2010). As modificações comportamentais podem ocorrer em determinados traços dos hospedeiros ou serem caracterizadas pela adoção de comportamentos completamente novos (Thomas *et al.* 2005). Essas alterações comportamentais no hospedeiro, geradas na presença do parasita, podem ser uma resposta do hospedeiro à infecção ou ser produto de uma manipulação por parte do parasita (Poulin 2010). As modificações causadas nos hospedeiros são consideradas um fenótipo estendido do parasita, que expressa seu genótipo através do fenótipo do hospedeiro (Dawkins 1982). Contudo, os mecanismos envolvidos na manipulação comportamental dos hospedeiros são pouco compreendidos.

No entanto, algumas vias já foram descritas como alvos desses parasitas para gerar o fenótipo comportamental modificado, como a endócrina, imune, nervosa e genética (Adamo 2013). Contudo, tanto as vias ativadas, quanto as formas como os parasitas podem acessá-las, pode variar de acordo com a interação e depender até mesmo da forma de infecção do organismo (Lafferty & Shaw 2013). Além disso, os parasitas podem induzir as alterações comportamentais por meio da ativação de múltiplas vias ao mesmo tempo (Adamo *et al.* 2016). Por exemplo, alguns parasitas como fungos e protozoários conseguem acessar diretamente as células dos tecidos musculares ou do sistema nervoso central (SNC) dos hospedeiros (Webster *et al.* 2013; Hughes *et al.* 2016; Mangold *et al.* 2019). Já outros, como a vespa *Dinocampus coccinellae*, que parasita a joaninha *Coleomegilla maculata*, podem acessar os sistemas do hospedeiro por intermédio de microrganismos simbiotes capazes de interagir com seu SNC e ativar mecanismos do sistema imune que geram os comportamentos modificados (Dheilly *et al.* 2015; Poulin *et al.* 2022; Mohan & Sinu 2022). Com isso, vemos que diferentes parasitas desenvolveram formas distintas de acessarem e se beneficiarem dos recursos disponíveis de seus hospedeiros, mesmo que os sistemas ativados e os comportamentos gerados sejam parecidos.

Um dos meios para compreendermos quais as vias utilizadas pelos parasitas para alterar o comportamento dos hospedeiros e quais sistemas são ativados ou suprimidos é investigar a expressão gênica dos hospedeiros. Embora poucos estudos tenham utilizado essa abordagem para investigar os mecanismos de manipulação, evidências apontam que

parasitas manipuladores frequentemente causam mudanças na expressão gênica dos hospedeiros (Feldmeyer *et al.* 2016; Van Houte *et al.* 2013; Beckerson *et al.* 2023). Essas mudanças podem ser resultado da interação entre os genótipos do parasita e do hospedeiro (Van Houte *et al.* 2013). É o que foi observado em insetos infectados com alguns baculovírus (Hoover *et al.* 2011). Nessa interação os vírus que infectam lagartas carregam um gene específico (*egt*) e parecem induzir comportamentos relacionados a ecdise na lagarta. Quando o baculovirus interage com o genoma do hospedeiro desencadeia a ativação do gene *egt*, que é capaz de desativar os efeitos de ecdisteroides na lagarta (hormônios relacionados com o processo de ecdise em artrópodes), impedindo a realização da muda e fazendo com que a lagarta fique presa no comportamento pré-muda até sua morte (Hoover *et al.* 2011). Além desse exemplo, fungos *Ophiocordyceps* que infectam formigas, alterando seu comportamento, também parecem alterar a expressão gênica de diversos sistemas em conjunto (*e.g.* genes relacionados a produção de ecdisteroides, hormônios juvenis, citocinas e dopaminas) (Will *et al.* 2020; de Bekker *et al.* 2015; Beckerson *et al.* 2023). Portanto, investigar as alterações a nível molecular pode ser crucial para compreendermos os mecanismos proximais de manipulação comportamental utilizados pelos parasitas.

Um exemplo de manipulação comportamental em que a alteração da expressão gênica do hospedeiro sob influência do parasita pode estar envolvida é a interação entre aranhas e vespas Polysphinctine (Ichneumonidae). Vespas desse grupo monofilético, que contém aproximadamente 294 espécies, distribuídas em 25 gêneros (Takasuka & Broad 2024), são exclusivamente ectoparasitoides de aranhas. A alteração comportamental nas aranhas hospedeiras envolve a construção de teias modificadas (“*cocoon webs*”) que aumentam as chances de sobrevivência da pupa do parasitoide (Gonzaga *et al.* 2015; Kloss *et al.* 2016). A manipulação nesse caso parece ser gerada pela ativação anacrônica do processo de ecdise nas aranhas (Kloss *et al.* 2017; Eberhard & Gonzaga 2019). Duas evidências de que esse mecanismo seja ativado são a semelhança observada entre as teias de ecdise e modificada de algumas aranhas e ao aumento dos níveis do hormônio 20-hidroxiecdisona (20E) em duas espécies de aranhas *Cyclosa* parasitadas por duas vespas *Polysphincta* (Kloss *et al.* 2017). No entanto, outras substâncias também podem estar envolvidas neste processo, até mesmo outros tipos de ecdisteroides, como a Ponasterona A (PoA), que parece ser mais atuante em aracnídeos do que a 20E (Yang *et al.* 2021). Além disso, o aumento nos níveis de ecdisona podem ser consequência de alterações na

expressão das aranhas, especificamente no conjunto de genes chamados de “*Halloween genes*” (*spook*, *phantom*, *disembodied*, *shadow* e *shade*), que codificam os precursores dos ecdisteroides (Yang *et al.* 2021).

Para compreendermos precisamente por quais mecanismos os parasitas manipulam o comportamento de seus hospedeiros, precisamos olhar a nível molecular para essas interações (Herbison 2017). Com base nisso, nosso objetivo foi investigar por meio de análises de transcritômica possíveis diferenças na expressão gênica de aranhas *Trichonephila clavipes* (Araneidae) parasitadas pela vespa *Hymenoepimecis bicolor* (Ichneumonidae) e com o comportamento alterado, com aranhas não parasitadas e apresentando comportamento normal. Para essas análises, além da expressão diferencial total entre os grupos analisados, verificamos também a expressão diferencial dos *Halloween genes* para verificar se eles são codificados em aranhas com o comportamento alterado.

Materiais e métodos

Espécies de estudo

A aranha *Trichonephila clavipes* (Araneidae), possui ampla distribuição em áreas de Mata Atlântica, com ocorrência em toda a região Neotropical (World Spider Catalog 2024) e encontrada principalmente em áreas de borda e clareiras de florestas. A vespa *Hymenoepimecis bicolor* (Hymenoptera, Ichneumonidae) apresenta grande distribuição em regiões de Mata Atlântica (Yu 2009), sendo encontrada no Brasil parasitando populações das aranhas *Trichonephila clavipes* (Gonzaga *et al.* 2010) (Fig. 1) e *Cyrtophora citricola* (Gonzaga *et al.* 2022). As teias modificadas construídas por *T. clavipes* parasitadas por *H. bicolor* são caracterizadas por apresentar uma arquitetura reduzida em relação à sua teia normal de captura, com grande redução ou total ausência de espiras pegajosas, menor número de raios e a presença de fios de barreira (Gonzaga *et al.* 2010). Suas teias modificadas frequentemente apresentam semelhanças com sua teia de ecdise, o que pode indicar a atuação do mecanismo com base na ativação do processo de ecdise nas aranhas (Eberhard & Gonzaga 2019). A seleção dessas espécies para este estudo foi devido a facilidade de identificação destas espécies em campo, por sua grande abundância na mata Atlântica e devido a existência do seu genoma completo disponível nos bancos de dados.



Figura 1. Aranha *Trichonephila clavipes* parasitada pela larva da vespa *Hymenoepimecis bicolor* indicada pela seta.

Áreas de coleta

As coletas foram realizadas entre os meses de maio a julho de 2022, em três fragmentos próximos de mata Atlântica na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil: (I) Mata do Paraíso UFV (20°48'05.2"S 42°51'58.5"O), (II) Mata da Biologia/Recanto das Cigarras na UFV (20°45'28.7"S 42°51'55.2"O) e (III) Mata do Prof. Chaves, bairro Silvestre (20°43'15.9"S 42°51'45.5"O). Os locais são caracterizados por serem fragmentos de Floresta Estacional Semidecídica. A Mata do Paraíso é o local que se encontra em melhor estado de conservação, enquanto o fragmento da Mata do Prof. Chaves é o ambiente mais degradado. O clima na região de Viçosa é tropical de altitude, com temperatura média anual de 19°C, com variação entre 14°C e 32°C. Todos os locais de coleta são circundados por áreas residenciais e propriedades rurais com atividades de agricultura e pecuária.

Coleta e preparação das amostras

Por meio de busca ativa, foram coletados seis indivíduos de *T. clavipes* parasitados e com o comportamento alterado (identificados pela larva presa ao abdômen e pela arquitetura reduzida característica da teia modificada) (Gonzaga *et al.* 2010) e seis indivíduos não parasitados. Todas as aranhas parasitadas foram marcadas e acompanhadas diariamente

até serem coletadas no mesmo dia em que construíram a teia modificada. As coletas das aranhas ocorreram antes de serem mortas pela larva da vespa, fato que foi verificado tocando na teia e observando a movimentação da aranha. Para obter indivíduos com o comportamento alterado, mas ainda sem serem mortos pelas larvas de *H. bicolor*, inicialmente foram realizadas buscas ativas nos locais de estudo, com o objetivo de identificar aranhas parasitadas por larvas de segundo instar, caracterizadas pela presença de segmentação corporal, ausência de tubérculos dorsais e que ainda não apresentam alterações comportamentais. Os indivíduos parasitados por larvas de segundo instar foram marcados com uma fita na vegetação próxima à teia e monitorados diariamente até o momento da modificação da teia.

As aranhas não parasitadas foram coletadas no mesmo momento de coleta de cada indivíduo parasitado com o comportamento alterado (Tabela S1). Para cada indivíduo parasitado coletado, selecionamos o indivíduo não parasitado e com teia de captura normal mais próximo, que possuía um tamanho visualmente semelhante ao da aranha parasitada. Após as coletas, as aranhas foram transportadas para o Laboratório de Ecologia da UFV em recipiente estéril e imediatamente inseridas em congelador a $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, por aproximadamente 30 min, com o objetivo de induzir a morte dos indivíduos. Em seguida, as aranhas foram levadas a uma capela de fluxo laminar e transferidas individualmente para placas de Petri, para remoção das pernas e pedipalpos, assim como da larva do parasitoide. Esse procedimento foi realizado com o auxílio de lâminas e pinças estéreis. O cefalotórax e abdômen foram transferidos para tubos Falcon (15 mL) contendo 3 ml de U-Trinzol (Uniscience Corporation, EUA) (suficiente para cobrir toda a amostra) dentro de tubos Falcon de 15ml e congeladas em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a fim de manter a integridade do RNA. Posteriormente, todas as amostras foram colocadas em gelo seco a aproximadamente -78°C e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, para realizar a extração do RNA total.

Extração do RNA total e avaliação de qualidade

Para a extração do RNA total, as aranhas foram pesadas em balança de precisão e divididas em cefalotórax e abdômen para aumentar o rendimento da extração. Cada fragmento de aranha foi acondicionado em tubos de 2 ml contendo matriz de lise (Lysing Matrix E) (MP Biomedicals, EUA) e 1 ml de U-Trinzol (Uniscience Corporation, EUA).

As amostras foram maceradas por 1 min a 6 m/s em homogeneizador FastPrep® (MP Biomedicals, EUA) e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 g e 4 °C. Em seguida, o RNA total foi extraído de acordo com o protocolo do U-Trizol (Uniscience Corporation, EUA), adicionando 1 ml de U-Trizol, 0,2 ml de Clorofórmio (ThermoFisher Scientific, Germany), 0,5 ml de Isopropanol (ThermoFisher Scientific, Germany) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi avaliado qualitativamente em gel de agarose 1% e quantitativamente por espectrofotometria em Nanodrop 1000 ND (ThermoFisher Scientific, EUA) e fluorimetria no Qubit 4 (ThermoFisher Scientific, EUA) com o kit RNA BR Assay kit (ThermoFisher Scientific, Germany). Após a checagem de qualidade, o RNA total de cada cefalotórax e abdômen obtidos separadamente foram homogeneizados e preparados para envio com o uso de 10 µg de glicogênio (ThermoFisher Scientific, Germany), 10 µl de acetato de sódio (3M, pH 5,5), 0,3 ml de etanol absoluto (ThermoFisher Scientific, Germany). sequenciamento. Então, as amostras, foram enviadas eluidas em etanol 70% (ThermoFisher Scientific, Germany) para o Institute of Veterinary Medicine da Georg August University Göttingen, Alemanha, para o preparo das bibliotecas e sequenciamento do transcrito.

Preparação das bibliotecas de RNA e sequenciamento do transcrito

O RNA total de cada amostra foi normalizado para um volume final de 400 µl, resultando em um peso de 83,325 µg ($\pm 5,564$) (média \pm erro padrão) de RNA total. Inicialmente, o módulo NEBNext rRNA Depletion do kit NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (#E7760S) (New England BioLabs, EUA) para preparo das amostras. Para seleção (enriquecimento) de RNAs mensageiros (mRNA) e depleção de RNAs ribossomais (rRNA) citoplasmáticos e mitocondriais foi utilizado o kit QIAseq FastSelect -rRNA Fly (#333262) (Qiagen, Germany). As bibliotecas de RNA foram purificadas com o uso de *beads* magnéticas da Agencourt AMPure XP Beads (#A63881) (AMPure XP, Beckman Coulter, EUA). A inserção de primers e adaptadores foi realizada com o kit NEB Multiplex Oligo Kit for Illumina (Dual Index Primer Set 1) (#E7600S) (New England BioLabs, EUA). A qualidade do RNA total e das bibliotecas de sequenciamento foi checada no equipamento Agilent Bioanalyzer DNA 7500 (Agilent Technologies, EUA). Após o preparo das bibliotecas, as amostras foram divididas em duas replicatas técnicas e sequenciadas na plataforma NextSeq500 Sequencing System (Illumina, EUA) adotando a abordagem *paired-end*. Um total de vinte e quatro bibliotecas

do transcriptoma de *T. clavipes* foram sequenciadas, correspondendo às replicatas de seis aranhas parasitadas e seis aranhas não parasitadas sequenciadas em duplicata.

Controle de qualidade do sequenciamento e mapeamento no transcriptoma

Após o sequenciamento, as bibliotecas foram avaliadas em relação a qualidade utilizando o software FastQC v0.11.9 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>). Em seguida, os adaptadores e bases com Phred-score menor que 30 foram removidas utilizando o software Trimmomatic (Bolger *et al.* 2014) Após a remoção dos adaptadores dos dados brutos, as *reads* foram mapeadas no transcriptoma da aranha *T. clavipes*, disponível na plataforma GenBank (accession number GCA_019973935.1) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=GCA_019973935.1) utilizando o programa Kallisto (Bray *et al.* 2016).

Análises de expressão diferencial

Para a análise da expressão gênica diferencial (DGE) entre os grupos estudados (aranhas parasitadas versus aranhas não parasitadas) foram utilizados os pacotes em R (v. 4.3.2): tximport e DESeq2 (Love *et al.* 2014). Inicialmente, os transcritos com número de *counts* (leituras mapeadas) menor que 100 foram removidos, para filtrar apenas genes que de apresentam expressão significativa. Para a análise de DGE foram considerados diferencialmente expressos, transcritos que apresentaram valor de $p < 0,01$. Os genes relacionados com a rota metabólica da ecdise foram filtrados a partir da análise inicial considerando todos os genes.

Resultados

Por meio do RNA-seq, considerando as aranhas parasitadas e não parasitadas, foram obtidos valores entre 15160756 e 28175195 de *reads* por biblioteca e o número médio de sequências mapeadas ao transcriptoma foi de 11871887,38 (Tabela 1), o que representa 59.94% das *reads* sequenciadas (Tabela 1). O mapeamento com o transcriptoma pelo programa Kallisto foi em média 59,94% (Tabela 1). Embora a porcentagem desejada para uma boa acurácia no mapeamento ao genoma seja de 70 a 90% com uma fração de mapeamentos múltiplos para organismos eucariotos, ao mapear no transcriptoma os valores esperados podem ser menores (Conesa *et al.* 2016). Isso ocorre porque as leituras de transcrições não anotadas podem ser perdidas e com isso ocorre um maior número de

mapeamento múltiplo (ver Conesa *et al.* 2016). Considerando essa particularidade do sistema de estudo, as porcentagens obtidas pelo mapeamento foram consideradas satisfatórias para realizarmos as análises de expressão diferencial.

Tabela 1. Identificação e qualidade das amostras analisadas. As colunas mostram a identificação de cada réplica e a condição a que está relacionada NP (Não Parasitadas, NP1-12) e PA (Parasitadas, PA1-12) e as métricas do sequenciamento e mapeamento das *reads* ao transcrito de referência.

Réplicas	Número total de <i>reads</i>	Número de <i>reads</i> alinhadas	Porcentagem de mapeamento (Kallisto) (%)
NP1	25,837,287	15,376,165	59.60
NP2	17,619,399	10,474,524	59.60
NP3	18,303,324	10,960,670	60.00
NP4	16,013,349	9,420,995	59.00
NP5	20,642,865	1,300,246	63.10
NP6	15,160,756	9,281,062	61.40
NP7	28,175,195	17,108,978	60.80
NP8	21,238,761	12,888,632	60.80
NP9	20,303,077	12,271,510	60.50
NP10	20,516,718	12,365,784	60.40
NP11	22,647,619	13,559,564	60.00
NP12	16,904,359	9,918,899	58.90
PA1	21,445,774	12,742,278	59.50
PA2	19,035,572	11,231,404	59.10
PA3	30,087,215	18,207,979	60.60
PA4	17,492,390	10,586,273	60.60
PA5	18,941,550	11,167,933	59.10
PA6	16,766,495	94,409,63	56.50
PA7	29,205,850	17,606,127	60.40
PA8	17,358,625	10,738,637	61.90
PA9	26,219,192	15,769,849	60.20
PA10	15,356,837	92,869,89	60.60
PA11	20,830,198	12,201,433	58.70
PA12	19,220,072	11,018,403	57.40

Na análise de componentes principais (PCA), os dois grupos avaliados, aranhas parasitadas e não parasitadas, foram parcialmente separados (PC1: 22%) (Figura 2a). Quatros bibliotecas referentes a duas aranhas não parasitadas (NP7/NP8 e NP9/NP10) tiveram uma proximidade maior com o cluster das aranhas parasitadas. Esta proximidade não esperada pode ser explicada porque os indivíduos foram coletados em ambientes

naturais em situações não controladas. A correlação entre as amostras também é demonstrada no gráfico de heatmap representado na Figura 2b.

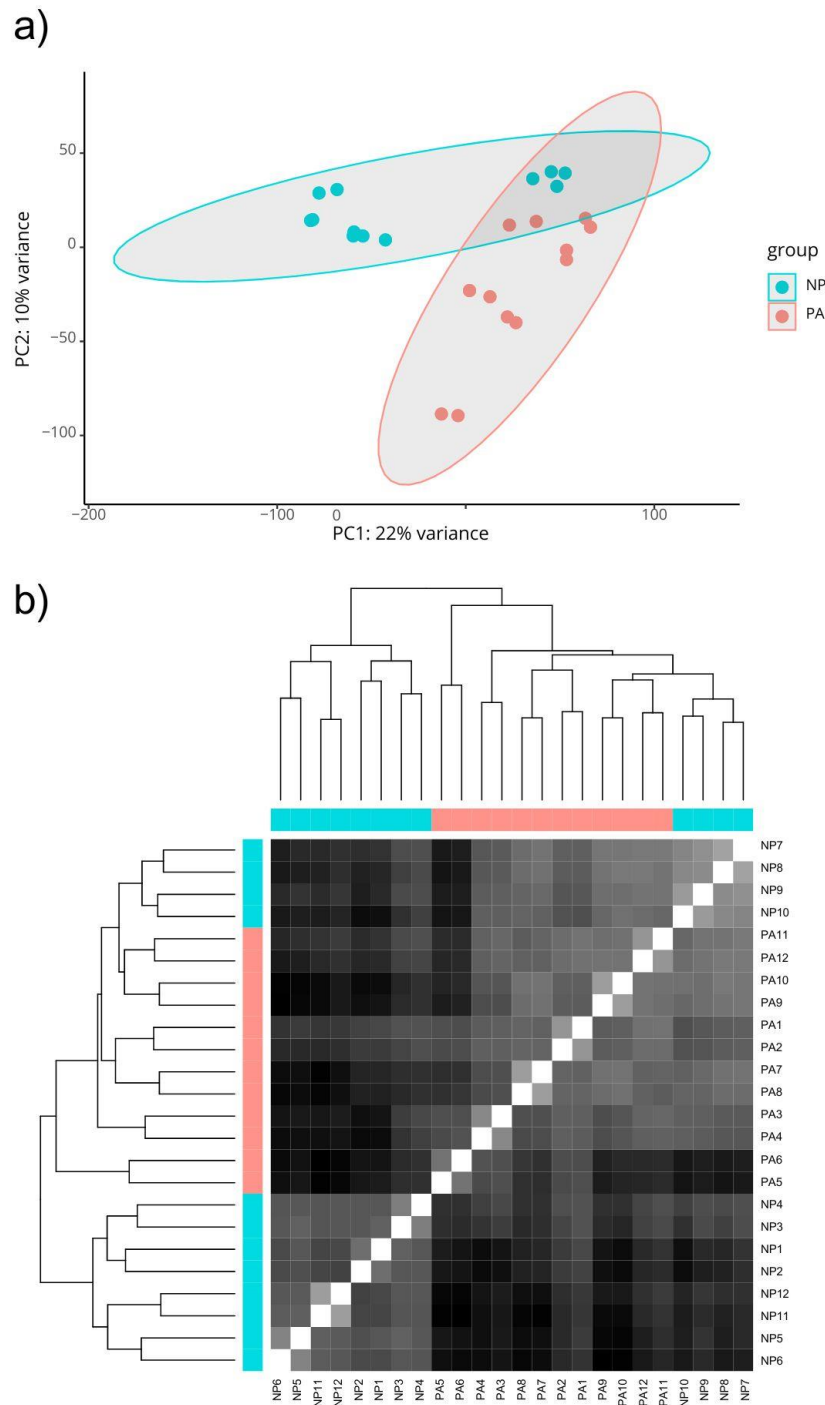


Figura 2. Análises de componentes principais (PCA) e correlação entre as amostras. a) Gráfico de PCA das análises de transcrito em que os dois grupos, não parasitadas (NP) em azul e parasitadas (PA) em vermelho, parcialmente separadas. As elipses representam um intervalo de 95% de confiança. b) Heatmap apresentando a correlação entre as amostras separadamente dentro de cada grupo. Em azul são aranhas não parasitadas (NP1-12) e em vermelho são aranhas parasitadas (PA1-12). As cores de preto/cinza mais

intensas indicam menor correlação entre as amostras e cores mais claras, próximas do branco, indicam maior ou total correlação entre elas.

Por meio da análise de expressão gênica diferencial foi observado que 1421 transcritos foram diferencialmente expressos ($p < 0,01$) entre as condições avaliadas. Destes, 822 genes apresentaram alta regulação e 599 apresentaram baixa regulação. Essas diferenças são demonstradas no Volcano plot, em que estão destacados os genes com maior diferença de acordo com o valor de Log2 Fold Change e valor p (em vermelho) (Figura 3a).

Dentre os 50 genes mais diferencialmente expressos, 17 tiveram alta regulação em aranhas parasitadas e o restante teve baixa regulação em relação a aranhas não parasitadas (Figura 3b, Tabela 2). Além disso, foi possível obter a identificação das atividades de 33 destes genes, com base nos arquivos de anotação do genoma disponível (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/gene/GCA_019973935.1/) (Tabela 2). Os demais genes ($n=17$) não apresentaram uma caracterização definida ou estavam associados a proteínas hipotéticas (Tabela 2).

A partir dos 33 genes cujas funções foram identificadas, 13 genes são candidatos a estarem envolvidos com o processo de manipulação. Grande parte deles apresentaram baixa regulação em aranhas que apresentavam o comportamento alterado. Os principais sistemas que parecem estar envolvidos com as atividades relacionadas aos transcritos são o sistema imune (ex. trp129615, trp326500, trp210616, trp411106), nervoso (ex. trp222879, trp222881, trp279115, trp455050) e motor (ex. trp372154, trp326500, trp281199). Os genes candidatos ao processo de manipulação são codificadores de proteínas e enzimas com atividade na regulação do sistema nervoso, sinalizadores do sistema imune e toxinas presentes no veneno de aranhas (trp399217).

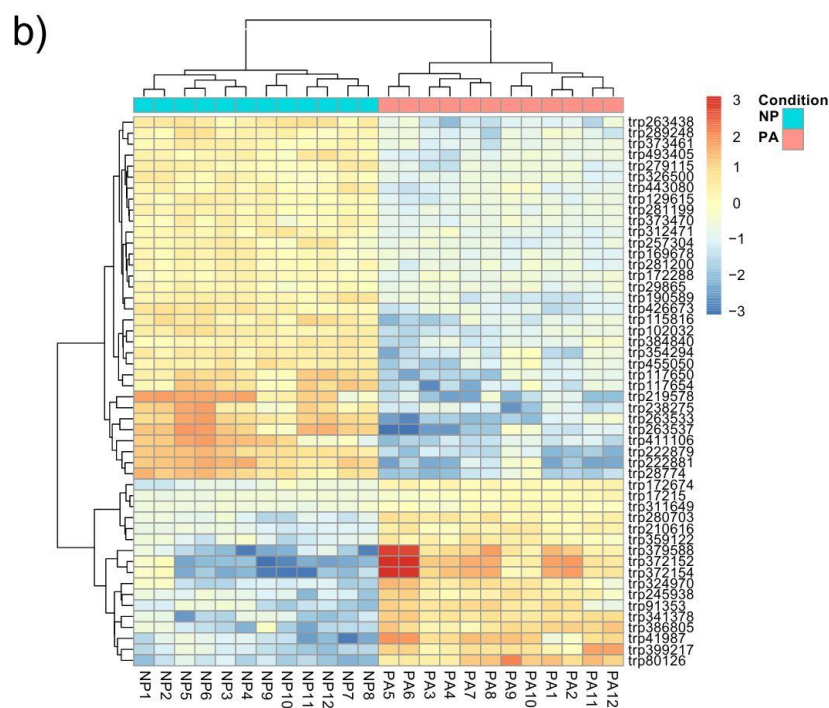
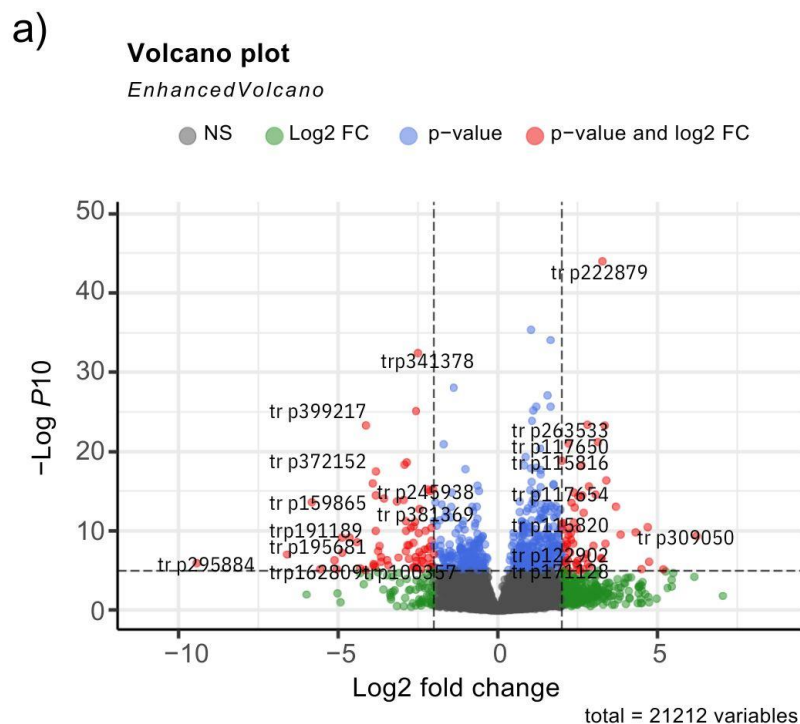


Figura 3. Diferenças na expressão entre aranhas não parasitadas e parasitadas com o comportamento alterado. a) Volcano plot mostrando o resultado da análise de expressão diferencial, com valores de Log2FC (eixo x) e Log10 dos valores de p (eixo y). Em verde são os genes que mais se diferenciam em relação aos valores de Log2FC, em azul os que mais se diferenciam em valores de p e em vermelho são os que apresentam maiores diferenças em ambos os valores. Os transcritos destacados são os 20 com maiores diferenças entre os grupos avaliados (aranhas parasitas versus aranhas não parasitadas). b) Heatmap dos 50 genes mais diferencialmente expressos entre aranhas parasitadas e não parasitadas.

Tabela 2. 50 genes com maiores diferenças de expressão entre aranhas não parasitadas e parasitadas com o comportamento alterado. A tabela mostra a identificação dos transcritos, sua atividade, os valores de log2 fold change, valores de p e p ajustado e os valores médios de transcritos por milhão (TPM) e de *Counts* totais de cada transcrito. Os transcritos destacados em negrito e que a atividade contém um * são os principais candidatos a causarem as alterações comportamentais.

Gene Id	Activity	log2 Fold Change	pvalue	Padj	TPM NP (mean)	TPM PA (mean)	Counts NP (mean)	Counts PA (mean)
trp102032	uncharacterized protein	1,66E+14	8,56E-21	6,05E-17	354250,83	433080,42	241,33	193,75
trp115816	sulfate transporter	2,00E+14	1,40E-05	1,49E-02	0,23	254983,67	3,08	37,08
trp117650	uncharacterized protein	2,22E+14	8,94E-09	1,19E-04	181268,25	377619,08	97,33	218,33
trp117654	uncharacterized protein	2,38E+14	1,51E-01	7,30E+01	304518,50	117941,12	127,25	21,67
trp129615	leucine-rich repeat-containing protein 58*	1,12E+14	7,07E-12	1,57E-08	29557,90	0,05	212621,42	157366,83
trp169678	mRNA decay activator protein ZFP36L1	1,07E+14	1,32E-10	2,55E-07	292914,58	561861,50	799,67	242,75
trp17215	60S ribosomal protein L18a	-5,88E-01	9,49E-03	4,79E+01	378819,93	210742,42	331,00	1202,58
trp172288	uncharacterized protein	8,27E-01	5,42E-06	4,79E-02	0,29	102399,69	295792,86	461142,08
trp172674	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP14	-1,02E+14	1,70E-04	1,34E-01	240171,24	236199,75	263842,33	315851,37
trp190589	hypothetical protein	1,56E+14	8,29E-14	2,93E-10	95831,43	439192,50	12,67	79,92
trp210616	nitric oxide synthase, inducible	-1,38E+14	8,38E-15	3,56E-11	445079,08	356848,28	200,67	529,67
trp219578	hypothetical protein	3,40E+14	4,52E-03	3,09E+00	470624,50	351854,25	154,25	399,92
trp222879	neprilysin-2 *	3,27E+14	9,85E-31	2,09E-27	0,64	104824,10	317616,91	241380,00
trp222881	neprilysin-2 *	3,13E+14	6,26E-08	8,85E-06	341546,17	174989,70	66,08	40,33
trp238275	mitogen-activated protein kinase kinase 12	2,65E+14	3,39E-01	1,44E+02	0,58	192397,33	34,67	125,58
trp245938	acidic mammalian chitinase	-2,19E+14	6,61E-02	3,51E+01	322113,33	150993,08	473,92	224,92
trp257304	AT-rich interactive domain-containing protein 5B	1,24E+13	2,20E-01	9,93E+01	0,18	206985,90	5,17	63,08
trp263438	protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B	2,63E+14	5,04E-06	4,65E-02	0,15	159360,08	406498,17	590422,26
trp263533	uncharacterized protein	2,81E+14	4,37E-10	7,73E-07	0,18	193361,42	10,25	116,67
trp263537	uncharacterized protein	2,86E+14	2,58E-02	1,48E+01	0,11	50529,80	6,58	47,92
trp279115	hexokinase-2 *	1,21E+14	1,15E-04	9,76E-03	0,17	0,05	21,58	5,75
trp280703	hypothetical protein	-1,69E+14	1,18E-07	1,47E-04	0,31	25521,91	44,00	133,25
trp281199	protein slowmo *	1,05E+14	4,37E-22	4,63E-19	0,09	19296,03	2,75	20,92
trp281200	hypothetical protein	1,02E+14	7,18E-02	3,72E+01	380816,08	550957,92	361,17	2763,50
trp28774	uncharacterized protein	3,35E+14	5,66E-10	8,57E-07	519251,92	445189,83	1120,58	9873,08

trp289248	graves disease carrier protein *	1,34E+13	3,13E-02	1,75E+01	304278,25	369389,67	282555,75	549972,44
trp29865	transcription factor E3	8,68E-01	4,98E-06	5,56E-03	193620,58	10700,71	58,75	22,75
trp311649	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	-6,35E-01	1,96E-02	1,16E+01	435068,83	279703,75	102,00	249,83
trp312471	growth factor receptor-bound protein 14 *	1,33E+14	4,03E-07	4,75E-04	230582,08	518169,54	272720,58	456273,85
trp324970	chitin-binding type-2 domain-containing protein	-2,12E+14	1,01E-01	4,99E+01	88008,17	311478,75	43,42	128,58
trp326500	protein BTG1 *	1,05E+14	1,27E-04	1,04E-01	234222,58	185458,83	169,83	132,25
trp341378	tyrosine aminotransferase	-2,50E+14	3,56E-19	1,89E-15	0,39	65698,06	183940,42	488706,25
trp354294	transcription factor GATA-4	1,75E+14	1,31E-02	8,18E+00	494490,83	110514,29	75,58	21,50
trp359122	hypothetical protein	-1,44E+14	1,58E-01	7,46E+01	205460,58	433242,33	338,83	807,75
trp372152	uncharacterized protein	-3,81E+14	3,38E-04	2,48E-01	166372,32	0,35	84,75	17,50
trp372154	Paramyosin *	-3,82E+14	3,24E-01	1,40E+02	0,31	91194,63	16,50	69,92
trp373461	uncharacterized protein	1,21E+14	2,17E-12	5,75E-09	217261,92	32460,78	53,17	23,83
trp373470	uncharacterized protein	1,06E+14	6,92E-03	4,59E-01	456118,92	54661,93	367,75	28,25
trp379588	receptor expression-enhancing protein 5	-3,92E+14	1,07E-02	6,88E+00	279003,83	131709,11	125,17	9,42
trp384840	gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	1,34E+14	2,08E-04	1,58E-01	0,63	168163,92	497421,83	167490,74
trp386805	cuticle protein 10.9	-2,85E+14	2,31E-05	2,33E-02	28616,54	197908,58	55,08	140,00
trp399217	u24-ctenitoxin-Pn1a *	-2,56E+14	7,39E-12	1,57E-08	290235,50	0,32	54,33	4,83
trp411106	b lymphocyte-induced maturation protein 1 homolog *	3,06E+14	2,61E-01	1,15E+01	308889,67	274228,42	227,33	686,00
trp41987	uncharacterized protein	-2,91E+14	4,70E-05	4,53E-02	0,40	0,06	33,17	5,33
trp426673	phosphatidate phosphatase LPIN3	1,66E+14	2,16E-12	5,75E-09	481682,83	229598,67	158,00	31,58
trp443080	terminal nucleotidyltransferase 5C	1,15E+14	1,79E-03	8,24E+00	0,05	8956,96	4,75	45,17
trp455050	Sialin *	1,74E+14	1,62E-02	9,82E+00	37351,01	351884,08	108,67	412,67
trp493405	DNA-binding protein D-ETS-4	1,34E+14	6,86E-04	4,85E-01	411075,25	243006,08	199,17	543,33
trp80126	transposable element Tcb1 transposase	-4,14E+13	4,93E-10	8,05E-07	33866,20	278187,58	13,58	55,50
trp91353	uncharacterized protein	-2,04E+14	5,51E-02	3,00E+01	19259,42	213500,25	33,25	103,33

Os *Halloween genes* identificados em *T. clavipes* são os genes *spook* (spo, trp386546), *phantom* (phm, trp136903), *disembodied* (dib, trp490103, trp490108, trp490112, trp490114, trp490115, trp490116), *shadow* (sad, trp82237) e *shade* (shd, trp383170). Além desses, também foram identificados os codificadores dos receptores de ecdisona (EcR) (trp228065, trp416037) (Yang *et al.* 2023). Contudo, não houve diferença na expressão de nenhum desses genes entre aranhas parasitadas e não parasitadas (Figura 4). Isso sugere que a rota da ecdise não é ativada no processo de manipulação em indivíduos de *T. clavipes* ou que possa ser ativada em etapas anteriores do parasitismo.

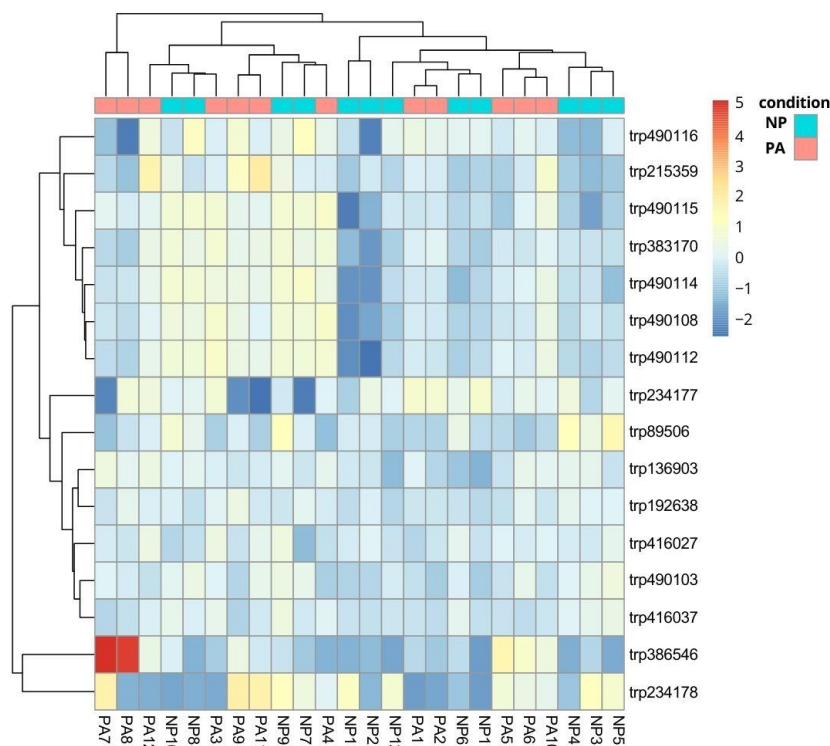


Figura 4. Heatmap da regulação dos genes relacionados a ecdise (*Halloween genes*) e receptores de ecdisona em cada amostra de aranhas não parasitadas (NP1-12, em azul) e aranhas parasitadas (PA1-12, em vermelho). Os genes apresentados no heatmap (ID à direita do gráfico), são apenas aqueles cujo número de *counts* foi maior que 100. O dendograma no topo agrupa as amostras mais similares, indicando que não há agrupamento em relação aos tratamentos NP e PA.

Discussão

Aranhas *T. clavipes* parasitadas por vespas *H. bicolor* e com o comportamento alterado apresentam um padrão de expressão gênica distinto de aranhas não parasitadas. Um grande número de genes apresentou diferença de expressão entre os grupos, mostrando que o mecanismo de manipulação utilizado pelas vespas *Polysphincta* pode ser complexo

ao envolver diversos processos. Os genes com maior diferença de expressão que puderam ser identificados são relacionados a diferentes sistemas das aranhas, sugerindo que as vespas podem afetar vários desses sistemas ao mesmo tempo para gerar o fenótipo estendido. Entretanto, muitos transcritos ainda não foram caracterizados fazendo com que fatores chave da manipulação comportamental podem não ter sido considerados. Além disso, ao contrário do que esperávamos, não houveram diferenças de expressão entre os *Halloween genes*, o que mostra que esses genes não são afetados durante a manipulação e possivelmente não estão associados ao mecanismo. Portanto, esses resultados fornecem mais evidências de que alguns parasitas podem, de fato, causar alterações na expressão gênica de seus hospedeiros e que o mecanismo de manipulação comportamental pode ser complexo.

Dentre os transcritos mais diferencialmente expressos, identificamos 13 como possíveis candidatos a serem responsáveis pelo comportamento alterado das aranhas. Por exemplo, o gene codificador da Sialina (trp455050), apresentou baixa regulação em aranhas parasitadas e possivelmente causa efeitos comportamentais consideráveis. Essa proteína é responsável pelo transporte de ácido siálico e nitrato da membrana lisossomal em mamíferos (Prolo *et al.* 2009). Tanto em insetos quanto em vertebrados, a sialilação (acúmulo de ácido siálico) tem diversos efeitos relacionados ao sistema nervoso. Essa substância interfere no transporte e sinalização de neurotransmissores (Grosh 2018; Harduin-Lepers 2023) quanto na sinalização para a ativação da resposta imune (Harduin-Lepers 2023). Mutações ou baixa regulação de codificadores da Sialina e outros transportadores de ácido siálico causam inúmeros distúrbios no sistema nervoso e desencadeia diversas doenças graves em humanos (*e.g.* doença de Salla) (Prolo *et al.* 2009; Grosh 2018; Harduin-Lepers 2023). Esses distúrbios ocasionados pelo acúmulo de ácido siálico no organismo, tanto em vertebrados quanto invertebrados, podem ser locomoção anormal, paralisia e defeitos na transmissão neural (Grosh 2018; Harduin-Lepers 2023). Com isso, a baixa regulação dessa proteína em aranhas parasitadas sugere uma possível sialilação em seu organismo que podem ser um estímulo para o comportamento modificado em indivíduos parasitados e a resposta de cada organismo pode gerar as variações entre cocoon webs.

Um transcrito que também pode estar relacionado com o comportamento modificado nas aranhas é a Neprilisina-2 (NEP2) codificada por dois genes (trp222879, trp222881), que apresentou baixa regulação em aranhas parasitadas. A NEP2 é uma

importante enzima relacionada à regulação da sinalização de neuropeptídeos como amyloid-beta peptídeo em diferentes organismos conhecidos, como insetos e humanos (Isaac *et al.* 2009; Marr & Hafez 2014). Em humanos, a baixa regulação de Neprilissina e o acúmulo de amyloid-beta está diretamente relacionado com a doença de Alzheimer e outras patologias (Marr & Hafez 2014; Nalivaeva *et al.* 2020). Em insetos, ainda não há experimentos que mostrem os efeitos da baixa regulação dessa neuropeptidase. Contudo, a NEP2 e outras enzimas do mesmo grupo (NEP-like) tem um papel importante na sinalização de tachykinin, inativando esses peptídeos nas sinapses de insetos (Isaac *et al.* 2009). Além disso, evidências mostram que alterações na regulação das NEP-like podem causar alterações na atividade motora, memória e mudanças na resposta imune, como gerar células B imaturas (Nalivaeva *et al.* 2020). Portanto, é possível que baixa regulação dessa enzima em aranhas parasitadas possa gerar o acúmulo de neuropeptídeos e de amyloid-beta, capazes de causar distúrbios neurais de forma que afete atividades como a construção de teias.

Outros genes dentre os mais diferencialmente expressos também podem estar relacionados com as alterações no comportamento das aranhas. Destes, destacam-se genes codificadores de sinalizadores do sistema imune (trp129615, trp326500, trp210616, trp411106), proteínas relacionadas a estrutura muscular de artrópodes como a paramyosin (trp372154) e de funções motoras, como da proteína Slowmo (trp281199), responsável pela movimentação lenta de estágios iniciais de larvas de insetos (Carhan *et al.* 2004) (Tabela 2). Além disso, houve uma alta regulação de genes codificadores de neurotoxinas relacionadas ao veneno de aranhas, por exemplo, a u24-ctenitoxin-Pn1a (trp399217) (Khamtorn *et al.* 2022). A alta presença dessa toxina nas aranhas parasitadas em comparação com as não parasitadas pode ser devido a uma resposta de defesa da aranha ao parasitismo pela larva da vespa. Contrastante a isso, a super regulação dessa toxina pode estar associada à uma necessidade da aranha em capturar mais presas por estar em um déficit nutricional devido ao consumo de recursos pela larva. Isso porque a toxina u24-ctenitoxin-Pn1a também é produzida nas fiandeiras de *T. clavipes* e é encontrada em suas teias, auxiliando na captura de presas (Esteves *et al.* 2020). Essa explicação também é plausível já que genes envolvidos no metabolismo energético tiveram baixa regulação em aranhas parasitadas, por exemplo, a hexokinase-2 (trp279115), que é uma enzima inicial da glicólise. Por outro lado, a vespa poderia induzir a superprodução da u24-ctenitoxin-Pn1a toxina para causar um tipo de distúrbio neuronal na aranha. Contudo, a

possibilidade desse tipo de ação da toxina é apenas uma hipótese, e análises para averiguar a presença da toxina na aranha fora das glândulas de veneno seria necessária. Assim, por mais que a super regulação ou supressão dessas proteínas possa ser uma ação direta da vespa, também pode ser uma resposta da aranha para contornar os efeitos do parasitismo.

Em relação à expressão dos genes relacionados com a rota metabólica de ecdisteroides e à ecdise, não houveram diferenças na expressão entre aranhas parasitadas e não parasitadas. Em todas as aranhas encontramos uma baixa quantidade de transcritos dos genes investigados. Isso sugere que possivelmente a rota da ecdise não está relacionada ao processo de alteração comportamental em *T. clavipes*. No entanto, a atuação dos ecdisteroides ainda não pode ser totalmente descartada do processo de construção da teia modificada. A produção dos ecdisteroides pode ser apenas uma consequência da resposta imune da aranha a infecção, mas sua síntese e a alta regulação dos genes relacionados pode ocorrer pouco antes ou durante a construção da cocoon web. Isso porque no momento em que a aranha se prepara para a muda, os níveis de ecdisteroides caem consideravelmente e o pico desses hormônios no organismo ocorre antes da muda (Sawadro *et al.* 2017). Assim, existe a possibilidade de que a produção dos hormônios já tenha cessado no momento de coleta das aranhas com comportamento alterado. Em outra direção, a construção de teias com arquiteturas diferentes da teia normal de captura também ocorre em outros momentos da vida das aranhas. Contudo, sabemos muito pouco sobre essas variações naturais das teias de *T. clavipes*, e a cocoon web ser um reflexo mais preciso dessas outras teias e não da teia de ecdise. Isso indica a necessidade de investigarmos a expressão gênica dos hospedeiros em estágios anteriores do parasitismo e maiores estudos sobre traços da história natural das aranhas. Além disso, o mecanismo de manipulação utilizado pelos parasitas, até mesmo dentro de *Polysphincta* pode não ser único e cada parasita poderia ter encontrado formas distintas de expressar seu fenótipo através dos hospedeiros.

Alterações na expressão gênica dos hospedeiros por influência dos parasitas é justamente um dos pontos centrais do conceito de fenótipo estendido (Dawkins 1982). A habilidade de alterar a expressão gênica dos hospedeiros já havia sido observada anteriormente em alguns parasitas, como fungos *Ophiocordyceps* que infectam formigas (Will *et al.* 2020). As formigas infectadas pelos fungos apresentam um padrão de expressão distinto de formigas não infectadas. Os genes com expressão diferencial nas formigas hospedeiras estão ligados a funções de degradação de tecidos e de metabolismo

energético, comportamentos de forrageamento, como ecdisteroide kinase e reguladores de hormônios juvenis, ritmo circadiano, a percepção de odores e neuromodulação (Will *et al.* 2020). Muitos desses genes podem ser atuantes diretos do mecanismo de manipulação ou são apenas uma consequência da ação de outros genes relacionados aos fungos que também apresentaram diferenças na expressão (Will *et al.* 2020). Dentre estes, estão como codificadores de toxinas como o aflatrem, que após ser injetado em formigas não infectadas, gera uma alteração no comportamento semelhante a formigas infectadas pelo fungo (Beckerson *et al.* 2023). No entanto, recentemente vimos que alguns hospedeiros não tem seu padrão de expressão alterado, mas essas mudanças ocorrem no parasita em pelo menos um estágio do parasitismo, por exemplo no caso de mantídeos infectados por vermes nematomorfos (Mishina *et al.* 2023). Apenas os nematomorfos parasitas tem seu padrão de expressão modificado e somente durante a alteração comportamental do hospedeiro. Além disso, os genes com expressão diferencial podem ser provenientes de uma transmissão horizontal de genes do hospedeiro para o parasita ao longo do tempo evolutivo (Mishina *et al.* 2023). Isso pode representar uma capacidade do parasita de produzir moléculas que são processadas pelo hospedeiro que tem seu comportamento alterado sem que o hospedeiro altere sua expressão. Assim, podemos sugerir que os mecanismos proximais de manipulação não são únicos na natureza e podem ter evoluído de forma independente em cada interação.

Todas as múltiplas possibilidades de processos capazes de estarem envolvidos com o mecanismo de manipulação comportamental de aranhas utilizado pelas vespas parasitoides mostram o quão elaborado pode ser esse mecanismo. A partir de nossas análises, destacamos diversos genes candidatos a serem responsáveis pela alteração do comportamento de construção de teia das aranhas parasitadas. Também vimos que a principal hipótese do mecanismo utilizado pelas vespas parasitoides, que é a ativação de ecdisteroides nas aranhas, pode não estar totalmente correta, ou pelo menos não na fase final do parasitismo. Esses resultados trazem uma nova perspectiva para os estudos sobre os mecanismos de manipulação de aranhas utilizados pelas vespas *Polysphincta*. Contudo, os candidatos encontrados ainda precisam ser testados funcionalmente no organismo das aranhas. Os genes cujas funções ainda não foram caracterizadas e que tiveram uma super expressão em aranhas parasitadas podem ter um papel crucial no processo de modificação do comportamento. Identificar um único fator como responsável pela alteração comportamental é muito difícil devido as interconexões entre os sistemas

fisiológicos dos hospedeiros. A limitação de informações básicas disponíveis tanto dos hospedeiros quanto dos parasitas dificulta ainda mais nosso entendimento completo desse sistema. Portanto, o mecanismo de manipulação comportamental de hospedeiros por parasitas parece ser muito mais complexo do que a alteração de um único grupo de substâncias. Nosso estudo traz uma perspectiva mais aprofundada dos aspectos funcionais envolvidos nas interações parasita-hospedeiro com manipulação comportamental, com uma abordagem inédita no sistema vespa-aranha. Dessa forma, conseguimos oferecer novos insights sobre os mecanismos proximais da manipulação de hospedeiros que podem indicar componentes bioativos na modulação do comportamento animal.

Agradecimentos: Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa ao primeiro autor e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Viçosa pelo apoio e recursos disponibilizados. Agradecemos também à Marcelo Oliveira Gonzaga e Paula Luize Camargos Fonseca pelas revisões e comentários.

Referências

- Adamo S (2013) Parasites: Evolution's neurobiologists. *Journal of Experimental Biology*, **216**, 3-10. doi:10.1242/jeb.073601
- Adamo S, Kovalko I, Turnbull K *et al.* (2016) The parasitic wasp *Cotesia congregata* uses multiple mechanisms to control host (*Manduca sexta*) behaviour. *Journal of Experimental Biology*, **219**, 3750-3758. doi:10.1242/jeb.145300
- Beckerson WC, Krider C, Mohammad UA, de Bekker C (2023) 28 minutes later: investigating the role of aflatrem-like compounds in *Ophiocordyceps* parasite manipulation of zombie ants. *Animal Behaviour*, **203**, 225-240. doi:10.1016/j.anbehav.2023.06.011
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**, 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, **34**, 525-527. doi:10.1038/nbt.3519
- Carhan A, Reeve S, Dee CT, Baines RA, Moffat KG (2004) Mutation in slowmo causes defects in *Drosophila* larval locomotor behaviour. *Invert Neuroscience*, **5**, 65-75. doi:10.1007/s10158-003-0028-y
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S *et al.* (2016) A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, **17**, 13. doi:10.1186/s13059-016-0881-8
- Dawkins R (1982) *The Extended Phenotype*. Oxford: Oxford University Press.
- de Bekker C, Ohm RA, Loreto RG *et al.* (2015) Gene expression during zombie ant biting behavior reflects the complexity underlying fungal parasitic behavioral manipulation. *BMC Genomics*, **16**, 620. doi:10.1186/s12864-015-1812-x

- Dheilly N, Maure F, Ravallec M *et al.* (2015) Who is the puppet master? Replication of a parasitic wasp-associated virus correlates with host behaviour manipulation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **282**, 1-10. doi:10.1098/rspb.2014.2773
- Eberhard W, Gonzaga M (2019) Evidence that Polysphincta-group wasps (Hymenoptera: Ichneumonidae) use ecdysteroids to manipulate the web-construction behaviour of their spider hosts. *Biological Journal of the Linnean Society*, **127**, 429–471. doi:10.1093/biolinnean/blz044/5480918
- Esteves FG, Santos-Pinto JA, Ferro M *et al.* (2020) Revealing the venomous secrets of the spider's web. *Journal of Proteome Research*, **19**, 3044–3059. doi:10.1021/acs.jproteome.0c00086
- Feldmeyer B, Mazur J, Beros S, Lerp H, Binder H, Foitzik S (2016) Gene expression patterns underlying parasite-induced alterations in host behaviour and life history. *Molecular Ecology*, **25**, 648-660. doi:10.1111/mec.13498
- Gonzaga M, Pádua D, Quero A (2022) Inclusion of an alien species in the host range of the Neotropical parasitoid *Hymenoepimecis bicolor* (Brullé, 1846) (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Journal of Hymenoptera Research*, **89**, 9-18. doi:10.3897/jhr.89.76620
- Gonzaga M, Rios Moura R, Teixeira Pêgo P, Lee Bang D, Meira F (2015) Changes to web architecture of *Leucauge volupis* (Araneae: Tetragnathidae) induced by the parasitoid *Hymenoepimecis jordanensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Behaviour*, **152**, 181-193. doi:10.1163/1568539X-00003238
- Gonzaga M, Sobczak J, Penteadó-Dias A, Eberhard W (2010) Modification of *Nephila clavipes* (Araneae Nephilidae) webs induced by the parasitoids *Hymenoepimecis bicolor* and *H. robertsae* (Hymenoptera Ichneumonidae). *Ethology Ecology and Evolution*, **22**, 151-165. doi:10.1080/03949371003707836
- Grosh S (2018) Sialylation and sialyltransferase in insects. *Glycoconjugate Journal*, **35**, 433–441. doi:10.1007/s10719-018-9835-6
- Harduin-Lepers A (2023) The vertebrate sialylation machinery: structure-function and molecular evolution of GT-29 sialyltransferases. *Glycoconjugate Journal*, **40**, 473–492. doi:10.1007/s10719-023-10123-w
- Herbison R (2017) Lessons in mind control: Trends in research on the molecular mechanisms behind parasite-host behavioral manipulation. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **102**, 1-15. doi:10.3389/fevo.2017.00102
- Hoover K, Grove M, Gardner M, Hughes DP, McNeil J, Slavicek J (2011) A gene for an extended phenotype. *Science*, **333**, 1401. doi:10.1126/science.1209199
- Hughes D, Araújo J, Loreto R, Quevillon L, de Bekker C, Evans H (2016) From so simple a beginning. The evolution of behavioral manipulation by fungi. *Advances in Genetics*, **94**, 437-469. doi:10.1016/bs.adgen.2016.01.004
- Isaac RE, Bland ND, Shirras AD (2009) Neuropeptidases and the metabolic inactivation of insect neuropeptides. *General and Comparative Endocrinology*, **162**, 8–17. doi:10.1016/j.ygcen.2008.12.011
- Khamtorn P, Peigneur S, Amorim FG, Quinton L, Tytgat J, Daduang S (2022) De Novo transcriptome analysis of the venom of *Latrodectus geometricus* with the discovery of an insect-selective Na channel modulator. *Molecules*, **27**, 1-22. doi:10.3390/molecules27010047

- Kloss T, Gonzaga M, De Oliveira L, Sperber C (2017) Proximate mechanism of behavioral manipulation of an orb-weaver spider host by a parasitoid wasp. *PLoS ONE*, **12**, e0171336. doi:10.1371/journal.pone.0171336
- Kloss T, Gonzaga M, Roxinol J, Sperber C (2016) Host behavioural manipulation of two orb-weaver spiders by parasitoid wasps. *Animal Behaviour*, **111**, 289-296. doi:10.1016/j.anbehav.2015.11.001
- Lafferty KD, Shaw JC (2013) Comparing mechanisms of host manipulation across host and parasite taxa. *The Journal of Experimental Biology*, **216**, 56-66. doi:10.1242/jeb.073668
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, **15**, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- Mangold CA, Ishler MJ, Loreto RG, Hazen ML, Hughes DP (2019) Zombie ant death grip due to hypercontracted mandibular muscles. *Journal of Experimental Biology*, **222**, jeb200683. doi:10.1242/jeb.200683
- Marr RA, Hafez DM (2014) Amyloid-beta and Alzheimer's disease: the role of neprilysin-2 in amyloid-beta clearance. *Frontiers in Aging Neuroscience*, **187**, 1-7. doi:10.3389/fnagi.2014.00187
- Mishina T, Chiu MC, Hashiguchi Y *et al.* (2023) Massive horizontal gene transfer and the evolution of nematomorph-driven behavioral manipulation of mantids. *Current Biology*, **33**, 4988–4994. doi:10.1016/j.cub.2023.09.052
- Mohan P, Sinu P (2022) Is direct bodyguard manipulation a parasitoid-induced stress sleep? A new perspective. *Biology Letters*, **18**, 1-7. doi:10.1098/rsbl.2022.0280
- Moore J (2002) *Parasites and the Behaviour of Animals*. London: Oxford University Press.
- Nalivaeva N, Zhuravin I, Turner A (2020) Neprilysin expression and functions in development, ageing and disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, **192**, 111363. doi:10.1016/j.mad.2020.111363
- Poulin R (2010) Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions. In: Brockmann HJ *et al.*, *Advances in the Study of Behavior*. Burlington: Academic Press, **41**: 151-186. doi:10.1016/S0065-3454(10)41005-0
- Poulin R, Jorge F, Salloum P (2023) Inter-individual variation in parasite manipulation of host phenotype: A role for parasite microbiomes? *Journal of Animal Ecology*, **00**, 807-812. doi:10.1111/1365-2656.13764
- Prolo LM, Vogel H, Reimer RJ (2009) The lysosomal sialic acid transporter Sialin is required for normal CNS myelination. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 15355–15365. doi:10.1523/JNEUROSCI.3005-09.2009
- Sawadro M, Bednarek A, Babczyńska A (2017) The current state of knowledge on the neuroactive compounds that affect the development, mating and reproduction of spiders (Araneae) compared to insects. *Invertebrate Neuroscience*, **17**. doi:10.1007/s10158-017-0197-8
- Takasuka K, Broad GR (2024) A bionomic overview of spider parasitoids and pseudo-parasitoids of the ichneumonid wasp subfamily Pimplinae. *Contributions to Zoology*, 1-106. doi:10.1163/18759866-bja10053
- Thomas F, Adamo S, Moore J (2005) Parasitic manipulation: Where are we and where should we go? *Behavioural Processes*, **68**, 185-199. doi:10.1016/j.beproc.2004.06.010

- Thomas F, Poulin R, Brodeur J (2010) Host manipulation by parasites: A multidimensional phenomenon. *Oikos*, **119**, 1217-1223. doi:10.1111/j.1600-0706.2009.18077.x
- Van Houte S, Ros V, Van Oers M (2013) Walking with insects: Molecular mechanisms behind parasitic manipulation of host behaviour. *Molecular Ecology*, **22**, 3458-3475. doi:10.1111/mec.12307
- Webster JP, Kaushik M, Bristow GC, McConkey GA (2013) *Toxoplasma gondii* infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour? *The Journal of Experimental Biology*, **216**, 99-112. doi:10.1242/jeb.074716
- Will I, Das B, Trinh T, Brachmann A, Ohm RA, de Bekker C (2020) Genetic underpinnings of host manipulation by *Ophiocordyceps* as revealed by comparative transcriptomics. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, **10**, 2275–2296. doi:10.1534/g3.120.401290
- World Spider Catalog*, 25.0. (2024). Natural History Museum Bern. doi:10.24436/2
- Yang Z, Yan Y, Wu Y, Yu N, Liu Z (2023) EcR/USP-1-mediated ecdysteroid signaling regulates wolf spider (*Pardosa pseudoannulata*) development and reproduction. *Zoological research*, **44**, 43-52. doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2022.282
- Yang Z, Yu N, Wang S, Korai S, Liu Z (2021) Characterization of ecdysteroid biosynthesis in the pond wolf spider, *Pardosa pseudoannulata*. *Insect Molecular Biology*, **30**, 71-80. doi:10.1111/imb.12678
- Yu DS (2009) *Taxapad Ichneumonoidea*. Catalogue of Life Checklist. Access in: <https://web.archive.org/web/20180906195542/http%3A//www.ichneumonoidea.name>

Declaração de acessibilidade de dados

Os dados utilizados neste estudo estão disponíveis no material suplementar disponibilizado.

Declaração de repartição de benefícios

Benefícios gerados: Os benefícios desta pesquisa advêm da partilha dos nossos dados e resultados em bases de dados públicas, conforme descrito acima.

Contribuições dos autores

I.M.D.: concepção, análises formais, investigação, redação — rascunho original; L.M.R.T.: análises formais, investigação, supervisão, validação; T.M-P.: análises formais, investigação, validação, redação — revisão e edição; B.B.: análises formais; AGN: validação, financiamento; V.A.C.A.: financiamento; T.G.K.: concepção, supervisão, validação, financiamento, redação — revisão e edição.

Ética

Nenhuma das espécies utilizadas neste trabalho está ameaçada e é de grande abundância nas regiões Neotropicais e poucos indivíduos foram coletados no total (12). As mortes induzidas foram indolores para os artrópodes e nenhum princípio ético foi infligido.

Declaração de uso de IA

Declaramos não utilizar nenhuma tecnologia assistida por IA para a produção deste artigo.

Declaração de conflito de interesses

Declaramos que não temos interesses conflitantes.

Financiamento

Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concedida pelo Programa de Demanda Social (DS 88887.675248/2022-00).

Material Suplementar

Modificação comportamental de aranhas por vespas parasitoides: sequenciamento do transcrito e análise de expressão gênica diferencial (DGE) dos hospedeiros

Autores: Ítalo Mendes Delazari¹, Luiz Marcelo Ribeiro Tomé², Thairine Mendes-Pereira², Bertram Brenig³, Aristóteles Góes-Neto², Vasco Ariston de Carvalho Azevedo⁴ and Thiago Gechel Kloss^{1*}

¹ Laboratory of Behavioral Ecology, Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brazil.

² Laboratory of Molecular and Computational Biology of Fungi, Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ Institute of Veterinary Medicine, Department of Molecular Biology of Livestock, Georg August University Göttingen, Göttingen 37077, Germany.

⁴ Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

ORCID: [IMD, 0000-0002-8413-4705](https://orcid.org/0000-0002-8413-4705); [LMRT, 0000-0002-1477-5558](https://orcid.org/0000-0002-1477-5558); [TM-P, 0000-0002-3707-9790](https://orcid.org/0000-0002-3707-9790); [BB, 0000-0002-7635-9656](https://orcid.org/0000-0002-7635-9656); [AG-N, 0000-0002-7692-6243](https://orcid.org/0000-0002-7692-6243); [VACA, 0000-0002-4775-2280](https://orcid.org/0000-0002-4775-2280); [TGK, 0000-0003-0958-1748](https://orcid.org/0000-0003-0958-1748)

***Autor para correspondência:** Thiago G Kloss, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. E-mail: thiago.kloss@ufv.br

Tabela S1. Identificação das amostras e informação de coleta. Cada aranha foi dividida em duas réplicas técnicas, cada linha de identificação contém os códigos das réplicas referentes à respectiva aranha.

Amostra	Data de coleta	Local de coleta	Horário de coleta
PA1/PA2	15/05/2022	Mata do Paraíso	16:14
NP1/NP2	15/05/2022	Mata do Paraíso	16:16
PA3/PA4	19/05/2022	Mata da Biologia	11:12
NP3/NP4	19/05/2022	Mata da Biologia	11:10
PA5/PA6	03/06/2022	Mata da Biologia	09:07
NP5/NP6	03/06/2022	Mata da Biologia	09:08
PA7/PA8	09/06/2022	Mata do Paraíso	09:23
NP7/NP8	09/06/2022	Mata do Paraíso	09:25
PA9/PA10	01/07/2022	Mata do Chaves	09:45
NP9/NP10	01/07/2022	Mata do Chaves	09:49
PA11/PA12	13/07/2022	Mata do Chaves	15:25
NP11/NP12	13/07/2022	Mata do Chaves	15:27

CONCLUSÕES GERAIS

A capacidade de alguns parasitas de induzir modificações em seus hospedeiros e se beneficiar dessas alterações é um fenômeno que intriga diversos pesquisadores há décadas. Os mecanismos de manipulação comportamental utilizados por diferentes parasitas ainda não estão claros e múltiplos fatores parecem influenciar nesse processo. Ainda faltam informações básicas sobre a biologia dos organismos envolvidos nessas interações. Porém, o estudo desses mecanismos pode nos fornecer insights de como esse tipo de interação foi selecionada ao longo do tempo evolutivo.

Por meio deste trabalho conseguimos identificar os possíveis mecanismos e processos que estão envolvidos em interações entre aranhas e os parasitas capazes de manipular seu comportamento. Diversas evidências apontam para a possibilidade de parasitas filogeneticamente distantes que infectam um mesmo grupo de hospedeiro, no caso as aranhas, podem ter encontrado mecanismos semelhantes capazes de gerar comportamentos alterados que os beneficiam de forma parecida. Esses mecanismos provavelmente seriam ativados utilizando a maquinaria do próprio hospedeiro, representando uma economia no gasto energético para o parasita. Aqui, levantamos a hipótese de que essa convergência de mecanismos seja baseada na ativação anacrônica da ecdise, por meio da produção de ecdisteroides nas aranhas. Essa hipótese surge principalmente pelo fato de muitas aranhas com o comportamento alterado construírem teias modificadas semelhantes às suas teias de ecdise. No entanto, devido as diversas formas de infecção por parasitas com hábitos distintos, as vias por quais eles acionam esse mecanismo não devem ser as mesmas. Dentre as possíveis vias de ativação está o acesso direto do parasita ao sistema nervoso central do hospedeiro, a indução de um estado de estresse ou quiescência ou mesmo a ativação do sistema imune do hospedeiro, seja devido aos danos causados e consumo de recursos ou por meio de uma simbiose com microrganismos que os parasitas carregam. Dessa forma, alguns métodos de análises como as chamadas ômicas (genômica, transcritômica e protômica) podem ser essenciais para compreendermos os mecanismos proximais envolvidos na manipulação comportamental, como demonstrado neste estudo.

De outro ponto de vista, as análises de expressão gênica diferencial utilizando o transcrito de aranhas *Trichonephila clavipes* parasitadas pela vespa *Hymenoepimecis bicolor* podem indicar que a síntese de ecdisteroides nas aranhas pode não ser induzida

nestas aranhas. Isso sugere que esses hormônios e a ativação da ecdise poderiam não estar associado ao mecanismo de manipulação neste sistema e que as semelhanças entre a teia de ecdise e a teia modificada podem ser apenas uma coincidência. Contudo, é possível que a síntese de ecdisteroides seja realizada em momentos anteriores do parasitismo o que explicaria a baixa regulação dos genes associados a eles que encontramos. Além disso, diversos outros genes foram expressos diferencialmente, inclusive alguns que conseguimos identificar como prováveis candidatos a gerarem alterações comportamentais nas aranhas. Entre esses, destacam-se genes codificadores de proteínas e enzimas reguladoras do sistema nervoso, do sistema imune e proteínas estruturais do sistema motor. Além disso, outros genes, como codificadores de toxinas presentes no veneno das aranhas, também chamam a atenção, mas pode ser apenas uma resposta de defesa da aranha. Isso mostra que os mecanismos de manipulação comportamental de hospedeiros por parasitas podem ser muito complexos e identificar um único fator como responsável pode não ser possível, principalmente devido aos vários sistemas ativados e a interconexão entre eles. Portanto, para compreendermos com precisão como as vespas manipulam o comportamento das aranhas, devemos ter que verificar diferenças na expressão em diferentes etapas do parasitismo, tanto no hospedeiro quanto no parasita. Outras ferramentas de análises como a proteômica também podem ser essenciais para a identificação desses mecanismos. Porém, os resultados encontrados fornecem novas perspectivas que podem nos ajudar a entender todo esse processo e o que leva as aranhas, e até mesmo outros grupos de hospedeiros, a modificarem seu comportamento.

REFERÊNCIAS

- DAWKINS, Richard. **The Extended Phenotype**. Oxford: Oxford University Press, 1982. 307 p.
- DURKIN, E. S. *et al.* Parasites of spiders: Their impacts on host behavior and ecology. **Journal of Arachnology**, v. 49, n. 3, p. 281-298, dez. 2021. DOI 10.1636/JoA-S-20-087. Disponível em: <https://doi.org/10.1636/JoA-S-20-087>.
- EBERHARD, W. G.; GONZAGA, M. O. Evidence that *Polysphincta*-group wasps (Hymenoptera: Ichneumonidae) use ecdysteroids to manipulate the web-construction behaviour of their spider hosts. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.127, n. 2, p. 429–471. 2019. DOI 10.1093/biolinnean/blz044/5480918. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz044/5480918>.
- KLOSS, T. G. *et al.* Proximate mechanism of behavioral manipulation of an orb-weaver spider host by a parasitoid wasp. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171336, fev. 2017. DOI 10.1371/journal.pone.0171336. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171336>.

MOORE, Janice. **Parasites and the Behaviour of Animals**. Oxford Series in Ecology and Evolution, London: Oxford University Press, 2002. 338 p.

PONTON, F. *et al.* Do distantly related parasites rely on the same proximate factors to alter the behaviour of their hosts? **Proceedings of Royal Society B**, v. 273, p. 2869 – 2877, ago. 2006. DOI 10.1098/rspb.2006.3654. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3654>.

POULIN, R. Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions. *In*: BROCKMANN, H. J. *et al.* **Advances in the Study of Behavior**.

Burlington: Academic Press, 2010. v. 41, cap. 5, p. 151 – 186. DOI 10.1016/S0065-3454(10)41005-0. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(10\)41005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(10)41005-0)

THOMAS, F.; POULIN, R.; BRODEUR, J. Host manipulation by parasites: A multidimensional phenomenon. **Oikos**, v. 119, n. 8, p. 1217-1223, ago. 2010. DOI 10.1111/j.1600-0706.2009.18077.x. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.18077.x>.