

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NORATH NATALIA GONZÁLEZ CABALLERO

Caracterização de sequencias de ESTs e proteômica da glândula de feromônio
de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae).

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor
em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Dr. Reginaldo Peçanha Brazil
Dra. Patricia Cuervo

RIO DE JANEIRO

2013

Caballero, Norath Natalia González.

Caracterização de sequencias de ESTs e proteômica da glândula de feromônio de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). / Norath Natalia González Caballero. - , 2013.

91 f.; il.

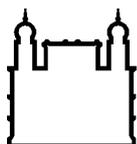
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Orientador: Reginaldo Peçanha Brazil.

Co-orientadora: Patricia Cuervo.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Lutzomyia longipalpis*. 2. Glândula feromônio. 3. sequencias EST. 4. Proteômica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

NORATH NATALIA GONZÁLEZ CABALLERO

Caracterização de sequencias de ESTs e proteômica da glândula de feromônio de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae).

ORIENTADOR (ES): Dr. Reginaldo Peçanha Brazil
Dra. Patricia Cuervo

Aprovada em: 21 / 05 / 2013

EXAMINADORES:

Dr. André Pitaluga - Presidente
Dra. Denise Dias
Dra. Mara Pinto
Dra. Daniele Pereira de Castro – suplente
Dr. José Batista de Jesus - suplente

Rio de Janeiro, 21 de maio de 2013

Dedicatória

A mamá, quien desde siempre alienta con amor incondicional cada paso que doy....

A papá, quien inspiró coraje, resistencia y amor a mi caminar.

Agradecimentos

Ao Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) e por intermédio deste, aos órgãos de fomento científico CAPES e CNPQ pela oportunidade de realizar meus estudos de pós-graduação no Brasil.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pela orientação acadêmica nestes anos. Especialmente, a seus funcionários pela ajuda constante perante os órgãos de fomento e àqueles que permitiram meus estudos no Brasil.

Ao Dr Reginaldo Brazil, meu orientador desde o mestrado, pela confiança e constante apoio nestes anos de trabalho. O senhor não só me abriu as portas da sua equipe de trabalho, mas também me mostrou caminhos que jamais imaginei percorrer. Sob sua orientação adquiri muito mais do que treinamento profissional e amadurecimento científico, levo comigo ensinamentos valiosos que lembrarei com imensa gratidão.

À Dra Patricia Cuervo pelo voto de confiança e o apoio que foram cruciais para a finalização desta tese. Este período trabalhando juntas foi muito precioso não apenas na minha formação acadêmica, mas também como pessoa. Sempre serei muito grata por tudo.

Às minhas amigas: Marcela, Andressa, Caroline, Rozana, Cecília, e Danielle, graças a vocês a minha experiência no Rio tem sido única e inesquecível. Vocês estiveram sempre em todos os momentos, me ensinaram, me apoiaram me ajudaram e acompanharam. Muito obrigada meninas!

Aos meus colegas do laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos; Severino, Márcia, Raquel, Maiara, Fernando, Hector e Samara pelo companheirismo e a amizade.

Aos meus amigos Nathalia, Camilinha, Monica, Léo, Andrés, André e Geovane pela força, estímulo e a ajuda que foram fundamentais neste período de aprendizado.

Ao Dr Eloi Garcia pelos ensinamentos e apoio de sempre.

À Dra Patricia de Azambuja por ter me recebido no seu laboratório e me apoiado continuamente.

Aos companheiros na manutenção da colônia de insetos, especialmente ao Francisco pelo auxílio indispensável sem o qual esta dissertação não andaria.

À minha avó que com suas orações me acompanhou em todos os momentos.

A meus familiares que estiveram sempre comigo apoiando-me, especialmente a meus irmãos que mesmo desde longe estão sempre me incentivando em cada desafio.

A meus amigos fora do Brasil que estão sempre na torcida e também no meu coração.

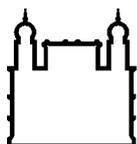
A minha amiga Olga Recalde cuja ajuda foi muito importante para a finalização desta tese.

Agradeço especialmente ao meu marido Victor, por toda a ajuda, e o estímulo incondicional em todos os momentos.

E finalmente, a todos os que de alguma forma deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada... lhes deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Epígrafe

Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores,
há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida e estes são
imprescindíveis.
(Bertold Brecht)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

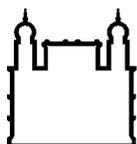
Caracterização transcriptômica e proteômica da glândula de feromônio de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae).

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Norath Natalia González Caballero

Lutzomyia longipalpis é o principal vetor de *Leishmania infantum*, que é o agente etiológico da Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Considerado um complexo de espécies crípticas, *Lutzomyia longipalpis* utiliza diferentes feromônios terpenóides (produzidos por machos) que atuam como atraentes para as fêmeas, e ao mesmo tempo como feromônios de agregação para os machos. Apesar do conhecimento dos principais componentes químicos das misturas de feromônios nada se sabe sobre os genes ou as moléculas diretamente envolvidas na biossíntese ou da sua regulação. Tais moléculas podem representar alvos alternativos de estratégias de controle das populações desses insetos vetores. Neste sentido através de uma abordagem descritiva foi realizado o estudo das sequências de ESTs assim como também a caracterização subproteômica da glândula de feromônio. Com as análises dos transcritos e através de pesquisas nas bases de dados públicos, um grupo de moléculas potencialmente envolvidas na produção de precursores de terpenóides foi identificado no quarto segmento abdominal (segmento que contém a glândula de feromônio). Tais moléculas incluem transcritos de possíveis enzimas da via do ácido mevalônico e sequências associadas à preniltransferases. Motivados por estes resultados também foi realizada uma análise subproteômica da glândula de feromônio combinando cromatografia líquida SDS-PAGE acoplada com espectrometria de massas LC-MS/MS e análises dos dados. Tendo em conta que a anotação funcional das sequências do genoma de *Lutzomyia longipalpis* ainda é escassa, nós projetamos um fluxo de trabalho alternativo para o mapeamento proteômico da glândula. As sequências MS/MS foram pesquisadas contra dois bancos de dados personalizados, utilizando três motores de busca: MASCOT, OMSSA e ProLuCid. Com esta abordagem, foi possível obter as evidências de expressão das enzimas identificadas pela análise de transcritos e ainda aumentar o espaço de busca por similaridade e ampliar as identificações das proteínas da glândula de feromônio de *L. longipalpis*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização transcriptômica e proteômica da glândula de feromônio de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae).

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Norath Natalia González Caballero

Lutzomyia longipalpis is the main vector of *Leishmania infantum*, the etiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL). Considered a complex of cryptic species, *Lutzomyia longipalpis* use male-produced terpenoid pheromones to attract females for mating and males for aggregation. Despite the chemical identification of the main pheromone blend components, there is no information regarding genes and proteins directly involved in the biosynthetic process. These molecules may represent alternative targets for insect population control. In this respect, we studied the pheromone gland using a descriptive approach including a ESTs sequencing and a subproteomic analysis. Through blast searches of public databases, a group of transcripts encoding proteins potentially involved in the production of terpenoid precursors were identified in the 4th abdominal tergite, the segment containing the pheromone gland. Such molecules include transcripts potentially related to the mevalonate pathway enzymes as well as prenyltransferases. Motivated by these results we performed a subproteomic analysis of this tissue combining SDS-PAGE liquid chromatography in line with tandem mass spectrometry LC-MS/MS and data mining. Considering that the functional annotation of genome sequences of *Lutzomyia longipalpis* is relatively scarce, we designed an alternative workflow searching MS/MS data against two customized databases using three search engines: Mascot, OMSSA, and ProLuCid. Through this approach it was possible to obtain evidence of expressions for those molecules found in the transcriptome and also broadens the search records to allow a confident identification of *L. longipalpis* proteins by similarity analysis.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	COMUNICAÇÃO QUÍMICA.....	1
1.2	O ESTUDO DOS FEROMÔNIOS NOS INSETOS.	3
1.2.1	<i>Principais características dos feromônios identificados em algumas ordens de insetos.....</i>	3
1.3	FLEBOTOMÍNEOS.....	6
1.3.1	<i>Posição Sistemática</i>	6
1.3.2	<i>A importância médica veterinária</i>	7
1.3.3	<i>Biologia dos flebotomíneos.</i>	9
1.3.4	<i>O estudo das populações de Lutzomyia longipalpis.</i>	10
1.3.5	<i>Feromônios no complexo Lutzomyia longipalpis</i>	12
1.4	DESVENDANDO ROTAS DE BIOSÍNTESE EM INSETOS	15
1.4.1	<i>Rotas de biossíntese de feromônios.</i>	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	RESULTADOS.....	19
4	ARTIGO 1:	20
5	ARTIGO 2:.....	21
6	DISCUSSÃO	22
7	REFERENCIAS	31
8	TRABALHO EM COLABORAÇÃO (Anexo)	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Comunicação química

Além de modos sonoros e visuais de comunicação, os organismos vivos usam sinais químicos para a transmissão de informações entre indivíduos. Esta linguagem é utilizada por bactérias, fungos, plantas e animais sendo considerada a mais antiga e difundida troca de informação na natureza (Arn *et al.*, 2000; Steiger *et al.*, 2011).

Os agentes químicos que carregam mensagens entre os organismos são denominados semioquímicos, termo proveniente da palavra grega *semeon* que significa “marca ou sinal químico” (Law & Regnier, 1971). Os semioquímicos são subdivididos em aleloquímicos e feromônios, dependendo, se a transferência de informação é interespecífica ou intraespecífica respectivamente (Nordlund & Lewis, 1976).

Aleloquímicos são compostos secretados por um indivíduo de uma espécie e recebidos por indivíduos de outras espécies. Na natureza, essas substâncias possuem um papel importante nas relações entre diversos organismos tais como predador-presa, parasita-hospedeiro, herbívoro-planta entre outras, mediando interações entre organismos de até três ou mais níveis tróficos (Price *et al.*, 1980, Simpson & Raubenheimer, 2001). Os aleloquímicos podem ser classificados em cairomônios (beneficia o receptor), alomônios (beneficia o emissor) e sinomônios (beneficiam ambos, receptor e emissor) de acordo com a mensagem química para o qual sinalizam (Francke & Schulz, 1999).

A origem do termo “feromônio” está relacionada com a união das palavras gregas *pherein* e *horman* que significam carregar e estimular respectivamente. Esta terminologia foi proposta por Karlson e Butenandt (1959) para mencionar a substância química ou mistura de substâncias que atuam na comunicação entre indivíduos de uma determinada espécie, ao contrário dos hormônios, substâncias que atuam no interior do organismo como mensageiros entre órgãos e tecidos. Além disto, outra característica diferencial é a conservação da identidade química das moléculas. Enquanto que os tipos de compostos usados como feromônios ou aleloquímicos são altamente variáveis, os hormônios são relativamente conservados, podendo o mesmo composto químico, exercer sua ação de forma comum em diversas espécies de insetos (Morgan, 2010).

Entre os insetos a comunicação por feromônios representa uma das ferramentas mais desenvolvidas e usadas para o desempenho das atividades vitais. Estes podem atuar

provocando um comportamento imediato, os desencadeadores, ou, podem atuar na fisiologia do organismo receptor provocando uma resposta prolongada e mais lenta, os preparadores (Wilson & Bossert, 1963). Diferentes tipos de feromônios desencadeadores são reconhecidos dependendo do estímulo provocado no receptor. Os comportamentos mais comuns são: agregação, acasalamento, detecção do perigo ou alarme, demarcação de espaço, formação de trilha ou escolha de locais para oviposição. Por outro lado, o uso dos feromônios preparadores, é atribuídos comumente a insetos sociais, como parte de estratégias para o estabelecimento e manutenção da estrutura de colônias. Recentemente a estrutura química de alguns feromônios preparadores foi identificada em espécies da ordem Hymenoptera (Holman *et al.*, 2010; Conte & Hefetz, 2008). A determinação das castas ou o desenvolvimento reprodutivo são alguns exemplos de respostas reguladas por esse tipo de feromônio, especialmente na estrutura de colônias de insetos sociais. Feromônios preparadores são primariamente produzidos por rainhas e transportados pelos operários (Beggs *et al.*, 2007, Grozinger *et al.*, 2003).

Sendo assim, os semioquímicos são classificados de acordo com o tipo de interação e modo de ação (Figura 1), embora possam ser classificados, de acordo com o contexto, em diversas categorias devido a ampla funcionalidade que alguns semioquímicos apresentam (Morse, 1972, Whitman, 1988).

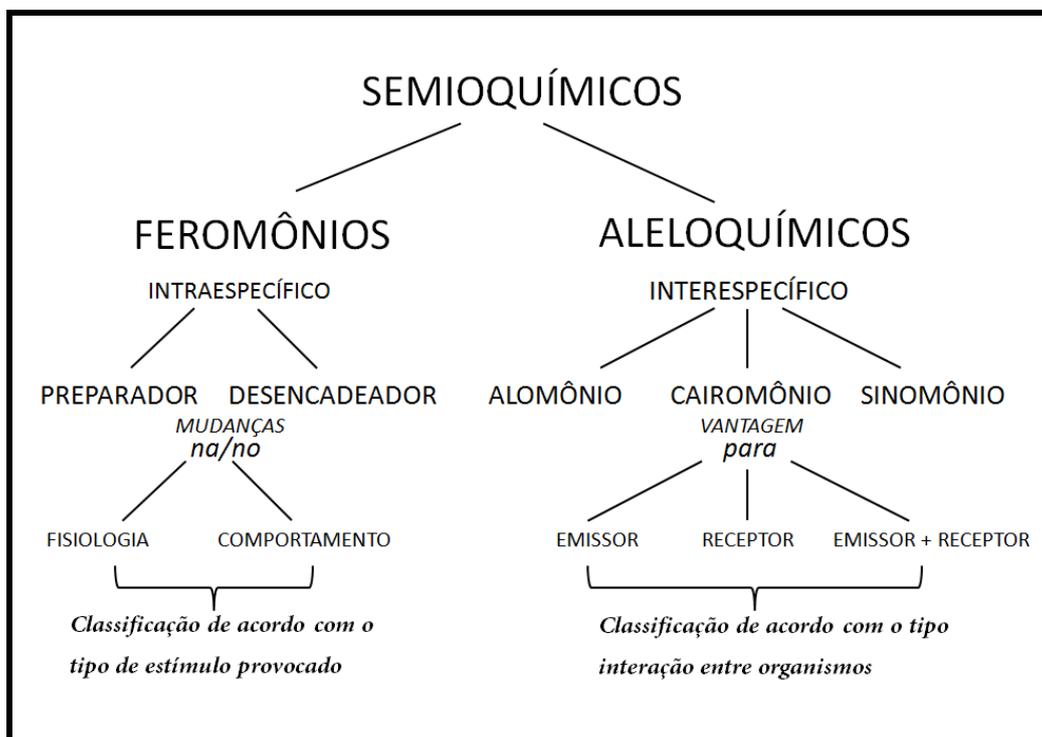


Figura 1. Nomenclatura e classificação dos semioquímicos (modificado de Francke & Schulz, 1999).

1.2 O estudo dos feromônios nos insetos.

Devido às consequências da ação de determinados insetos fitófagos ou de vetores de agentes patogênicos, nas últimas décadas têm sido desenvolvidas e aplicadas estratégias inovadoras empregadas como alternativas ao uso de inseticidas. A utilização de semioquímicos representa uma prática menos prejudicial ao ecossistema e apresenta-se como um elemento promissor do manejo integrado para um grande número de espécies de insetos. Das inúmeras possibilidades de usos de diferentes semioquímicos, até hoje, os avanços nas pesquisas estão mais relacionados aos feromônios sexuais. A facilidade de manipulação dos comportamentos reprodutivos entre indivíduos de uma mesma espécie, e a preservação dos inimigos naturais nos ecossistemas agrícolas são alguns dos fatores que estimulam a utilização destas substâncias no monitoramento de insetos (Jutsum & Gordon, 1989, Witzgall et al., 2010). Com o uso de feromônios sexuais é possível intervir em diferentes estágios do processo de cópula, permitindo o controle de populações mediante a captura massal, confundimento sexual ou ainda para o simples monitoramento da presença do inseto no campo.

O feromônio sexual pode ser um composto químico, ou por outro lado, uma mistura de compostos de uma grande variedade de moléculas, desde longas cadeias alifáticas (voláteis) até pequenas moléculas cíclicas. Uma vez liberados no meio ambiente, os feromônios, podem ser detectados pelos organismos receptores em concentrações extremamente baixas (Minor & Kaissling, 2003).

1.2.1 Principais características dos feromônios identificados em algumas ordens de insetos

Lepidoptera

O primeiro feromônio isolado e identificado, segundo a literatura, foi o bombicol, produzido pela mariposa do bicho da seda, *Bombyx mori*. Após 20 anos de pesquisa, Butenandt e colaboradores (1959) determinaram a estrutura química deste feromônio como (E,Z)-10,12-hexadecadien-1-ol. Desde então, uma grande variedade de semioquímicos foi identificada assim como os comportamentos por estes provocados, a partir dos avanços no desenvolvimento de metodologias e de ferramentas de análises cada vez mais sensíveis.

Em Lepidoptera, comumente os feromônios sexuais são produzidos e liberados pelas fêmeas para atração dos machos a longa distância. A maior parte destes mensageiros são

moléculas de 10 a 18 carbonos e conseqüentemente apresentam características comuns, como baixo peso molecular e alta volatilidade. Os grupos químicos predominantes são os alcoóis, acetatos ou aldeídos, seguidos pelos hidrocarbonetos polienos e epóxidos que se apresentam em menor abundância (Millar, 2000).

Neste grupo de insetos os feromônios sexuais comumente estão constituídos por misturas de cinco ou seis componentes (Silverstein & Young, 1976; Wyatt, 2003) atuando no desencadeamento de comportamentos pré-copulatórios somente entre indivíduos de uma determinada espécie (Wyatt, 2003). Desta forma, o caráter “privado” das mensagens é adquirido como resultado das funções predeterminadas como comprimento da cadeia; presença de grupos funcionais; número de insaturações; posição de duplas ligações e isometria espacial dos compostos (Linn & Roelofs, 1989).

A biossíntese do feromônio sexual e sua posterior liberação ocorrem geralmente em glândulas localizadas entre o oitavo e nono segmento abdominal (Ma *et al.*, 2003, Roelofs & Rooney, 2003). Uma vez que a maior parte dos componentes químicos dos feromônios consiste de moléculas de cadeias lineares com número par de carbonos, presumi-se que estes são sintetizados através de modificações da biossíntese dos ácidos graxos (Jurenka, 2004). Conseqüentemente, este processo é resultado da ação de sistemas enzimáticos especializados em reações de encurtamentos de cadeias, dessaturações ou modificações de grupos funcionais dos ácidos graxos (revisto em Jurenka, 2004).

Coleoptera

Um grande número de coleópteros fitófagos é economicamente importante por serem pragas de cultivos, florestas e produtos armazenados, atuando como vetores de fungos e vírus. As conseqüências de tais efeitos os tornou foco de muitas pesquisas como, por exemplo, o estudo da comunicação inter e intraespecífica. Semelhantemente à grande variedade de coleópteros, as estruturas químicas dos feromônios por eles utilizados são muito diversas (Blomquist & Vogt, 2003). Alguns escaravelhos, (subfamília Rutelinae), por exemplo, utilizam derivados da síntese de ácidos graxos (Leal *et al.*, 1999), enquanto que outros (subfamília Melolonthinae) usam derivados de aminoácidos ou compostos terpenóides como feromônios (Leal *et al.*, 2003; Leal, 1999; Zhang *et al.*, 1997; Francke & Dettner, 2005). Recentemente grande parte da literatura sobre feromônios de coleópteros e outros

insetos foi compilada num abrangente banco de dados gratuitamente disponível com o nome de *The Pherobase* (El-Sayed, 2012).

Dependendo da espécie, a produção de feromônios pode ocorrer no abdômen (revisto em Plarre & Vanderwel, 1999), em glândulas definidas (Merivee & Erm, 1993), ou em grupos de células de áreas anatômicas resolvidas que não chegam a conformar uma glândula, mas são sítios de biossíntese identificados (Nardi *et al.*, 1996). Por outro lado também foi observada a presença de possíveis glândulas em outras localizações anatômicas como no caso da antena de *Batrisodes oculatus* (de Mazo & Vit, 1983) ou nas patas de *Tribolium castaneum* (Faustini *et al.*, 1981).

Devido ao poder destrutivo de alguns insetos da família Scolytidae, considerados importantes pragas agrícolas, a comunicação química destes foi foco de muitos estudos no Hemisfério Norte (Pureswaran *et al.*, 2000; Erbilgin *et al.*, 2003; Seybold *et al.*, 2006). Um considerável número de espécies utilizam feromônios isoprenóides (Seybold *et al.*, 2000) e a produção destes, pode ser resultado de modificações de compostos derivados da dieta (Vanderwel, 1994; Blomquist *et al.*, 2010) ou sintetizados “*de novo*” (Seybold *et al.*, 1995; Tillman *et al.*, 1998).

Diptera

Similarmente ao observado na ordem Coleoptera, nos insetos dípteros, existe uma extraordinária diversidade e complexidade na comunicação por semioquímicos (Wicker-Thomas, 2007). No entanto, a maioria dos feromônios sexuais descritos neste grupo são hidrocarbonetos de 21 carbonos ou até mais longos, atuando como feromônios de curto alcance ou de contato (Blomquist *et al.*, 1993). Esses compostos são sintetizados através de modificações do metabolismo de lipídeos cuticulares em células epidérmicas, denominadas oenócitos (Nelson & Blomquist, 1995). Uma vez produzidos, o feromônios são depositados sobre a superfície cuticular (Ismail & Kremer, 1983, Langley & Carlson, 1983).

Nesta ordem o primeiro feromônio identificado foi o moscalure ou (Z)-9-tricoseno que foi isolado da cutícula e das fezes de fêmeas da mosca comum, *Musca domestica* (Carlson *et al.*, 1971). A existência dele foi primeiramente demonstrada por Rogoff e colaboradores (1964) através de testes de atração dos machos à fonte de odor. Apesar de não ter ação tóxica para os insetos, o moscalure é reconhecido como pesticida bioquímico (EPA, 2013) já que é

utilizado como atraente em armadilhas como uma das medidas de monitoramento da reprodução destes insetos.

Também foram identificados feromônios, no gênero *Drosophila*, que reúne insetos considerados modelos para estudos de desenvolvimento, genética, fisiologia e comportamento. Neste táxon, o primeiro feromônio caracterizado foi o (Z,Z)-7,11-heptacosadiene produzido pela mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (Antony & Jallon, 1982). Essa substância é considerada um potente afrodisíaco para os machos após ensaios sobre especificidade realizados em laboratório (Antony *et al.*, 1985).

Do mesmo modo que a ação dos insetos pragas de cultivos constituem prejuízos na economia, aqueles insetos vetores de agentes patógenos são de incalculável importância devido a seu efeito na saúde mundial. Avanços no uso de armadilhas utilizando diferentes misturas de feromônios, cairomônios e inseticidas têm mostrado efetividade no controle de algumas espécies, conseguindo em alguns casos a erradicação de algumas populações, como, no caso da mosca tsé-tsé (Eiras, 2001). *Glossina spp* (Diptera: Muscidae), ou mosca tsé-tsé, é o vetor do parasito *Trypanosoma brucei* que causa a tripanossomíase Africana (doença do sono) no homem (Barrett *et al.*, 2003). O feromônio sexual produzido pela espécie *Glossina morsitan morsitans* foi isolado da cutícula das fêmeas e os componentes foram identificados como alquenos com mais de 30 carbonos (Carlson *et al.*, 1978). Essa identificação química, assim como a de outros semioquímicos tem contribuído significativamente nas diferentes estratégias de controle desses insetos vetores (Jordan, 1995).

1.3 Flebotomíneos

1.3.1 Posição Sistemática

Os flebotomíneos são insetos dípteros hematófagos pertencentes à família Psychodidae subfamília Phlebotomine. A classificação destes insetos é baseada na morfologia dos adultos, machos e fêmeas (Forattini, 1973; Young & Duncan, 1994). De acordo com Young e Duncan (1994) a subfamília agrupa seis gêneros, sendo *Phlebotomus* Rondani, 1840; *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987 de ocorrência no Velho Mundo e, *Lutzomyia* França 1924; *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 e *Warileya* Hertig, 1948 no Novo Mundo.

Medindo aproximadamente 2 a 3 mm, os flebotomíneos se distinguem dos demais psicodídeos por apresentarem corpo delgado e recoberto com um grande número de cerdas,

asas de formas lanceoladas sempre eretas quando em repouso, e voos curtos e saltitantes (revisto em Killick-Kendrick, 1999).

O gênero *Lutzomyia*, se destaca dos outros gêneros presentes no Novo Mundo por apresentar a maior distribuição geográfica, com espécies habitando desde o México até o norte da Argentina (Young & Duncan, 1994). Das 500 espécies de flebotomíneos descritas nas Américas a maioria delas, um pouco mais de 400, são *Lutzomyia*. Este gênero possui 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e ainda, algumas espécies isoladas (Barreto, 1962; Theodor, 1965; Lewis *et al.*, 1977; Martins *et al.*, 1978; Young & Duncan, 1994).

Uma classificação mais recente foi proposta por Galati (1995), na qual a divisão dos insetos em duas tribos, previamente apresentada por Artemiev (1991) foi mantida. Através de análises filogenéticas criaram-se oito subtribus, diversos novos gêneros, e alguns subgêneros, já existentes foram elevados a gêneros (Galati, 2003).

1.3.2 A importância médico veterinária

Algumas espécies de flebotomíneos são importantes vetores naturais de patógenos como parasitos do gênero *Leishmania*, a bactéria *Bartonella bacilliformis* e alguns arbovírus (revisto em Ready, 2013).

Entre as doenças produzidas por tais patógenos a mais importante é a leishmaniose, composta por um grupo de doenças tropicais severas, clinicamente heterogêneas e distribuídas em todos os continentes, sendo endêmica em 98 países (Antinori *et al.*, 2012; WHO 2013). Há aproximadamente 350 milhões de pessoas em situações de risco com dois milhões de novos casos relatados a cada ano (Desjeux, 1996; Cunningham, 2002). Apesar da importância médica, a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada quando comparada com outras doenças tropicais (Colwell *et al.*, 2011; Hotez *et al.*, 2006). Os agentes etiológicos das leishmanioses são os parasitos do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) (Protozoa: Kinetoplastida) que por sua vez são transmitidos por flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Killick-Kendrick, 1999).

Leishmania infantum é o agente etiológico da Leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave das leishmanioses. No Novo Mundo, o parasito é transmitido principalmente por *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva). Outro flebotomíneo incriminado como vetor deste parasito é *Lutzomyia cruzi* Mangabeira 1938 (Galati *et al.*, 1997, de Pita-Pereira *et al.*, 2008) que tem uma ocorrência concentrada na região centro-oeste do Brasil e sul da Bolívia (Brazil

et al., 2010). Resultados de estudos sobre diferentes caracteres destas duas espécies de flebotomíneos indicam que *L. longipalpis* e *L. cruzi* são bastante relacionadas (Brazil & Hamilton, 2002; Spiegel *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2010 e Vigoder *et al.*, 2010). No que diz respeito à morfologia, as fêmeas destes flebotomíneos são indistinguíveis enquanto que apenas sutis divergências na genitália são observadas nos machos (Young & Duncan 1994).

A LV é uma doença sistêmica que apresenta um significativo aumento em várias regiões endêmicas (Romero & Boelaert, 2010; Chappuis *et al.*, 2007). A Organização Mundial da Saúde estima a ocorrência de cerca de meio milhão de novos casos de LV no mundo por ano; e se a doença não é tratada, pode-se ter uma taxa de mortalidade tão elevada quanto 100% em dois anos (OMS, 2013) (Figure 2).



Figura 2. Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral (Fonte: Desjeux, 2004).

1.3.3 Biologia dos flebotomíneos.

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, apresentando as fases de ovo, quatro estádios larvais (L1-L4), pupa e adulto (Figura 3). Os adultos apresentam dimorfismo sexual, ou seja, diferenças nas estruturas corporais.

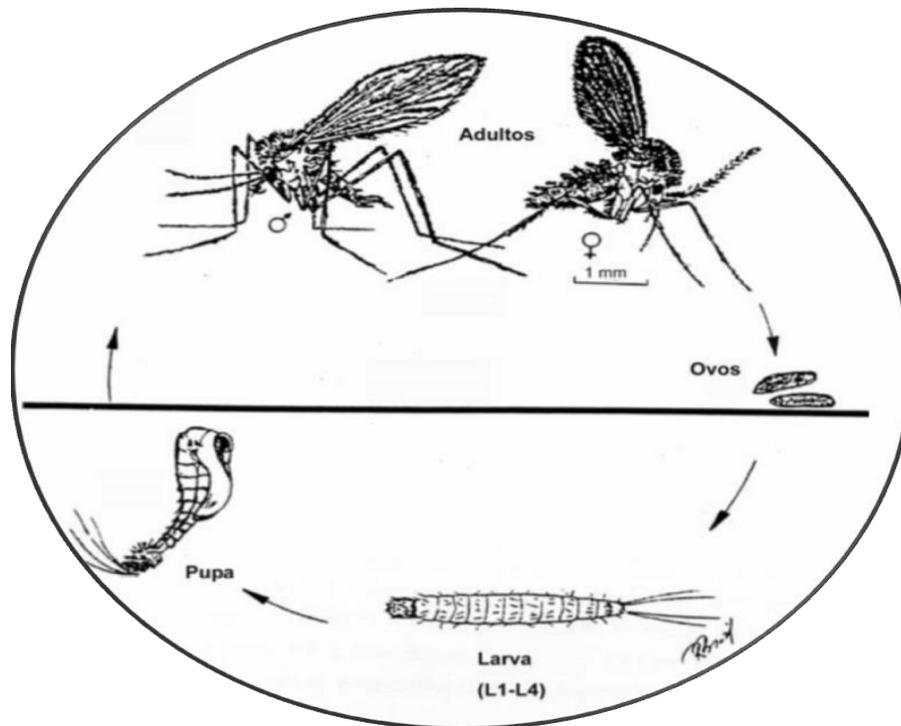


Figura 3. Ciclo biológico dos flebotomíneos (Fonte Brazil & Brazil, 2003)

Tanto fêmeas como machos, se alimentam de derivados de açúcares de origem vegetal (Schlein & Warburg, 1986), mas, somente as fêmeas realizam o repasto sanguíneo, que fornece a nutrição necessária para a produção e amadurecimento dos ovos (Killick-Kendrick, 1990; Warburg & Faiman, 2011). Durante o repasto sanguíneo nos animais vertebrados é o momento em que pode ocorrer a transmissão das leishmanias, já que estes, na forma de amastigotas, podem estar infectando macrófagos. Estas células quando ingeridas pelo inseto são conduzidas ao intestino médio, onde passam por processos de diferenciação e intensa multiplicação, transformando-se em promastigotas em um curto período de 12 a 20 horas após o repasto. (Kamhawi, 2006; Sacks, 2001). Posteriormente estes patógenos, já na forma de flagelados, migram para a região anterior do trato digestivo do vetor diferenciando-se finalmente nas formas infectantes (promastigota metacíclica) que, após um novo ato de hematofagia do inseto, são inoculados nos vertebrados (Sacks & Kamhawi, 2001).

O crepúsculo é o principal momento do dia em que um grande número destes insetos se reúne perto dos hospedeiros ou sobre estes para a alimentação (Quinnell & Dye, 1994). Apesar de somente as fêmeas serem hematófagas, os machos também são atraídos sendo os primeiros a chegar perto dos hospedeiros demarcando território individual e esperando pelas fêmeas para o acasalamento (Jarvis & Rutledge, 1992). Esta atração pelos vertebrados ocorre em resposta a sinais químicos emitidos pelos hospedeiros, como o CO₂ e outros compostos voláteis provavelmente derivados da respiração ou da pele (Nigam & Ward, 1991; Oshaghi *et al.*, 1994; Pinto *et al.*, 2001). Experimentos realizados no campo indicam que o tamanho dos hospedeiros também poderia ter um papel importante na escolha e localização destes pelos insetos (Quinnell *et al.*, 1992). Posteriormente, Hamilton e Ramsoondar (1994) ainda relataram que diferentes populações de *L. longipalpis* (colônias originárias de Jacobina e Lapinha no Brasil) apresentaram respostas diferenciadas aos odores humanos, sendo a população de Jacobina mais antropofílica que a de Lapinha.

1.3.4 O estudo das populações de *Lutzomyia longipalpis*.

Além das diferenças relacionadas às respostas aos caïromônios, outras variações entre populações também foram observadas. As diferenças vêm sendo observadas desde 1969, quando Mangabeira relatou a ocorrência de variações morfológicas nos machos de duas populações. Insetos coletados no Estado do Pará (Norte) apresentavam um par de pintas claras, localizadas no quarto segmento abdominal (fenótipo chamado de 1S) enquanto que machos coletados no Estado do Ceará (Nordeste) apresentavam dois pares de pintas (fenótipo chamado de 2S) no quarto e no terceiro segmento abdominal. Essas diferenças (Figura 4) junto ao fato das duas formas serem encontradas em condições ecológicas distintas levou o autor a propor de que *L. longipalpis* é um complexo de espécies.

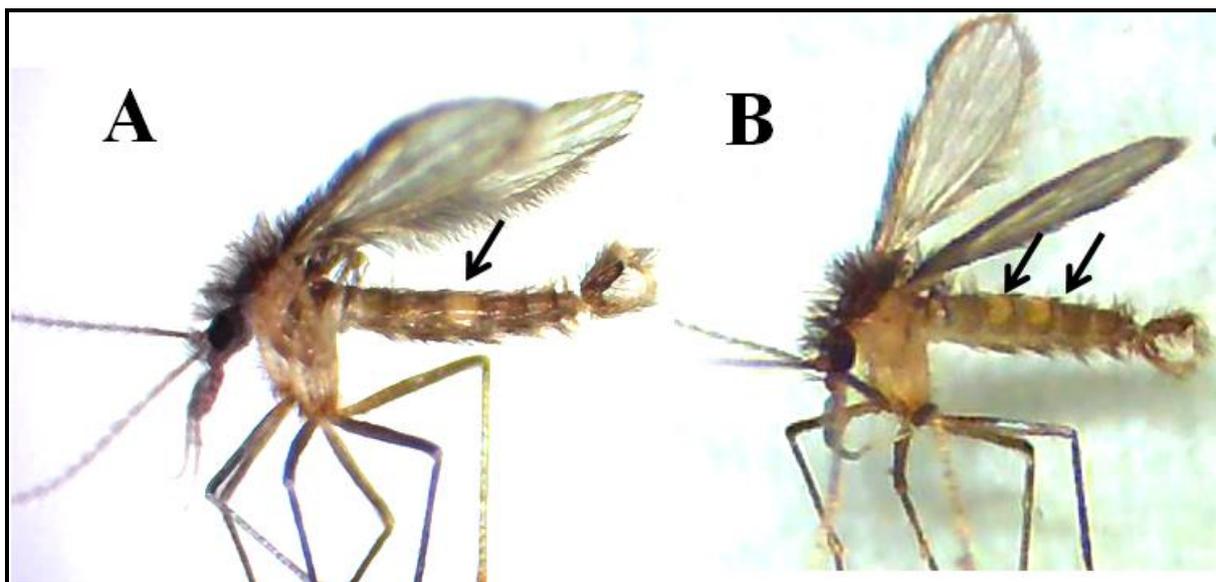


Figura 4. Machos de *Lutzomyia longipalpis* com um par de pintas (A) e dois pares de pintas (B) nos tergitos abdominais.

Além da ocorrência dos dois fenótipos (1S e 2S), em 1983 Ward e colaboradores descreveram a existência de populações naturais de machos com o morfotipo intermediário de uma pinta e meia, sendo a mancha presente no terceiro segmento abdominal de menor tamanho que a do quarto. Os autores ainda realizaram experimentos de cruzamento entre as populações simpátricas e alopátricas com diferentes números de pintas. Eles observaram uma baixa taxa de inseminação após o cruzamento entre os insetos previamente capturados na mesma localidade (populações simpátricas) e que possuíam tanto o morfotipo 1S como o 2S. O mesmo resultado foi observado entre insetos com diferente número de pintas (2S e 1S) e provenientes de diferentes Estados (Ceará e Minas Gerais) assim como também entre insetos oriundos de diferentes Estados e apresentando o mesmo morfotipo 1S (Ward *et al.*, 1983; Ward *et al.*, 1988). Mais recentemente, Souza e colaboradores (2008) realizaram novos experimentos de cruzamento entre populações alopátricas, insetos oriundos de Lapinha (MG), Sobral (BA) e Natal (RN), como também entre populações simpátricas de Sobral (1S e 2S). Os pesquisadores observaram que como resultado de alguns cruzamentos entre insetos homoespecíficos a prole apresentava o fenótipo intermediário e os híbridos ainda eram férteis e viáveis (Souza *et al.*, 2008). Contudo, os resultados desses experimentos mostraram que as pintas não podiam ser utilizadas como caráter de diferenciação taxonômica. Porém, foi visto que o fenótipo de pintas poderia ser útil para distinguir duas espécies simpátricas no complexo *L. longipalpis*. Isto foi verificado em Sobral (CE), onde coexistem populações com

machos apresentando ambos os tipos (1S e 2S). No entanto, uma população está isolada reprodutivamente da outra (Ward *et al.*, 1983; Ward *et al.*, 1988; Souza *et al.*, 2008). Além desses trabalhos realizados no Brasil, outros estudos comparando amostras da América Central com a América do Sul também sugeriram que *L. longipalpis* seja com complexo de espécies (Lanzaro *et al.*, 1993; Arrivillaga *et al.*, 2003).

Entretanto, o debate sobre existência ou não de mais de uma espécie entre as populações brasileiras de *L. longipalpis* surgiu dos resultados de estudos medindo diversos parâmetros. Segundo alguns autores, os estudos utilizando análises de isoenzimas e de genes mitocondriais não revelaram um grau de divergências suficiente que suporte a separação taxonômica entre as populações (Mukhopadhyay *et al.*, 1998; Mutebi *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2000). No entanto, outros trabalhos utilizando diferentes tipos de análises, incluindo tanto marcadores moleculares (genes envolvidos com o comportamento sexual e microssatélites) como sinais acústicos e feromonios; mostraram diferenças que poderiam apontar uma separação entre as populações (revisto em Bauzer *et al.*, 2007; Maingon *et al.*, 2003; Maingon *et al.*, 2008; Watts *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2004; Lins *et al.*, 2008; Araki *et al.*, 2009; Vigoder *et al.*, 2010).

Considerando as evidências que suportam a hipótese de que *L. longipalpis* é complexo de espécies junto aos resultados dos experimentos de cruzamento, ainda surge o questionamento de quais mecanismos poderiam derivar nos isolamentos reprodutivos entre as populações e a demarcação entre as espécies crípticas dentro do complexo. Neste sentido, junto aos estudos de sinais acústicos o estudo de feromônios sexuais poderia contribuir na procura de mecanismos pré-copulatórios destes insetos.

1.3.5 Feromônios no complexo *Lutzomyia longipalpis*

1.3.5.1 Sítio de produção do feromônio

Indícios da presença de feromônios na família Psychodidae iniciaram-se com a descrição de uma glândula de cheiro no mesotórax de *Ulomyia fuliginosa* (Feuerborn, 1922). No que diz respeito aos insetos hematófagos da subfamília Phlebotominae, a primeira indicação sobre a presença de uma possível glândula “odorífera” foi realizada por Bart (1961) através da publicação de desenhos das células secretoras observadas nos segmentos abdominais de machos de *Lutzomyia s.l.* (Lutz and Neiva, 1912). A aparência de “manchas claras” de tais tergitos foi mais tarde relatada por Mangabeira (1969) como variavelmente

presentes no quarto; ou no terceiro e quarto segmentos abdominais de machos de diferentes populações de *L. longipalpis*. A estrutura superficial destes tergitos foi posteriormente examinada por Lane e Bernardes (1990) usando microscópio eletrônico de varredura. Foram descritas áreas sem as estruturas regularmente distribuídas no resto do corpo de insetos adultos, conhecidas como “macrotriquias”. Na mesma região também foi observada a presença de pequenas pápulas com poros centrais, que poderiam representar as estruturas de disseminação de feromônios. Maiores detalhes das principais estruturas presentes na glândula foram ilustrados recentemente em trabalhos de ultraestrutura e técnicas de citoquímica que contribuíram com a descrição do epitélio glandular. Foram identificadas típicas células secretoras conectadas à cutícula através de dutos e a presença de lipídeos no citoplasma (Spiegel *et al.*, 2002). Recentemente estudos correlacionaram a produção de feromônio com a morfogênese das células glandulares, onde reportou-se que a biossíntese de feromônio começa, aproximadamente, 12 horas após a emergência do adulto e aumenta continuamente durante os três primeiros dias estabilizando-se em seguida (Spiegel *et al.*, 2011)..

1.3.5.2 Tipos de feromônios

Dados morfológicos das estruturas de manchas terçais claras foram consistentes com a localização do sítio de produção de feromônio sexual em *L. longipalpis* (Lane & Ward, 1984; Lane *et al.*, 1985; Morton & Ward, 1989). Compostos extraídos de tais estruturas foram ensaiados através de análises químicas e de comportamento, a fim de analisar qual componente químico poderia ser o feromônio sexual. O composto encontrado em maior abundância no tecido analisado mostrou ser o responsável pela atração das fêmeas (Hamilton *et al.*, 1994). Uma vez analisados os feromônios de diferentes populações de *L. longipalpis* estes foram identificados como pertencentes à classe química dos terpenos (Hamilton, 2008). Os feromônios podem ser homosesquiterpenos, que são compostos de 16 carbonos ou diterpenos que são compostos de 20 carbonos. Porém, segundo Hamilton (2002) machos do gênero *Lutzomyia* podem ser divididos em três grupos, aqueles que produzem terpenos e possuem as estruturas de manchas terçais; aqueles que não produzem terpenos mas possuem as manchas e ainda que os não produzem terpenos e nem apresentam tais estruturas.

Os homosesquiterpenos, (S)-9-metilgermacreno-B (Figura 5A) e (1*RS*,3*RS*,7*RS*)-3-methyl- α -himachalene (Figura 5B), são os componentes principais dos feromônios das populações de Lapinha, (MG) e de Jacobina, (BA) respectivamente. Em quanto que os diterpenos, que são isômeros de cembreno (cuja estrutura química ainda não foi elucidada),

são os compostos ativos das populações de Santarém, (PA); e Jaíba, (MG); respectivamente (Hamilton *et al.*, 1996a; Hamilton *et al.*, 1996b; Hamilton *et al.*, 1999a; Hamilton *et al.*, 1999b; revisto em Hamilton, 2008).

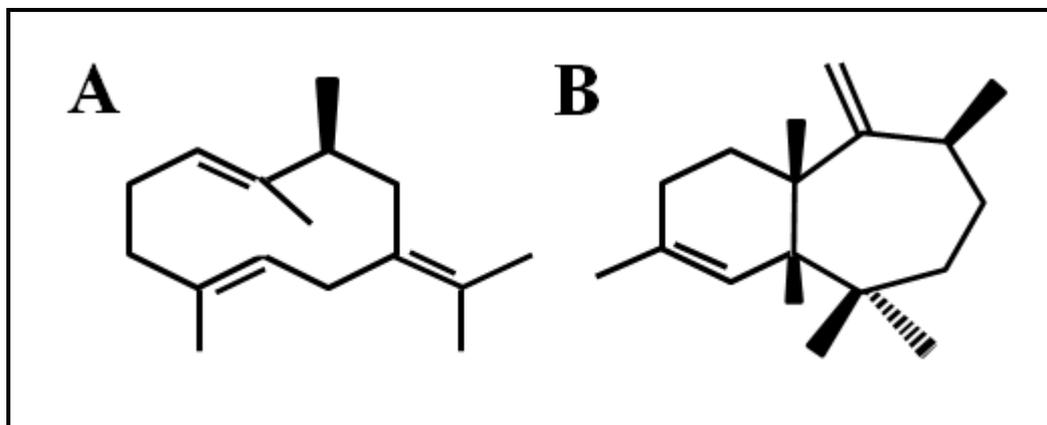


Figura 5. Homosesquiterpenos produzidos por populações de *Lutzomyia longipalpis* (A) 9-metilgermacreno-B e (B) (1R,3R,7R)-3-metil- α -himachalene.

Em alguns trabalhos sobre o comportamento sexual de *L. longipalpis*, têm sido observados machos com ativa agitação das asas antes e durante a cópula. Através de estudos em laboratório, foi constatado que este movimento de asas pode estar relacionado à demarcação do território individual de machos, uma vez pousados nos hospedeiros (Jarvis & Rutledge, 1992). Além disso, quando a presença das fêmeas é detectada, os machos se aproximam a estas com intensa vibração das asas que permanece ininterrupta durante a cópula (Jarvis & Rutledge, 1992). Posteriormente foi observado que esse comportamento tem implicações na geração dos sinais acústicos produzidos durante o acasalamento, os quais foram estudados em diversas populações do inseto (Souza *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2004). Por outro lado, a possibilidade de que esta vibração possa ter algum efeito na comunicação química de *L. longipalpis* também foi sugerida, já que a oscilação de asas poderia estar contribuindo na dispersão do feromônio sexual para ambos, machos e fêmeas (Jones & Hamilton, 1998; Lane *et al.*, 1985; Ward *et al.*, 1989).

Na natureza, admite-se que a cópula ocorre no período noturno quando os flebotomíneos estão mais ativos. Os machos chegam aos hospedeiros vertebrados, antes das fêmeas, provocando a agregação de outros machos através da produção de feromônios, que por sua vez produzem mais feromônios atraindo ainda mais machos (Kelly & Dye, 1997).

Consequentemente, as fêmeas virgens são atraídas pelos feromônios dos machos que estão em sinergia com odor do hospedeiro (Bray & Hamilton, 2007).

Nos insetos em geral a detecção dos estímulos químicos ocorre através dos sistemas sensoriais olfato e a gustação. A detecção dos feromônios pode ocorrer pelos dois sistemas, a pesar de que a maioria dos mecanismos conhecidos estão associados com o olfato (Amrein, 2004; Vogt, 2005). Neste último sistema as proteínas que estão envolvidas na detecção de odores são aquelas associadas a receptores de odor [ORs (*odorant receptors*)], as proteínas de união a odor [OBPs (*odorant binding protein*)] e as enzimas degradadoras de odor [ODEs (*odorant degrading enzymes*)].

No que diz respeito ao uso de feromônios sexuais no complexo *L. longipalpis* até agora não são conhecidas as bases genéticas da biossíntese destes compostos ou a sua regulação. Neste sentido, tanto a compreensão dos mecanismos das reações de biossíntese, como a identificação das enzimas que catalisam tais reações ou dos genes que codificam as enzimas, é de crucial importância para o desenho de inovadoras técnicas moleculares no controle deste importante vetor.

1.4 Desvendando rotas de biossíntese em insetos

Biossíntese ou biogênese é a construção de compostos químicos através dos processos fisiológicos que ocorrem em organismos vivos (Alberts *et al.*, 2002). Nos processos biosintéticos, os substratos são convertidos em produtos mais complexos através de vários passos enzimáticos em que o produto de um passo é utilizado como substrato no passo seguinte (Buchanan *et al.*, 2000).

A matéria prima ou substrato inicial pode ser qualquer composto derivado tanto do metabolismo primário, como do secundário (Mann, 1994). O metabolismo primário envolve as reações e compostos essenciais para a vida da célula como, por exemplo, a produção de aminoácidos, ácidos graxos, açúcares etc., enquanto que o metabolismo secundário abrange processos e compostos necessários para manter a vida do organismo como todo (Demain, 1980; Verpoorte, 2000). São considerados metabólitos secundários, os pigmentos, hormônios ou feromônios uma vez que são usados no sistema de sinalização entre organismos no ecossistema. No entanto, a divisão entre o “que é” metabolismo primário ou secundário fica um tanto arbitrário e é rejeitada por alguns autores (Firn & Jones, 2009).

Algumas características bioquímicas dos insetos são compartilhadas com todos os organismos vivos, ou com todos os animais, mas por outro lado, também existem

características específicas dos insetos, ou específicas de determinadas espécies, ou mesmo de uma única linhagem dentro de uma espécie (Morgan, 2010). A conservação destas características, como por exemplo, algumas reações enzimáticas entre os insetos, são muitas vezes aproveitadas em desenhos experimentais como parte das estratégias no desvendamento de vias biossintéticas (Morgan, 2010).

1.4.1 Rotas de biossíntese de feromônios.

Nos estudos de reações de biossíntese, comumente existe uma hipótese que sugere como o composto alvo pode ser formado ou qual material é utilizado como substrato e o tipo de reação enzimática (Morgan, 2010).

Um modo de testar uma hipótese é através da marcação isotópica. Nesta estratégia o substrato é marcado com algum isótopo e fornecido ao organismo ou célula na qual ocorre a biossíntese. Após o tempo de incubação a produção do feromônio pode ser guiada pela marcação dos compostos intermediários nas reações de biossíntese. Desta forma, o composto de interesse é finalmente isolado com o isótopo incorporado. Um exemplo da aplicação deste procedimento experimental é o estudo de feromônios realizado por Seybold e colaboradores (1995) sobre a produção dos álcoois monoterpênoides: ipsenol e ipsdienol. Estes compostos são os feromônios de agregação dos coleópteros *Ips paraconfusus* e *Ips pini*. Os investigadores puderam corroborar a biossíntese “de novo” de tais feromônios através da incorporação do [¹⁴C] acetato nas moléculas ipsenol e ipsdienol obtidas das células biossintéticas em insetos machos.

Outra possível estratégia é empregar linhagens mutantes de organismos que não possuam determinadas enzimas para completar uma síntese definida ou, por outro lado, empregar inibidores enzimáticos. Um exemplo da aplicação desta última tática é o trabalho de Burse e colaboradores (2008), relacionado à elucidação da síntese de secreções de defesa de larvas de besouros da família Chrysomelidae. Nesse estudo foi observado o efeito da inibição da enzima 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR), na produção do composto isoprenoide designado iridoide. Esta enzima é chave na regulação da via do ácido mevalônico, e sua ação foi previamente associada à biossíntese “de novo” do iridoide (Lorenz *et al.*, 1993).

1.4.1.1 Biologia molecular aplicada a estudos de biossínteses de feromônios.

Com os avanços nas técnicas de biologia molecular tornou-se possível estudar genes que codificam as proteínas encarregadas da produção de feromônios. Uma vez identificado o mRNA para a síntese de uma enzima em particular, é possível obter por transcrição reversa a sequência codificadora e expressá-lo em sistemas como bactérias, leveduras ou cultura de células (Brown, 2006). Esta metodologia foi utilizada para estudar as enzimas $\Delta 11$ -desaturases, que são chaves na biossíntese de um número de feromônios derivados de ácidos graxos e expressos nas glândulas de lepidópteros (Knipple *et al.*, 1998).

Por outro lado, esta metodologia pode ser aplicada ao estudo simultâneo de vários genes através da construção e sequenciamento de bibliotecas de cDNA. Esta alternativa permite o estudo comparativo dos genes que estão sendo expressos em um momento determinado ou em um tecido específico. Esta metodologia foi utilizada com sucesso nos estudos dos genes envolvidos na biossíntese de feromônios de alguns insetos lepidópteros (Strandh *et al.*, 2008; Vogel *et al.*, 2010) e mais recentemente também em térmitas (Hojo *et al.*, 2012). Além disso análises de transcriptoma realizados simultaneamente com estudos de proteômica também tem sido realizados em diversos tecidos de outros insetos, como por exemplo, em glândula salivar de *Aedes aegypti* (Valenzuela *et al.*, 2002), e de algumas espécies de flebotomíneos (Rohoušová *et al.*, 2012).

Nesse sentido, realizamos análises transcriptômica e proteômica para obter maior conhecimento das proteínas expressas na glândula de feromônio de *L. longipalpis*, pois foi levantada a hipótese que os precursores para a síntese do feromônio terpenoides seja o metabolismo dos lipídeos associado à via do ácido mevalônico (Hamilton *et al.*, 1999c; Spiegel *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desta tese foi caracterizar os genes expressos e proteínas presentes na glândula do feromônio sexual em machos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae).

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1** Realizar uma análise de sequencias de ESTs da glândula de feromônio sexual de machos da população de Lapinha de *Lutzomyia longipalpis*.
- 2.2.2** Comparar o perfil de transcritos de genes da glândula com outros segmentos abdominais onde a glândula não está presente;
- 2.2.3** Descrever o perfil proteômico da glândula de feromônio sexual de machos da população de Lapinha de *Lutzomyia longipalpis*
- 2.2.4** Comparar e correlacionar os resultados obtidos nas análises transcriptômica e proteômica.

3 RESULTADOS

Esta tese é composta por dois artigos, (Capítulo 4), (Capítulo 5) e um trabalho em colaboração (anexo).

Capítulo 4 – Artigo 1

Gonzalez-Caballero, N., Valenzuela, J., Ribeiro, J. M., Cuervo, P., Brazil, R. P.

Transcriptome exploration of the sex pheromone gland of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Artigo publicado na revista Parasites & Vectors 2013, 6:56 (7 March 2013). Doi 10.1186/1756-3305-6-56

Capítulo 5 – Artigo 2

Gonzalez-Caballero N., Rodriguez A, Lopes G., Carvalho P., Valenzuela, G., Ribeiro, J. M. Brazil, R. P., Cuervo, P.

Expression of the mevalonate pathway enzymes in the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sex pheromone gland demonstrated by an integrated proteomic approach.

4 CAPITULO 4:

“Exploração do transcriptoma da glândula de feromônio sexual de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)”

Gonzalez-Caballero, N. Valenzuela., G. Ribeiro, J. M., Cuervo, P., Brazil, R. P. **Transcriptome exploration of the sex pheromone gland of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).** Artigo publicado Doi 10.1186/1756-3305-6-56.

Este artigo foi publicado na revista Parasites & Vectors 2013, 6:56 (7 March 2013). Doi 10.1186/1756-3305-6-56 e é referente aos objetivos específicos 2.2.1 e 2.2.2

No presente artigo foi feita a análise de transcritos da glândula de feromônio sexual de machos da população de Lapinha de *L. longipalpis*. No trabalho também foi realizada uma comparação dos transcritos obtidos dos tecidos adjacentes. Somente nas sequências obtidas da glândula de feromônio foram identificados transcritos de enzimas da via do ácido mevalônico, resultado que nos permitiu propô-los como candidatos de participar na via biosintética do feromônio de *L. longipalpis*. Além desses resultados, possíveis transcritos de proteínas encarregadas no transporte de moléculas de odor/feromônios foram identificados nos três tergitos abdominais analisados.

5 CAPITULO 5:

“Expressão das enzimas da via do ácido mevalônico na glândula de feromônio sexual de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) demonstrada através de uma abordagem proteômica integrada”

Gonzalez-Caballero N., Rodriguez A, Lopes G., Carvalho P., Valenzuela, G., Ribeiro, J. M. Brazil, R. P., Cuervo, P.

Expression of the mevalonate pathway enzymes in the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sex pheromone gland demonstrated by an integrated proteomic approach.

Os resultados deste manuscrito correspondem aos objetivos específicos 2.2.3 e 2.2.4

O presente trabalho expande a nossa análise para a identificação das proteínas expressas na glândula de feromônio de machos de *L. longipalpis*. Através da eletroforese SDS (SDS-PAGE), cromatografia líquida em linha com espectrometria de massa (LC-MS/MS) e análises dos dados foi possível realizar a caracterização proteômica da glândula de feromônio. Tendo em consideração que as sequências do genoma de *Lutzomyia longipalpis* ainda não estavam disponíveis no momento desta análise, nós projetamos um fluxo de trabalho alternativo para pesquisar os espectros de massas contra dois bancos de dados personalizados, utilizando três motores de busca: MASCOT, OMSSA e ProLuCid. Um total de 542 proteínas foi caracterizado, 445 delas, usando um banco de dados de proteínas Uniref100-inseto, e 97 usando um banco de dados de sequencias de transcritos traduzidas. Os resultados incluem a identificação de seis das sete enzimas da via do mevalonato, mais enzimas envolvidas na biossíntese de sesquiterpeno. Propõe-se que estas proteínas em conjunto podem estar envolvidas na produção de feromônios neste inseto vetor.

6 DISCUSSÃO

Aspectos da comunicação química, especialmente o uso de feromônios nos insetos permitem o entendimento de muitas questões biológicas e oferecem a oportunidade do desenvolvimento de estratégias de controle através da manipulação do comportamento reprodutivo. Dos estudos nesta área, nos insetos em geral, tem-se visto que a evolução múltipla e independente dos feromônios é ilustrada não só pela diversidade de compostos produzidos, mas também pela enorme variedade das glândulas secretoras (Wyatt, 2003). No que diz respeito ao estudo da ecologia química de um inseto de importância médico-veterinária como *L. longipalpis* uma das principais questões a serem respondidas é a de quais vias metabólicas são utilizados para que o processo biossintético ocorra. Neste sentido realizamos a caracterização da glândula de feromônio de machos de *L. longipalpis* através de análises de transcritos e de proteínas; e por este motivo a discussão que segue foi dividida em dois tópicos principais.

6.1 Análise de sequencias de ESTs da glândula do feromônio sexual de *L. longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

Com o intuito de obter uma estimativa da complexidade do tecido em termos de expressão gênica foram isolados e analisados os transcritos obtidos do 4^o segmento abdominal (contendo a glândula) que por sua vez foram comparados com aqueles obtidos dos segmentos abdominais adjacentes (3^o e 5^o). Esta abordagem nos permitiu inferir as principais características bioquímicas destes tecidos representados nos produtos gênicos identificados. É interessante observar que foi necessário sequenciar apenas 1200 cDNAs de cada tecido (3547 cDNAs sequenciados no total) para obter um perfil diferenciado entre eles, o que sugere que as sequências obtidas foram diversificadas o suficiente para ter uma boa representação dos transcritos presentes nos três segmentos abdominais. A maior parte das sequências (751) obtidas dos três tecidos apresentaram similaridade (E-val < 10E-5) com as sequências de referência depositadas nos bancos de dados consultados, enquanto que 636 contigs apresentaram baixas ou nenhuma similaridade com as sequências de referência. Este último grupo de transcritos pode estar representando por proteínas ainda desconhecidas específicas de *L. longipalpis* ou por outro lado sequências derivadas de regiões menos conservadas de genes como observado em trabalhos do sialotranscriptoma de *Anopheles gambiae* (Arcà *et al.*, 2005). Ou simplesmente sequencias ainda não descritas em nenhum inseto.

Após as análises de similaridades, os transcritos foram classificados em grupos funcionais com as moléculas de referência dos bancos de dados de proteínas não redundante do NCBI, do Gene Ontology e dos bancos de dados de domínios conservados (CDD).

No 4º segmento abdominal os transcritos mais abundantes, em relação aos obtidos nos segmentos vizinhos, foram aqueles agrupados nas categorias funcionais de síntese de proteínas e metabolismo energético. Resultado interessante, considerando que uma maior produção de proteínas na glândula de feromônio poderia estar relacionada com a expressão da maquinaria biossintética do feromônio o que implicaria um consequente maior consumo de energia neste segmento. Um padrão semelhante observou-se para os transcritos associados ao metabolismo lipídico, apesar de que a diferença foi estatisticamente significativa apenas entre os segmentos numero 4 e 5. A importância dos lipídios nos insetos é conhecida por constituírem substratos essenciais para o desenvolvimento de diferentes aspectos na vida dos insetos (Canavoso *et al.*, 2001). Parte da versatilidade destas moléculas tem sido reconhecida por estarem vinculadas a reprodução, embriogênese, metamorfose e o vôo (revisto por Beenackers *et al.*, 1985; e por Arrese & Soulages, 2010). O metabolismo lipídico diferencialmente ativo no quarto segmento abdominal de *L. longipalpis*, é condizente com a observação das numerosas inclusões lipídicas e a abundância de mitocôndrias nas células glandulares observadas através de estudos de ultraestrutura do mesmo tecido (Spiegel *et al.*, 2002, Spiegel *et al.*, 2011).

Transcritos associados a processos de oxidação/detoxificação também foram identificados em maior numero no quarto segmento abdominal em relação os restantes segmentos. Nesta classificação funcional encontram-se agrupados as sequências associadas às enzimas da via do ácido mevalônico obtidas apenas do 4º segmento abdominal (contendo a glândula feromônio). Ditas moléculas foram agrupadas em 10 contigs representando 4 das 7 enzimas da via.

Da mesma forma, entre as sequências agrupadas segundo a similaridade das proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário foram identificadas aquelas similares aos transcritos da enzima farnesil difosfato sintase (FPPS) e da farnesol desidrogenase dependente do cofactor NADP+. Todos estes transcritos associados à produção de compostos isoprenóides foram encontrados unicamente no 4º segmento abdominal o que não é surpreendente, pois o sitio onde ocorre a produção de compostos terpenóides ativa os genes da via do ácido mevalônico (Hojo *et al.*, 2012; Keeling *et al.*, 2012; Keeling *et al.*, 2004).

Deste grupo de transcritos destacam-se as sequências potencialmente codificadoras da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Co A redutase (HMG-Rs). Tais moléculas, agrupadas em 2 contigs, apresentaram similaridade com as sequências descritas em outros dípteros como *Aedes aegypti* (Nene *et al.*, 2007). A enzima HMG-R é considerada a reguladora da via do ácido mevalonônico, já que catalisa o passo limitante da velocidade da síntese dos compostos isoprenóides (Bochar *et al.*, 1999). A expressão diferenciada do gene que codifica esta enzima e, a sua associação com a produção de feromônios terpenóides, tem sido relatada em várias espécies de insetos coleópteros como *Anthonomus grandis* (Taban *et al.*, 2006), *Ips paraconfusus* (Ivarsson *et al.*, 1998), *Ips pini* (Hall *et al.*, 2002a) e *Dendroctonus jeffreyi* (Hall *et al.*, 2002b, Nardi *et al.*, 2002). Além disso, em estudos utilizando compactin, composto químico que inibe a ação da HMG-R, Ivarsson e colaboradores (1993) apresentaram evidências da importância desta enzima na produção *de novo* dos alcoóis monoterpénóides: ipsdienol e myrcenol, que são os feromônios produzidos pelos coleópteros machos da espécie *Ips duplicatus*.

No que diz respeito às restantes enzimas da via, destaca-se a isopentenil difosfato delta isomerase (IDI), cujos transcritos foram separados em dois grupos através da nossa análise filogenética, indicando uma possível ocorrência de isoformas da enzima na glândula de feromônio. Esta enzima catalisa a isomerização dos compostos de 5 carbonos (5C) isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) que são os precursores dos compostos isoprenóides (Cane, 1999).

Após a via do ácido mevalônico, IPP e DMAPP são condensados pela ação da enzima geranyl difosfato sintase (GPPS) no composto (10C) geranyl difosfato (GPP) para a produção de compostos monoterpénóides. A condensação adicional dos precursores (5C) no GPP é catalisada pela enzima farnesil difosfato sintase (FPPS) para a formação do farnesil difosfato que é o precursor dos sesquiterpenos (15C). Outra adição de um composto (5C) e catalisada pela enzima geranylgeranyl difosfato sintase (GGPPS) para a formação do geranylgeranyl difosfato (20C), precursor de compostos diterpenos (revisado em Blomquist *et al.*, 2010). Nos nossos dados foram identificados transcritos relacionados à enzima FPPS, mas, nenhum transcrito associado à enzima GPPS, o que poderia indicar que FPPS possa estar envolvida na síntese dos dois compostos, GPP e FPP. Esta dupla atividade da enzima FPPS já tem sido proposta em estudos realizados com outros insetos (Lewis *et al.*, 2008; Taban *et al.*, 2009; Vandermoten *et al.*, 2009b; Ma *et al.*, 2010). Desde a primeira identificação da FPPS no

lepidóptero *Agrotis ipsilon* (Castillo-Gracia & Couillaud, 1999) as pesquisas desta enzima têm sido realizadas em outras espécies (Kikuchi *et al.*, 2001; Kinjoh *et al.*, 2007; Cusson *et al.*, 2006) e estendidas a insetos de ordens como Coleóptera (Taban *et al.*, 2009), Hemiptera (Lewis *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2010; Zhang & Li, 2012) e Díptera (Sen *et al.*, 2007). Embora tais evidências tenham sido mais frequentemente associadas com a biossíntese do hormônio juvenil, representações destas enzimas também foram implicadas na produção de feromônios terpenóides em alguns insetos (Lewis *et al.*, 2008; Taban *et al.*, 2009; Keeling *et al.*, 2012). Além da FPPS, sequências similares aos transcritos da oxidoreductase, farnesol desidrogenase dependente de NADP⁺, também foram achados. Esta enzima foi caracterizada como responsável da oxidação do farnesol a farnesal atividade associada à síntese do hormônio juvenil no corpus allatum do inseto *Aedes aegypti* (Mayoral *et al.*, 2009).

Contudo, as identificações das enzimas pertencentes à via do ácido mevalônico foram facilitadas pela conservação da via do ácido mevalônico entre insetos e vertebrados (Bellés *et al.*, 2005). No entanto, tal característica não é observada nos últimos passos da produção dos compostos isoprenóides que envolvem várias vias que conduzem a diferentes produtos finais. Com exceção do hormônio juvenil (revisado em Jurenka, 2004), há pouca informação disponível sobre a biossíntese de compostos sesquiterpenóides cíclicos ou compostos homosesquiterpenóides em insetos. Neste contexto, o grupo de sequências obtidas a partir do 4º segmento que não foram classificáveis neste trabalho pela baixa similaridade com as sequências de referências, constitui uma fonte de dados interessante para futuras pesquisas das moléculas potencialmente associadas para a produção de (S)-9- methylgermacreno B.

Das sequências que apresentaram peptídeos sinais, que é uma indicação de secreção potencial, foi identificado um conjunto de moléculas com domínios preditos de proteínas ligantes de odores (OBP). Nos insetos, as proteínas desta família são ubíquas e estão especializadas no transporte de pequenos ligantes hidrofóbicos através de meios aquosos (Hekmat-Safe *et al.*, 2000). Outro grupo interessante de transcritos foram aqueles com elevado grau de semelhança às sequências de proteínas OS-D, ou proteínas de apêndices sensoriais (SAPs), referidas deste modo em base a sua associação com os órgãos sensoriais descritos em insetos (Wanner *et al.*, 2004). Tendo em conta que tais proteínas são altamente conservadas entre as espécies, a identificação destes transcritos nos levou a considerar a possibilidade de que proteínas da família OS-D poderiam estar facilitando o transporte de feromônios entre a glândula e o ambiente externo, como foi visto em alguns lepidópteros

(Dani *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2006). Transcritos de proteínas de ligação ao hormônio juvenil da hemolinfa (JHBP) também foram identificados. Por analogia ao papel do hormônio juvenil (JH) na regulação da produção de feromônio nos besouros, baratas e alguns lepidopteros (Tillman *et al.*, 1998; Tillman *et al.*, 1999; Rafaeli & Jurenka, 2003; Jurenka, 2004) uma possível expressão de JHBP nos tecidos aqui estudados pode indicar uma função semelhante em *L. longipalpis*. No entanto, também é possível que, devido à semelhança da estrutura química entre o JH e os feromônio 9-metilgermacreno-B de *Lu longipalpis*, as proteínas JHBP possam estar ligando tanto JH como o feromônio.

No que diz respeito aos transcritos relacionados à maquinaria de detoxificação/oxidação foram identificados aqueles associados à enzima citocromo P450 monoxigenases (CYP), glutathione S-transferases (GSTs) e a epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH). O citocromo P450 é um grupo grande e diverso de enzimas (heme-proteínas) que estão envolvidas na biotransformação e metabolização de uma vasta gama de compostos endógenos e exógenos. Em insetos, estas proteínas são expressas em quase todos os tecidos (Feyereisen, 1999) atuando na metabolização de substâncias exógenas ou participando na biossíntese e degradação do hormônio juvenil, feromônios e ecdisteróides (Berenbaum, 2002; Schuler, 1996; Wen *et al.*, 2003). No nosso trabalho os transcritos de CYP mais abundantes foram os pertencentes à família CYP4. Similarmente a abundância de transcritos de proteínas citocromo P450, famílias CYP4 e CYP3 também foi recentemente descrita no transcriptoma de diferentes tecidos no inseto *Dendroctonus ponderosae*, incluindo o sítio de produção do feromônio terpenoide (Keeling *et al.*, 2012.). Em relação às sequências relacionadas à glutathione S-transferases identificadas no nosso trabalho, estas apresentaram alta similaridade com aquelas previamente encontradas em fêmeas de *L. longipalpis* (Dillon *et al.*, 2006). Além do seu papel no processo de desintoxicação, especialmente em insectos fitófagos (Wadleigh & Yu, 1987), as glutathione S transferases também têm sido associadas à degradação de odores em insetos (Robertson *et al.*, 1999). As proteínas epóxido hidrolases do hormônio juvenil (JHEH) juntamente com as esterases do hormônio juvenil (JHE) são reconhecidas por desempenharem um papel na degradação do hormônio juvenil. É possível que a expressão desta proteína nos tecidos aqui estudados possa estar vinculada tanto à degradação de moléculas de JHs presentes na glândula ou por outro lado na degradação dos feromônios produzidos. Esta última função é sugerida em base à semelhança química observada entre o 9-metilgermacreno-B com o hormônio juvenil mencionado anteriormente.

6.2 Expressão das enzimas da via do ácido mevalônico na glândula de feromônio sexual de *L. longipalpis* (Diptera: Psychodidae) demonstrada através de uma abordagem proteômica integrada”

A elucidação da biossíntese do feromônio, ou dos mecanismos reguladores deste processo, podem permitir estratégias moleculares que resultem na interrupção do acasalamento e, conseqüentemente, o manejo das populações de *L. longipalpis*. Por exemplo, Chertemps e colaboradores (2006) demonstraram recentemente uma alteração no comportamento de corte e do acasalamento em *Drosophila melanogaster* após o uso de RNA interferência para os genes envolvidos na produção de feromônio de contato. Neste sentido a descrição do perfil de proteínas expressos na glândula de feromônio representa o primeiro passo na compreensão do processo de biossíntese que ocorre neste tecido especializado. Motivados pelos resultados obtidos na caracterização transcriptômica da glândula foi realizada uma análise proteômica do mesmo tecido. Numa espécie cujas sequências do genoma encontram-se disponíveis, a identificação dos dados do proteoma é realizada com base nas buscas contra as sequências anotadas. No entanto, levando em consideração que as sequências do genoma de *L. longipalpis* ainda não estavam disponíveis no momento desta análise, além disso, dados relacionados com a expressão de genes de glândulas de feromônio de outros insetos também são escassos, nós projetamos um fluxo de trabalho alternativo para lidar com estes obstáculos. Os espectros MS/MS obtidos foram investigados através do banco de dados que inclui sequências disponíveis para a classe Insecta no banco de dados no redundante UniRef100 da UniProt utilizando três motores de busca (OMSSA, ProLuCID e MASCOT). A base de dados escolhida foi a Insecta UniRef100 pois contém clusters de sequências de referência não redundantes de todas as espécies de insetos depositados no UniProt, totalizando 592.178 entradas (obtida em outubro de 2012). Com esta estratégia procurou-se em espaço de busca grande o suficiente para permitir a identificação por semelhança de proteínas de *L. longipalpis*, mas também estreito o suficiente para diminuir tanto os falsos positivos como o tempo investido nas buscas. Além disso, e a fim de enriquecer nossas identificações, o motor de busca ProLuCID também foi usado para analisar os dados de MS/MS contra nossa própria base de dados obtida dos transcritos traduzidos da glândula de feromônio (1387 sequências traduzidas). Observou-se que as duas abordagens mostraram diferentes porções do proteoma com alguma sobreposição entre elas. A busca no banco de dados Insecta (Uniref 100) produziu um maior número de identificações do que aquela utilizando a base de dados do transcriptoma da glândula. Como os dados do

transcriptoma podem conter abundantes sequências curtas e considerando que o nosso critério de identificação foi de no mínimo dois peptídeos, possivelmente muitas identificações por correspondência em um único peptídeo foram descartadas o que poderia explicar o baixo número de identificações. No entanto, a investigação usando os transcritos traduzidos permitiu a anotação de proteínas de *L. longipalpis* que não estão presentes no banco de dados de proteínas Insecta (Uniref100).

O conhecimento sobre a expressão de proteínas de *L. longipalpis* ainda é muito limitado. Apenas 665 entradas de proteínas (não revisadas) de *Lutzomyia spp* estavam disponíveis no banco de dados Uniref100 quando foi realizado este estudo. Dessas, somente 15 entradas contribuíram para a identificação de proteínas da glândula. O fluxo de trabalho utilizado aqui para caracterização proteômica da glândula de feromônio nos permitiu anotar 515 novas proteínas para esta espécie (515/530). A busca no banco de dados das sequências derivadas dos transcritos da glândula gerado anteriormente pelo nosso grupo contribuiu com uma fração de 16% (85/530) das identificações de proteínas.

Seis das sete enzimas da via do ácido mevalônico foram identificadas através desta análise proteômica assim como as enzimas envolvidas na biossíntese do esqueleto dos compostos sesquiterpenóides e aquelas proteínas que têm sido associadas com o possível metabolismo de moléculas de odor/feromônio previamente identificadas por nosso grupo (Gonzalez-Caballero *et al.*, 2013). Através de pesquisas no banco de dados STRING (Jensen *et al.*, 2009; Szklarczyk *et al.*, 2011), utilizado para análises apenas deste segundo artigo, foi possível também realizar associações funcionais *in silico*, das proteínas identificadas. Tendo confirmada a expressão das enzimas do ácido mevalônico na glândula agora podemos usar uma variedade de ferramentas bioquímicas, genéticas e comportamentais para investigar a sua correlação com a biossíntese de feromônios.

Em estudos com *L. cruzi*, que é considerada mais uma espécie do complexo Longipalpis (Brazil & Hamilton, 2002, Vigoder *et al.*, 2010; Araki *et al.*, 2009), e com *L. longipalpis*, numerosas inclusões lipídicas foram descritas por meio de uma análise por microscopia eletrônica de transmissão da glândula de feromônio. A presença de tais estruturas sugeriram um possível papel dos lipídeos na síntese de feromônio como fonte de precursores de acetil-CoA, (Spiegel *et al.*, 2002; Spiegel *et al.*, 2004; Spiegel *et al.*, 2011). Neste sentido é interessante destacar que na nossa análise foram também identificadas diversas proteínas candidatas a estarem potencialmente envolvidas no metabolismo lipídico

tais como a 3 cetoacil coenzima A tiolase, acil coenzima A oxidase, acil coenzima A desidrogenase, hidroxil acil coenzima A desidrogenase, 2-hidroxil acil-CoA-liase 1, acetil-coenzima A carboxilase, ácido graxo sintase, ácido graxo sintase S-acetil-desidrogenase de cadeia curta, entre outros. Também foi identificada a enzima acetil coenzima A sintetase, que sintetiza acetil-CoA a partir de acetato, trifosfato de adenosina, e coenzima A através do composto acetil-monofosfato de adenosina (AMP) como intermediário (Miller & Bonner, 1954; Starai *et al.*, 2002). Com a proximidade do corpo gorduroso das células glandulares (Spiegel *et al.*, 2011), pode ser que este tecido seja a fonte dos precursores para a síntese de feromônio, na forma de triglicerídeos. Tais precursores estariam armazenados nas inclusões lipídicas, como observado em lepidópteros (Matsumoto *et al.*, 2002; Fónagy *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos adicionais podem ajudar a explorar outras funções dessas inclusões lipídicas nas células produtoras de feromônio de *L. longipalpis*, tais como possíveis depósitos para o armazenamento de proteínas conforme observado em *Drosophila* (Cermelli *et al.*, 2006).

O (S)-9-metilgermacreno-B, assim como 3-metilhimacaleno, que são os feromônios homosesquiterpenóides (16C) de duas populações de *L. longipalpis*, têm uma estrutura química ramificada muito semelhante a aquelas observadas no faranal, o feromônio de alarme da formiga *Monomorium pharaoni* (Ritter *et al.*, 1977), e aos hormônios juvenis (JH) JH I e II, descritos em lepidópteros (Meyer *et al.*, 1968; Meyer *et al.*, 1970). Com base no conhecimento sobre a rota de biossíntese destes compostos homoterpenóides naturais, a produção dos feromônios de *L. longipalpis* possivelmente requer moléculas derivadas do homomevalonato tais como a 2E,6E,8S-8-metilfarnesol proposto por Tashiro e colaboradores (2000). Como demonstrado por Schooley e colaboradores (1973) o homomevalonato pode ser obtido pela condensação do ácido propanoico no lugar do ácido acético na clássica via do ácido mevalônico. Seguidamente os derivados avançam através desta via para produzir homofarnesil difosfato para finalmente gerar compostos homoterpenóides (Francke & Schulz, 1999). Assim, a especificidade de substrato para as preniltransferases que ocorrem nas glândulas de feromônio de diversas populações de *L. longipalpis* e a ciclização dos produtos nas reações finais para a biossíntese de feromônios representam assuntos interessantes para futuros estudos.

Considerações finais

Nosso trabalho demonstrou a expressão das enzimas da via do ácido mevalônico na glândula de feromônio de *L. longipalpis*: tiolases, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintase (HMG-CoAS), 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase (HMG-CoAR), mevalonate kinase, fosfomevalonate quinase e isopentenil delta isomerase na glândula de feromônio. Além destas enzimas também foi possível obter evidências de expressão dos genes envolvidos na produção de compostos sesquiterpenoides como a farnesil difosfato sintase e a farnesol desidrogenase dependente do cofactor NADP⁺. Nossos resultados reforçam a hipótese da possível participação do ciclo do ácido mevalônico e das enzimas preniltransferases na biossíntese dos feromônios em *L. longipalpis*. Pesquisas relacionados aos processos de regulação da expressão destas proteínas se fazem necessários para que estratégias de manipulação genética sejam empregadas. Por outro lado, estudos mais amplos envolvendo outras populações do complexo Longipalpis também se fazem necessárias para tentar correlacionar a produção de feromônios sob o ponto de vista evolutivo com a especiação incipiente dos membros de complexo (Araki *et al.*, 2009).

7 REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, B: Molecular Biology of the Cell, 4th edn. New York: Garland Science 2002.
- Amrein H: Pheromone perception and behavior in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 2004, 14(4):435-442.
- Antinori S, Schifanella L, Corbellino M: Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, 31(2):109-118.
- Antony C, Davis TL, Carlson DA, Pechine JM, Jallon JM: Compared behavioral responses of male *Drosophila melanogaster* (Canton S) to natural and synthetic aphrodisiacs. *J Chem Ecol* 1985, 11(12):1617-1629.
- Antony C, Jallon J-M: The chemical basis for sex recognition in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 1982, 28(10):873-880.
- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GE, Souza NA, Araujo IB, Hamilton JG, Brazil RP, Peixoto AA: Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl Trop Dis* 2009, 3(1):e365.
- Arcà B, Lombardo F, Valenzuela JG, Francischetti IMB, Marinotti O, Coluzzi M, Ribeiro JMC: An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol* 2005, 208(20):3971-3986.
- Arn H, Tóth M, Priesner E: Pherolist. *Heinrick Arn.*; 2000.
- Arrese EL, Soulages JL: Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol* 2010, 55:207-225.
- Arrivillaga J, Mutebi JP, Pinango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD, Lanzaro GC: The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *J Med Entomol* 2003, 40(5):615-627.
- Artemiev MM: A classification of the subfamily Phlebotominae. *Parassitologia* 1991, 33 Suppl:69-77.
- Azevedo ACd, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NAd, Rosa-Freitas MG, Rangel EF: Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2000, 95:305-322.
- Barreto M: Novos subgêneros de *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera, Psychodidae, subfamília Phlebotominae). *Rev Ins Med Trop* 1962, 4:91-110.

- Barrett MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S: The trypanosomiasis. *The Lancet* 2003, 362(9394):1469-1480.
- Barth R: Sobre o aparelho genital interno do macho de *Phlebotomus longipalpis* (Lutz et Neiva, 1912): (Diptera, Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1961, 59:23-36.
- Bauzer LGSR, Souza NA, Maingon RDC, Peixoto AA: *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102(1):1-12.
- Beenakkers AM, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJ: Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. *Prog Lipid Res* 1985, 24(1):19-67.
- Beggs KT, Glendining KA, Marechal NM, Vergoz V, Nakamura I, Slessor KN, Mercer AR: Queen pheromone modulates brain dopamine function in worker honey bees. *Science Signalling* 2007, 104(7):2460.
- Bellés X, Martin D, Piulachs MD: The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol* 2005, 50:181-199.
- Berenbaum MR: Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *J Chem Ecol* 2002, 28(5):873-896.
- Blomquist GJ, Figueroa-Teran R, Aw M, Song M, Gorzalski A, Abbott NL, Chang E, Tittiger C: Pheromone production in bark beetles. *Insect Biochem Mol Biol* 2010, 40(10):699-712.
- Blomquist GJ, Tillman-Wall JA, Guo L, Quilici DR, Gu P, Schal C: Hydrocarbon and hydrocarbon derived sex pheromones in insects: biochemistry and endocrine regulation. In: *Insect Lipids: Chemistry and Biology*. Edited by Stanley-Samuels DW, Nelson DR 1993: 317-351.
- Blomquist GJ, Vogt RG: *Insect pheromone biochemistry and molecular biology: The biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles*: Academic press; 2003.
- Bochar DA, Stauffacher CV, Rodwell VW: Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Genet Metab* 1999, 66(2):122-127.
- Bray DP, Hamilton JGC: Host Odor Synergizes Attraction of Virgin Female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 2007, 44(5):779-787.
- Brazil RP, Brazil BG: *Biologia de Flebotomíneos Tropicais*. In: *Flebotomíneos do Brasil*. Edited by Rangel E, and Lainson R. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003: 257-274.

- Brazil RP, Hamilton JG: Isolation and identification of 9-methylgermacrene-B as the putative sex pheromone of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2002, 97(3):435-436.
- Brazil RP, Passos WL, Brazil BG, Temeljkovitch M, Filho JDA: Diptera, Psychodidae, Phlebotominae Rondani, 1840: Range extension and new records from lowland Bolivia. Check List 2010, 6(4):587-588.
- Brown TA: Gene cloning and DNA analysis: an introduction, 5th edn. Malden, MA Blackwell Pub; 2006.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL: Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville, Md. USA: American Society of Plant Physiologists 2000.
- Burse A, Frick S, Schmidt A, Buechler R, Kunert M, Gershenzon J, Brandt W, Boland W: Implication of HMGR in homeostasis of sequestered and de novo produced precursors of the iridoid biosynthesis in leaf beetle larvae. Insect Biochemistry and Molecular Biology 2008, 38(1):76-88.
- Butenandt A, Beckmann R, Stamm R, und Hecker E: Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*, Reindarstellung und Konstitution. Z Naturforsch 1959, 14:283-284.
- Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE, Wells MA: Fat metabolism in insects. Annu Rev Nutr 2001, 21(1):23-46.
- Cane DE: Isoprenoid Biosynthesis: Overview. In: Comprehensive Natural Products Chemistry. Edited by Editors-in-Chief: Otto M-C, Sir Derek B, Koji Nakanishi A2 - Editors-in-Chief: Otto Meth-Cohn SDB, Koji N. Oxford: Pergamon; 1999: 1-13.
- Carlson DA, Langley PA, Huyton P: Sex pheromone of the tsetse fly: isolation, identification, and synthesis of contact aphrodisiacs. Science 1978, 201(4357):750-753.
- Carlson DA, Mayer MS, Silhacek DL, James JD, Beroza M, Bierl BA: Sex attractant pheromone of the house fly: isolation, identification and synthesis. Science 1971, 174(4004):76-78.
- Castillo-Gracia M, Couillaud F: Molecular cloning and tissue expression of an insect farnesyl diphosphate synthase. Eur J Biochem 1999, 262(2):365-370.
- Cermelli S, Guo Y, Gross SP, Welte MA: The Lipid-Droplet Proteome Reveals that Droplets Are a Protein-Storage Depot. Curr Biol 2006, 16(18):1783-1795.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M: Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 2007, 5(11):873-882.

- Chertemps T, Duportets L, Labeur C, Ueyama M, Wicker-Thomas C: A female-specific desaturase gene responsible for diene hydrocarbon biosynthesis and courtship behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology* 2006, 15(4):465-473.
- Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D: Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol* 2011, 182(1):14-21.
- Conte YL, Hefetz A: Primer pheromones in social hymenoptera. *Annu Rev Entomol* 2008, 53:523-542.
- Cunningham AC: Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002, 72(2):132-141.
- Cusson M, Béliveau C, Sen SE, Vandermoten S, Rutledge RG, Stewart D, Francis F, Haubruge É, Rehse P, Huggins DJ *et al*: Characterization and tissue-specific expression of two lepidopteran farnesyl diphosphate synthase homologs: Implications for the biosynthesis of ethyl-substituted juvenile hormones. *Proteins* 2006, 65(3):742-758.
- Dani FR, Michelucci E, Francese S, Mastrobuoni G, Cappellozza S, La Marca G, Niccolini A, Felicioli A, Moneti G, Pelosi P: Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the silkworm *Bombyx mori*. *Chem Senses* 2011, 36(4):335-344.
- de Mazo L, Vit S: Contribution to the knowledge of Palearctic Batrisinae (Coloptera: Pselaphidae). Antennal male glands of *Batrisus Aubé* and *Batrisodes Reitter*: Morponogy, histology and taxanomial implications. *Entomologica* 1983, 18:77-110.
- de Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C: Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop* 2008, 107(1):66-69.
- Demain A: Microbial production of primary metabolites. *Naturwissenschaften* 1980, 67(12):582-587.
- Desjeux P: Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996, 14(5):417-423.
- Desjeux P: Focus: Leishmaniasis. *Nat Rev Micro* 2004, 2(9):692-693.
- Dillon RJ, Ivens AC, Churcher C, Holroyd N, Quail MA, Rogers ME, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Lehane MJ *et al*: Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship. *Genomics* 2006, 88(6):831-840.

- Eiras AE: Mediadores químicos entre hospedeiros e insetos vetores de doenças médico-veterinárias. In: Feromônios de insetos: Biologia, Química e Aplicação Edited by Vilela EF, Lúcia T. Ribeirão Preto: Holos; 2001: 1-206.
- El-Sayed A: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>. 2012.
- EPA-United States Environmental Protection Agency. [<http://www.epa.gov/>]
- Erbilgin N, Powell JS, Raffa KF: Effect of varying monoterpene concentrations on the response of *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae) to its aggregation pheromone: implications for pest management and ecology of bark beetles. Agricultural and Forest Entomology 2003, 5(4):269-274.
- Faustini DL, Burkholder WE, Laub RJ: Sexually dimorphic setiferous sex patch in the male red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae): Site of aggregation pheromone production. J Chem Ecol 1981, 7(2):465-480.
- Feuerborn HJ: Der sexuelle Reizapparat (Schmuck-, Duft- und Berührungsorgane) der Psychodiden nach biologischen und physiologischen Gesichtspunkten untersucht: zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Physiologie der Sinnesorgane und der Organe des Geschlechts- und Bereitschaftsduftes: Nicolai; 1922.
- Feyereisen R: Insect P450 enzymes. Annu Rev Entomol 1999, 44(1):507-533.
- Firn RD, Jones CG: A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness. Journal of Experimental Botany 2009, 60(3):719-726.
- Fónagy A, Yokoyama N, Matsumoto S: Physiological status and change of cytoplasmic lipid droplets in the pheromone-producing cells of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). Arthropod Struct Dev 2001, 30(2):113-123.
- Forattini OP: Entomologia médica: Psychodidae. Leishmaniose. Bartonelose, vol. 4. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Departamento de Parasitologia; 1973.
- Francke W, Dettner K: Chemical Signalling in Beetles. In: The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II. Edited by Schulz S, vol. 240: Springer Berlin Heidelberg; 2005: 85-166.
- Francke W, Schulz S: Pheromones. Comprehensive natural products chemistry 1999, 8:197-261.
- Galati E: Morfologia e taxonomia 2.1: Classificação de flebotomíneos. In: Flebotomíneos do Brasil. Edited by Rangel E, and Lainson R. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003: 23-52.

- Galati EA, Nunes VL, Rego Junior Fde A, Oshiro ET, Chang MR: Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Saude Publica* 1997, 31(4):378-390.
- Gonzalez-Caballero N, Valenzuela JG, Ribeiro JM, Cuervo P, Brazil RP: Transcriptome exploration of the sex pheromone gland of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasit Vectors* 2013, 6(1):56.
- Grozinger CM, Sharabash NM, Whitfield CW, Robinson GE: Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(Suppl 2):14519-14525.
- Hall GM, Tittiger C, Andrews GL, Mastick GS, Kuenzli M, Luo X, Seybold SJ, Blomquist GJ: Midgut tissue of male pine engraver, *Ips pini*, synthesizes monoterpene pheromone component ipsdienol de novo. *Die Naturwissenschaften* 2002a, 89(2):79-83.
- Hall GM, Tittiger C, Blomquist GJ, Andrews GL, Mastick GS, Barkawi LS, Bengoa C, Seybold SJ: Male jeffrey pine beetle, *Dendroctonus jeffreyi*, synthesizes the pheromone component frontalin in anterior midgut tissue. *Insect Biochem Mol Biol* 2002b, 32(11):1525-1532.
- Hamilton GCJ, M. Hooper A, A. Pickett J, Mori K, Sano S: 3-Methyl- α -himachalene is confirmed, and the relative stereochemistry defined, by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil *Chem Commun* 1999b(4):355-356.
- Hamilton JG: Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. *Parasite (Paris, France)* 2008, 15(3):252-256.
- Hamilton JG, Brazil RP, Campbell-Lendrum D, Davies CR, Kelly DW, Pessoa FA, de Queiroz RG: Distribution of putative male sex pheromones among *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol* 2002, 96(1):83-92.
- Hamilton JGC, Brazil RP, Morgan ED, Alexander B: Chemical analysis of oxygenated homosesquiterpenes: a putative sex pheromone from *Lutzomyia lichi* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of Entomological Research* 1999c, 89(02):139-145.
- Hamilton JGC, Dawson GW, Pickett JA: 9-Methylgermacrene-B; proposed structure for novel homosesquiterpene from the sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. *J Chem Ecol* 1996a, 22(8):1477-1491.
- Hamilton JGC, Dawson GW, Pickett JA: 3-Methyl- α -himachalene: Proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. *J Chem Ecol* 1996b, 22(12):2331-2340.

- Hamilton JGC, Dougherty MJ, Ward RD: Sex pheromone activity in a single component of tergal gland extract of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Northeastern Brazil. *J Chem Ecol* 1994, 20(1):141-151.
- Hamilton JGC, Ibbotson HC, Hooper AM, Pickett JA: 9-Methylgermacrene-B is confirmed as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry defined as S. *Chem Commun* 1999a(23):2335-2336.
- Hekmat-Safe DS, Dorit RL, Carlson JR: Molecular Evolution of Odorant-Binding Protein Genes OS-E and OS-F in *Drosophila*. *Genetics* 2000, 155(1):117-127.
- Hojo M, Maekawa K, Saitoh S, Shigenobu S, Miura T, Hayashi Y, Tokuda G, Maekawa H: Exploration and characterization of genes involved in the synthesis of diterpene defence secretion in nasute termite soldiers. *Insect Mol Biol* 2012.
- Holman L, Jørgensen CG, Nielsen J, d'Ettorre P, Holman L, Jørgensen CG, Nielsen J, d'Ettorre P: Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2010, 277(1701):3793-3800.
- Hotez P, Ottesen E, Fenwick A, Molyneux D: The Neglected Tropical Diseases: The Ancient Afflictions of Stigma and Poverty and the Prospects for their Control and Elimination. In: *Hot Topics in Infection and Immunity in Children III*. Edited by Pollard A, Finn A, vol. 582: Springer US; 2006: 23-33.
- Ismail MT, Kremer M: Determination of the site of pheromone emission in the virgin females *Culicoides nubeculosus* Meigen (Diptera: Ceratopogonidae). *J Insect Physiol* 1983, 29(3):221-224.
- Ivarsson P, Schlyter F, Birgersson G: Demonstration of de Novo pheromone biosynthesis in *Ips duplicatus* (Coleoptera: Scolytidae): inhibition of Ipsdienol and E-Myrcenol production by compactin. *Insect Biochem Mol Biol* 1993, 23(6):655-662.
- Ivarsson P, Tittiger C, Blomquist C, Borgeson CE, Seybold SJ, Blomquist GJ, Högberg HE: Pheromone precursor synthesis is localized in the metathorax of *Ips paraconfusus* Lanier (Coleoptera: Scolytidae). *Naturwissenschaften* 1998, 85(10):507-511.
- Jarvis EK, Rutledge LC: Laboratory observations on mating and leklike aggregations in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1992, 29(2):171-177.
- Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M *et al*: STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 2009, 37(suppl 1):D412-D416.
- Jones TM, Hamilton JGC: A role for pheromones in mate choice in a lekking sandfly. *Anim Behav* 1998, 56(4):891-898.
- Jordan AM: Control of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) with the aid of attractants. *J Am Mosq Control Assoc* 1995, 11(2 Pt 2):249-255.

- Jurenka R: Insect Pheromone Biosynthesis. In: The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I. Edited by Schulz S, vol. 239. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2004: 97-132.
- Jutsum A, Gordon R: Insect pheromones in plant protection: John Wiley & Sons Limited; 1989.
- Kamhawi S: Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? Trends in Parasitology 2006, 22(9):439-445.
- Karlson P, Butenandt A: Pheromones (ectohormones) in insects. Annu Rev Entomol 1959, 4(1):39-58.
- Keeling C, Blomquist G, Tittiger C: Coordinated gene expression for pheromone biosynthesis in the pine engraver beetle, *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae). Naturwissenschaften 2004, 91(7):324-328.
- Keeling CI, Henderson H, Li M, Yuen M, Clark EL, Fraser JD, Huber DP, Liao NY, Docking TR, Birol I *et al*: Transcriptome and full-length cDNA resources for the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major insect pest of pine forests. Insect Biochem Mol Biol 2012, 42(8):525-536.
- Kelly DW, Dye C: Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Anim Behav 1997, 53(4):721-731.
- Kikuchi K, Hirai M, Shiotsuki T: Molecular cloning and tissue distribution of farnesyl pyrophosphate synthase from the silkworm *Bombyx mori*. J Insect Biotechnol Sericol 2001, 70.
- Killick-Kendrick R: Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol 1990, 4(1):1-24.
- Killick-Kendrick R: The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin Dermatol 1999, 17(3):279-289.
- Kinjoh T, Kaneko Y, Itoyama K, Mita K, Hiruma K, Shinoda T: Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: Cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. Insect Biochem Mol Biol 2007, 37(8):808-818.
- Knipple DC, Rosenfield C-L, Miller SJ, Liu W, Tang J, Ma PWK, Roelofs WL: Cloning and functional expression of a cDNA encoding a pheromone gland-specific acyl-CoA Δ 11-desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. Proceedings of the National Academy of Sciences 1998, 95(26):15287-15292.

- Lane R, Phillips A, Molyneux DH, Procter G, Ward RD: Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? *Ann Trop Med Parasitol* 1985, 79(2):225-229.
- Lane R, Ward R: The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae) *Cahiers-ORSTOM Série Entomol Mèd Parasit* 1984, 22(3):245-249.
- Lane RP, Bernardes Dde S: Histology and ultrastructure of pheromone secreting glands in males of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Ann Trop Med Parasitol* 1990, 84(1):53-61.
- Langley PA, Carlson DA: Biosynthesis of contact sex pheromone in the female tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans* Westwood. *J Insect Physiol* 1983, 29(11):825-831.
- Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A: *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *Am J Trop Med Hyg* 1993, 48(6):839-847.
- Law JH, Regnier FE: Pheromones. *Annu Rev Biochem* 1971, 40(1):533-548.
- Leal W, Oehlschlager A, Zarbin PG, Hidalgo E, Shannon P, Murata Y, Gonzalez L, Andrade R, Ono M: Sex Pheromone of the Scarab Beetle *Phyllophaga elenans* and Some Intriguing Minor Components. *J Chem Ecol* 2003, 29(1):15-25.
- Leal WS: Scarab beetles. In: *Pheromones of non-lepidopteran insects associated with agricultural plants*. Edited by Hardie J, Minks AK. New York: CAB International; 1999: 51-68.
- Leal WS, Zarbin PHG, Wojtasek H, Ferreira JT: Biosynthesis of scarab beetle pheromones. *Eur J Biochem* 1999, 259(1-2):175-180.
- Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB, Minter DM: Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology* 1977, 2(4):319-332.
- Lewis MJ, Prosser IM, Mohib A, Field LM: Cloning and characterisation of a prenyltransferase from the aphid *Myzus persicae* with potential involvement in alarm pheromone biosynthesis. *Insect Mol Biol* 2008, 17(4):437-443.
- Linn C, Roelofs W: Response specificity of male moths to multicomponent pheromones. *Chem Senses* 1989, 14(3):421-437.
- Lins RM, Souza NA, Peixoto AA: Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and lovesong production. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, 103(7):736-740.

- Lorenz M, Boland W, Dettner K: Biosynthesis of Iridodials in the Defense Glands of Beetle Larvae (Chrysomelinae). *Angewandte Chemie International Edition in English* 1993, 32(6):912-914.
- Ma GY, Sun XF, Zhang YL, Li ZX, Shen ZR: Molecular cloning and characterization of a prenyltransferase from the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Insect Biochem Mol Biol* 2010, 40(7):552-561.
- Ma PWK, Ramaswamy SB, Blomquist G, Vogt R: Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing tissue. *Insect pheromone biochemistry and molecular biology: the biosynthesis and detection of pheromone and plant volatiles* 2003:19-51.
- Maingon RD, Ward RD, Hamilton JG, Noyes HA, Souza N, Kemp SJ, Watts PC: Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceara State, Brazil. *Mol Ecol* 2003, 12(7):1879-1894.
- Maingon RDC, Ward RD, Hamilton JGC, Bauzer LGSR, Peixoto AA: The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to Leishmania transmission? *Trends in parasitology* 2008, 24(1):12-17.
- Mangabeira OF: Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. *Revista Brasileira Malariol Doenças Tropicais* 1969, 12:3-26.
- Mann J: Secondary Metabolism and Ecology. In: *Chemical aspects of biosynthesis*, 1st edn. New York: Oxford University Press 1994: 303-328.
- Martins AV, Williams P, Falcão A: *American sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae)*. Rio de Janeiro: Acad Bras de Ciênc 1978.
- Matsumoto S, Fónagy A, Yamamoto M, Wang F, Yokoyama N, Esumi Y, Suzuki Y: Chemical characterization of cytoplasmic lipid droplets in the pheromone-producing cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 2002, 32(11):1447-1455.
- Mayoral JG, Nouzova M, Navare A, Noriega FG: NADP+-dependent farnesol dehydrogenase, a corpora allata enzyme involved in juvenile hormone synthesis. *PNAS* 2009, 106(50):21091-21096.
- Merivee E, Erm A: Studies on sex pheromone gland morphology and pheromone components in female elaterid beetles *Agriotes obscurus L.* and *Agriotes lineatus L.* (Coleoptera, Elateridae). In: *Proc. Est. Acad. Sci. Biol. Ecol* 1993: 108-117.
- Meyer AS, Hanzmann E, Schneiderman HA, Gilbert LI, Boyette M: The isolation and identification of the two juvenile hormones from the Cecropia silk moth. *Arch Biochem Biophys* 1970, 137(1):190-213.

- Meyer AS, Schneiderman HA, Hanzmann E, Ko JH: The two juvenile hormones from the cecropia silk moth. Proc Natl Acad Sci U S A 1968, 60(3):853-860.
- Millar JG: Polyene hydrocarbons and epoxides: a second major class of lepidopteran sex attractant pheromones. Annu Rev Entomol 2000, 45(1):575-604.
- Millerd A, Bonner J: Acetate activation and acetoacetate formation in plant systems. Arch Biochem Biophys 1954, 49(2):343-355.
- Minor A, Kaissling KE: Cell responses to single pheromone molecules may reflect the activation kinetics of olfactory receptor molecules. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 2003, 189(3):221-230.
- Morgan D: Biosynthesis in Insects. Great Britain: Royal Society of Chemistry; 2010.
- Morse RA: Honey Bee Alarm Pheromone: Another Function. Ann Entomol Soc Am 1972, 65(6):1430-1430.
- Morton IE, Ward RD: Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. Med Vet Entomol 1989, 3(3):219-223.
- Mukhopadhyay J, Ghosh K, Azevedo AC, Rangel EF, Munstermann LE: Genetic polymorphism of morphological and biochemical characters in a Natal, Brazil, population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J Am Mosq Control Assoc 1998, 14(3):277-282.
- Mutebi JP, Alexander B, Sherlock I, Wellington J, Souza AA, Shaw J, Rangel EF, Lanzaro GC: Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Brazil. Am J Trop Med Hyg 1999, 61(1):149-157.
- Nardi J, Young AG, Ujhelyi E, Tittiger C, Lehane M, Blomquist G: Specialization of midgut cells for synthesis of male isoprenoid pheromone components in two scolytid beetles, *Dendroctonus jeffreyi* and *Ips pini*. Tissue Cell 2002, 34(4):221-231.
- Nardi JB, Dowd PF, Bartelt RJ: Fine structure of cells specialized for secretion of aggregation pheromone in a nitidulid beetle *Carpophilus freemani* (coleoptera: Nitidulidae). Tissue Cell 1996, 28(1):43-52.
- Nelson D, Blomquist G: Insect waxes. In: Waxes: chemistry, molecular biology and functions. Edited by R.J. H1995: 1-90.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M: Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science's STKE 2007, 316(5832):1718.

- Nigam Y, Ward RD: The effect of male sandfly pheromone and host factors as attractants for female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Physiol Entomol* 1991, 16(3):305-312.
- Nordlund DA, Lewis W: Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J Chem Ecol* 1976, 2(2):211-220.
- Visceral leishmaniasis [<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/index.html>]
- Oshaghi MA, McCall PJ, Ward RD: Response of adult sandflies, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), to sticky traps baited with host odour and tested in the laboratory. *Ann Trop Med Parasitol* 1994, 88(4):439-444.
- Pinto IS, Filho JD, Santos CB, Falqueto A, Leite YL: Phylogenetic relationships among species of *Lutzomyia*, subgenus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 2010, 47(1):16-21.
- Pinto MC, Campbell-Lendrum DH, Lozovei AL, Teodoro U, Davies CR: Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med Vet Entomol* 2001, 15(2):132-139.
- Plarre R, Vanderwel D: Stored-product beetles. In: Pheromones of non-lepidopteran insects associated with agricultural plants. CABI Publishing, Oxford, UK. Edited by Hardie J, Minks AK. Wallingford: CAB International; 1999: 140-198.
- Price PW, Bouton CE, Gross P, McPheron BA, Thompson JN, Weis AE: Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1980:41-65.
- Pureswaran DS, Gries R, Borden JH, Pierce JHD: Dynamics of pheromone production and communication in the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, and the pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). *Chemoecology* 2000, 10(4):153-168.
- Quinnell RJ, Dye C: An experimental study of the peridomestic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Bull Entomol Res* 1994, 84(03):379-382.
- Quinnell RJ, Dye C, Shaw JJ: Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomol* 1992, 6(3):195-200.
- Rafaeli A, Jurenka RA: PBAN regulation of pheromone biosynthesis in female moths. In: *heromone biochemistry and molecular biology* 2003: 107-136.
- Ready PD: Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol* 2013, 58:227-250.

- Ritter FJ, Brüggemann-Rotgans IEM, Verwiel PEJ, Persoons CJ, Talman E: Trail pheromone of the Pharaoh's ant, *monomorium pharaonis*: isolation and identification of faranal, a terpenoid related to juvenile hormone II. *Tetrahedron Lett* 1977, 18(30):2617-2618.
- Robertson H, Martos R, Sears C, Todres E, Walden K, Nardi J: Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Mol Biol* 1999, 8(4):501-518.
- Roelofs WL, Rooney AP: Molecular genetics and evolution of pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100(16):9179-9184.
- Rogoff WM, Beltz AD, Johnsen JO, Plapp FW: A sex pheromone in the housefly, *Musca domestica* L. *J Insect Physiol* 1964, 10(2):239-246.
- Rohoušová I, Subrahmanyam S, Volfová V, Mu J, Volf P, Valenzuela JG, Jochim RC: Salivary Gland Transcriptomes and Proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, Vectors of Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, 6(5):e1660.
- Romero GA, Boelaert M: Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2010, 4(1):e584.
- Sacks D, Kamhawi S: Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 2001, 55:453-483.
- Sacks DL: Leishmania–sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* 2001, 3(4):189-196.
- Schlein Y, Warburg A: Phtophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Med Entomol* 1986, 23(1):11-15.
- Schooley DA, Judy KJ, Bergot BJ, Hall MS, Siddall JB: Biosynthesis of the Juvenile Hormones of *Manduca sexta*: Labeling Pattern from Mevalonate, Propionate, and Acetate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1973, 70(10):2921-2925.
- Schuler MA: The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol* 1996, 112(4):1411.
- Sen SE, Trobaugh C, Béliveau C, Richard T, Cusson M: Cloning, expression and characterization of a dipteran farnesyl diphosphate synthase. *Insect Biochem Mol Biol* 2007, 37(11):1198-1206.
- Seybold S, Huber DW, Lee J, Graves A, Bohlmann J: Pine monoterpenes and pine bark beetles: a marriage of convenience for defense and chemical communication. *Phytochem Rev* 2006, 5(1):143-178.

- Seybold SJ, Bohlmann J, Raffa KF: Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: evolutionary perspective and synthesis. *The Canadian Entomologist* 2000, 132(06):697-753.
- Seybold SJ, Quilici DR, Tillman JA, Vanderwel D, Wood DL, Blomquist GJ: De novo biosynthesis of the aggregation pheromone components ipsenol and ipsdienol by the pine bark beetles *Ips paraconfusus* Lanier and *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995, 92(18):8393-8397.
- Shimabukuro PHF: Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo. São Paulo Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007.
- Silverstein R, Young J: Insects generally use multicomponent pheromones. In: *Pest management with Insect Sex Attractants and Other Behavior-Controlling Chemicals*. ACS Symposium. Edited by Beroza M, vol. Series No 23. . Washington D.C. 1976: 1-29.
- Simpson SJ, Raubenheimer D: The geometric analysis of nutrient-allelochemical interactions: a case study using locusts. *Ecology* 2001, 82(2):422-439.
- Souza NA, A. A-CC, Vigoder FM, Ward RD, Peixoto AA: Reproductive isolation between sympatric and allopatric Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae). *Mem Osw Cruz* 2008, 110(2):216-219.
- Souza NA, Vigoder FM, Araki AS, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA: Analysis of the Copulatory Courtship Songs of *Lutzomyia longipalpis* in Six Populations from Brazil. *J Med Entomol* 2004, 41(5):906-913.
- Souza NA, Ward RD, Hamilton JGC, Kyriacou CP, Peixoto AA: Copulation songs in three siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, 96(1):102-103.
- Spiegel CN, Batista-Pereira LG, Bretas JAC, Eiras ÁE, Hooper AM, Peixoto AA, Soares MJ: Pheromone Gland Development and Pheromone Production in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *J Med Entomol* 2011, 48(3):489-495.
- Spiegel CN, Brazil RP, Soares MJ: Ultrastructure of male sex pheromone glands in abdominal tergites of five *Lutzomyia* sandfly species (Diptera: Psychodidae). *Arthropod Struct Dev* 2002, 30(3):219-227.
- Spiegel CN, Brazil RP, Soares MJ: Ultrastructural cytochemistry of the sex pheromone glands of *Lutzomyia cruzi* male sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Arthropod Struct Dev* 2004, 33(4):399-404.
- Starai VJ, Celic I, Cole RN, Boeke JD, Escalante-Semerena JC: Sir2-Dependent Activation of Acetyl-CoA Synthetase by Deacetylation of Active Lysine. *Science* 2002, 298(5602):2390-2392.

- Steiger S, Schmitt T, Schaefer HM: The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2011, 278(1708):970-979.
- Strandh M, Johansson T, Ahrén D, Löfstedt C: Transcriptional analysis of the pheromone gland of the turnip moth, *Agrotis segetum* (Noctuidae), reveals candidate genes involved in pheromone production. *Insect Mol Biol* 2008, 17(1):73-85.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguez P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P *et al*: The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* 2011, 39(suppl 1):D561-D568.
- Taban AH, Fu J, Blake J, Awano A, Tittiger C, Blomquist GJ: Site of pheromone biosynthesis and isolation of HMG-CoA reductase cDNA in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Arch Insect Biochem Physiol* 2006, 62(4):153-163.
- Taban AH, Tittiger C, Blomquist GJ, Welch WH: Isolation and characterization of farnesyl diphosphate synthase from the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Arch Insect Biochem Physiol* 2009, 71(2):88-104.
- Tashiro T, Bando M, Mori K: Pheromone Synthesis, CCVIII: Synthesis of (1S, 3S, 7R)-3-Methyl- α -himachalene, the Sex Pheromone of the Sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Jacobina, Brazil. *Synthesis* 2000, 13:1852-1862.
- Theodor O: On the classification of American Phlebotominae. *J Med Entomol* 1965, 2(2):171-197.
- Tillman JA, Holbrook GL, Dallara PL, Schal C, Wood DL, Blomquist GJ, Seybold SJ: Endocrine regulation of de novo aggregation pheromone biosynthesis in the pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1998, 28(9):705-715.
- Tillman JA, Holbrook GL, Dallara PL, Schal C, Wood DL, Blomquist GJ, Seybold SJ: Endocrine regulation of de novo aggregation pheromone biosynthesis in the pine engraver, *Ips pini* (Say)(Coleoptera: Scolytidae). *Insect Biochem Mol Biol* 1998, 28(9):705-715.
- Tillman JA, Seybold SJ, Jurenka RA, Blomquist GJ: Insect pheromones--an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochem Mol Biol* 1999, 29(6):481-514.
- Valenzuela JG, Pham VM, Garfield MK, Francischetti IMB, Ribeiro JMC: Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 2002, 32(9):1101-1122.
- Vandermoten S, Santini S, Haubruge E, Heuze F, Francis F, Brasseur R, Cusson M, Charlotiaux B: Structural features conferring dual geranyl/farnesyl diphosphate

- synthase activity to an aphid prenyltransferase. *Insect Biochem Mol Biol* 2009b, 39(10):707-716.
- Vanderwel D: Factors affecting pheromone production in beetles. *Arch Insect Biochem Physiol* 1994, 25(4):347-362.
- Verpoorte R: Secondary metabolism. In: *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Edited by Verpoorte R, Alfermann A. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000: 1-29.
- Vigoder FM, Araki AS, Bauzer LG, Souza NA, Brazil RP, Peixoto AA: Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infect Genet Evol* 2010, 10(6):734-739.
- Vigoder FM, Araki AS, Bauzer LGSR, Souza NA, Brazil RP, Peixoto AA: Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. *Infect, Genet Evol* 2010, 10(6):734-739.
- Vogel H, Heidel AJ, Heckel DG, Groot AT: Transcriptome analysis of the sex pheromone gland of the noctuid moth *Heliothis virescens*. *BMC Genomics* 2010, 11:29.
- Vogt RG: Molecular basis of pheromone detection in insects. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry, pharmacology and molecular biology*. Edited by Gilbert L, S L, S G, vol. 3. London 2005: 753-804.
- Wadleigh RW, Yu SJ: Glutathione transferase activity of fall armyworm larvae toward α , β -unsaturated carbonyl allelochemicals and its induction by allelochemicals. *Insect Biochem* 1987, 17(5):759-764.
- Wanner KW, Willis LG, Theilmann DA, Isman MB, Feng Q, Plettner E: Analysis of the insect os-d-like gene family. *J Chem Ecol* 2004, 30(5):889-911.
- Warburg A, Faiman R: Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. *J Vector Ecol* 2011, 36:S10-S16.
- Ward R, Morton I, Lancaster V, Smith P, Swift A: Bioassays as an indicator of pheromone communication in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). In: *Leishmaniasis: The current status and new strategies for control*. NATO ASI Series A: Life Science Edited by Hart DT, vol. 163. New York: Springer; 1989: 239-247.
- Ward R, Phillips A, Burnet B, Marcondes C: The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Edited by MW S. Oxford Oxford University Press; 1988: 258-269.
- Ward RD, Ribeiro AL, Ready PD, Murtagh A: Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva),(Diptera: Psychodidae), the vector of

- Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. Mem Inst Oswaldo Cruz 1983, 78(3):269-280.
- Watts PC, Hamilton JG, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, Feliciangeli MD, Brazil R, Maingon RD: Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. Am J Trop Med Hyg 2005, 73(4):734-743.
- Wen Z, Pan L, Berenbaum MR, Schuler MA: Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. Insect Biochem Mol Biol 2003, 33(9):937-947.
- Whitman D: Allelochemical interactions among plants, herbivores, and their predators. Novel Aspects of Insect-Plant Interactions 1988:207-248.
- Wicker-Thomas C: Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. J Insect Physiol 2007, 53(11):1089-1100.
- Wilson EO, Bossert WH: Chemical communication among animals. Recent Prog Horm Res 1963, 19:673.
- Witzgall P, Kirsch P, Cork A: Sex pheromones and their impact on pest management. J Chem Ecol 2010, 36(1):80-100.
- Wyatt TD: Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste: Cambridge University Press; 2003.
- Young DG, Duncan MA: Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst 1994(54).
- Zhang A, Robbins PS, Leal WS, Linn CE, Villani MG, Roelofs WL: Essential amino acid methyl esters: major sex pheromone components of the cranberry white grub, *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae). J Chem Ecol 1997, 23(1):231-245.
- Zhang Y-L, Li Z-X: Functional analysis and molecular docking identify two active short-chain prenyltransferases in the green peach aphid, *Myzus persicae*. Arch Insect Biochem Physiol 2012, 81(2):63-76.
- Zhou JJ, Kan Y, Antoniw J, Pickett JA, Field LM: Genome and EST analyses and expression of a gene family with putative functions in insect chemoreception. Chem Senses 2006, 31(5):453-465.