



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

TESE DE DOUTORADO

**TABANÍDEOS, DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA NA
REGIÃO DE LAGES, SC. Análise proteômica da
glândula salivar e prospecção de
tripanossomatídeos.**

CARLOS JOSÉ RAUPP RAMOS

LAGES, 2019

CARLOS JOSÉ RAUPP RAMOS

**TABANÍDEOS, DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA NA REGIÃO DE LAGES, SC.
Análise proteômica da glândula salivar e prospecção de tripanossomatídeos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Professor Doutor Luiz Claudio Miletto

LAGES, SC

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Ramos, Carlos José Raupp

Tabanídeos, da floresta ombrófila mista na região de Lages, SC.
Análise proteômica da glândula salivar e prospecção de
tripanossomatídeos. / Carlos José Raupp Ramos. -- 2019.
97 p.

Orientador: Luiz Claudio Milette

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, Lages, 2019.

1. Tabanídeos. 2. Saliva. 3. Proteínas. 4. Peptídeos. 5. Vetores.
I. Milette, Luiz Claudio. II. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CARLOS JOSÉ RAUPP RAMOS

**TABANÍDEOS, DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA NA REGIÃO DE LAGES, SC.
Análise proteômica da glândula salivar e prospecção de tripanossomatídeos**

Tese apresentada no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Banca Examinadora

Orientador: _____
Professor Doutor Luiz Claudio Miletti
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Membro: _____
Professor Doutor Álvaro Menin
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Membro: _____
Professor Doutor Andreas Lazaros Chryssafidis
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Membro: _____
Professora Doutora Luciana Dalla Rosa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Membro: _____
Professora Doutora Rosiléia Quadros Marinho
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

LAGES, SC, 09 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e incentivo, e também porque souberam compreender a minha ausência em tantos momentos.

Ao meu orientador Luiz Claudio Miletti, pela oportunidade, compreensão e auxílio durante essa jornada, mas acima de tudo pela paciência.

À minha esposa Dayani, por sempre estar disposta a me ajudar, pela paciência nos momentos de ausência, e principalmente, pelo seu apoio que conforta e me deixa mais forte para superar os desafios impostos pela vida. A minhas filhas, Isa, Marina e Laura, que de uma maneira ou de outra me incentivaram nesta jornada de conhecimento. A minha mãe, Rosa Maria, que sempre está a meu lado, em todos os momentos. Aos meus irmãos, Carla e Chico.

À toda equipe do LABHEV que de forma direta e indireta auxiliaram na produção desse trabalho.

Aos mestres do curso de Pós-graduação, pelos ensinamentos, nas dificuldades e oportunidades.

À todos os amigos, colegas e profissionais, que de alguma forma contribuíram para o encaminhamento e conclusão desse trabalho.

Aos ausentes, que de algum lugar, vibram positivamente.

Aos insetos, que por motivos científicos, doaram suas existências para o conhecimento humano, que ainda é bem limitado.

E finalmente, a D'us, o eterno, que sempre me abençoou.

“Antes medíocre por opção do que por vocação”.

Cazé, o poeta.

RESUMO

Tabanídeos são insetos onde somente a fêmea é hematófaga, e além do incômodo provocado por sua picada, em animais de produção, companhia e humanos, podem também transmitir agentes causadores de enfermidades. Devido ao hábito alimentar, esses animais possuem em sua saliva componentes com poder anti-hemostático, vasodilatador, inibidor de imunoglobulinas, entre outros. Além disso, são também vetores mecânicos de uma série de agentes patogênicos importantes, como os tripanossomatídeos. Tendo em vista estas características, foi realizado um estudo de bioprospecção de componentes da glândula salivar de tabanídeos da floresta ombrófila mista (Sul do Brasil) e pesquisa da presença de *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* no aparelho bucal destes insetos, além do levantamento populacional e estudo de preferência anatômica para repasto. Foram capturados, semanalmente, entre as 15h e 18h, em quatro sítios na região de Lages, tabanídeos (Diptera, Tabanidae) no período de fevereiro de 2018 a fevereiro de 2019. As capturas com iscas usando um equino de coloração escura ocorreram durante três horas. Quatro observadores munidos de copos de vidro coletaram as moscas que pousaram no cavalo, este permanecia em estação para os procedimentos de coleta, e a cada 30 minutos era colocado em marcha, durante 5 minutos. Os exemplares capturados foram armazenados conforme localização do repasto, no dispositivo SECTAB e foram escolhidas as espécies mais abundantes e de maior tamanho, para facilitar a dissecação e fornecer material em quantidade suficiente para análise. Os insetos coletados foram mortos em frascos mortíferos contendo clorofórmio. Após, foi procedida a identificação taxonômica, sendo as glândulas salivares e os aparelhos bucais extraídos logo após a coleta. As glândulas salivares foram dissecadas sob um estereomicroscópio e transferidas para microtubo contendo tampão fosfato - salina (PBS pH 7.2), foram armazenados em TNE. O DNA do aparelho bucal e proteínas das glândulas salivares foram extraídos e analisados especificamente para a prospecção dos tripanossomatídeos e para a análise proteômica. O número de espécies de tabanídeos variou de zero no outono/inverno a sete no verão (dezembro a fevereiro). *Dichelacera (D.) alcicornis* Wied. (276) foi a espécie mais abundante seguida de *Chrysops fuscipex* Lutz (94) e *C. patricia* Pechuman (56). As capturas de pico ocorreram durante o verão (dezembro a fevereiro). O comportamento de pouso para repasto sanguíneo variou de acordo com os gêneros e espécies: *Chrysops* sp. (98,93%) preferiram a cabeça, *Fidena nigripes* (100%) tórax e abdomen, já *Dichelacera* sp. (73,91%), *Poeciloderas* sp. (95,65%) e *Acanthocera kroeberi* (100%) preferiram os membros. No material do aparelho bucal do gênero *Dichelacera* spp. e da espécie *Dichelacera (D.) alcicornis* foi encontrado DNA de *T. evansi*. Nas glândulas salivares das espécies *D. (D.) alcicornis*, *D. (D.) januarii* e *Fidena nigripes* foram identificadas 70 proteínas com funções nos processos metabólicos dos ácidos carboxílicos, proteínas, carboidratos, bem como funções estruturais, oxirredutoras, de transporte.

Palavras chave: Tabanídeos, saliva, peptídeos, proteínas, *Trypanosoma evansi*, vetores.

ABSTRACT

Tabanids are insects, in which only the female is hematophagous. In addition to the irritation caused by its bite in farm animals, as well as in humans, tabanids can also transmit disease-causing agents. Due to tabanids feeding habits, their saliva contains anti-hemostatic agents, vasodilators, immunoglobulin inhibitors, among other components. Besides that, they also act as mechanical vectors of several important pathogens, such as trypanosomatids. Due to these facts, a bioprospecting study on the salivary gland components from the mixed ombrophilous forest (Southern Brazil) tabanids was performed. It was also investigated the presence of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in the oral tract of these insects, in addition to a population survey as well as assessment of anatomical preference for repast. Tabanids (Diptera, Tabanidae) were captured, weekly, between February 2018 to February 2019 at 3 to 6 pm in four different farms in Lages. The capture occurred for three hours and used a dark-colored horse as a bait. We collected the horse landed flies using a glass cup. The horses exercised every 30 minutes, for 5 minutes, and remained in station for collection procedures. The captured specimens were stored according to repast location, in a SECTAB device. The most abundant and larger specimens were chosen to facilitate dissection and provide sufficient material for analysis. The collected insects were killed in chloroform containing flasks. After that, a taxonomic identification was performed, with salivary glands and oral appliances extracted soon after the collection. The salivary glands were dissected under a stereomicroscope and transferred to a microtube containing phosphate - saline buffer (PBS pH 7.2), and stored in TNE. The oral DNA and salivary gland proteins were extracted and analyzed specifically for trypanosomal prospection and proteomic analysis. The number of tabanid species fluctuated from zero in the fall/winter to seven in the summer (December to February). *Dichelacera (D.) alcornis* Wied. (276) was the most abundant species followed by *Chrysops fuscipex* Lutz (94) and *C. patricia* Pechman (56). Peak catches occurred during the summer (December to February). The landing behavior for blood repast varied according to genera and species: *Chrysops* spp. (98.93%) preferred the head, *Fidena nigripes* (100%) thorax and abdomen, while *Dichelacera* spp. (73.91%), *Poeciloderas* sp. (95.65%) and *Acanthocera kroeberi* (100%) preferred the members. In the mouthpiece material of the genus *Dichelacera* spp. and from the species *Dichelacera (D.) alcornis* was found DNA of *T. evansi*. In the salivary glands of the species *D. (D.) alcornis*, *D. (D.) januarii* and *Fidena nigripes*, 70 proteins with functions in the metabolic processes of carboxylic acids, proteins, carbohydrates, as well as structural, oxidoreductive, transport functions were identified.

Keywords: Tabanids, saliva, peptides, *Trypanosoma evansi*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Glândula salivar de tabanídeo, 1 par - *Dichelacera (D.) alcicornis*. 18
- Figura 2 – Características anatômicas de tabanídeo - *Dichelacera (D.) alcicornis*.....19
- Figura 3 – Ciclo biológico geral dos tabanídeos.20
- Figura 4 – Ciclo de transmissão do *T. evansi* e *T. vivax*. Multiplicação na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado. Transmissão mecânica por vetor..... 22
- Figura 5 - Morfologia do *T. evansi*. (A) *T. evansi* (seta) em esfregaço sanguíneo de camundongo experimentalmente infectado. Coloração de Romanowsky. Aumento de 100x. (B) Desenho esquemático *T. evansi* encontrado no sangue de equinos, Pantanal, Brasil. Em (A) e (B) não observa-se cinetoplasto.....24
- Figura 6 –Distribuição da infecção por *T. evansi* no mundo, considerando a presença da infecção com doença clínica (verde escuro), presença da infecção sem dados epidemiológicos (verde claro) e presença de surtos seguido da erradicação (cinza). 244

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micras ou micrômetros
ACN	Acetonitrila
CaCl_2	Cloreto de Cálcio
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	Força da gravidade
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
Km^2	Quilômetro Quadrado
kV	Quilovolt
m	Metro
M	Molar
m/z	Mass divided by charge (massa dividida pela carga)
mL	Mililitro
mM	Micromolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NH_4HCO_3	Bicarbonato de Amônio
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
pb	Pares de Bases
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Dodecil Sulfato de Sódio – Gel de Poliacrilamida para Eletroforese)

TNE Solução de Tris Base, NaCl e EDTA

SECTAB Dispositivo de armazenagem de tabanídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Artrópodos Vetores	15
2.2	Tabanídeos.....	18
2.3	Tripanossomatídeos	222
2.4	<i>Trypanosoma evansi</i>	23
2.5	<i>Trypanosoma vivax</i>	255
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	REFERÊNCIAS	29
5	CAPÍTULO I – MANUSCRITO I – Pesquisa de <i>Trypanosoma evansi</i> e <i>T. vivax</i> em tabanídeos, da floresta ombrófila mista na região de Lages,SC.....	37
5.1	INTRODUÇÃO	38
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	42
5.2.1	Descrição da região estudada	42
5.2.2	Coleta de amostras.....	43
5.2.3	Identificação taxonômica dos tabanídeos	44
5.2.4	Dados meteorológicos	44
5.2.5	Extração de DNA.....	444
5.2.6	Detecção de DNA de <i>T. evansi</i> e <i>T. vivax</i> extraído das peças bucais dos tabanídeos	455
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.3.1	Espécimes coletados	46
5.3.2	Detecção de DNA de <i>T. evansi</i> e <i>T. vivax</i> em aparelho bucal dos tabanídeos coletados	500
5.4	CONCLUSÃO.....	544
5.5	REFERÊNCIAS	544
6	CAPÍTULO II – MANUSCRITO II - Análise proteômica da glândula salivar de três espécies de tabanídeos da floresta ombrófila mista (sul do brasil).....	63
6.1	INTRODUÇÃO	64
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	644

6.2.1	Descrição da região estudada.....	644
6.2.2	Coleta de amostras	655
6.2.3	Identificação taxonômica dos tabanídeos	666
6.2.4	Dados meteorológicos.....	666
6.2.5	Preparação dos extratos de glândula salivar	677
6.2.6	Eletrforese em gel de dodecil sulfato de poliacrilamida de sódio (SDS-PAGE) 677	
6.2.7	Digestão tríptica (em gel e em solução).....	677
6.2.8	Análise Nano-LC ESI-MS / MS	68
6.2.9	Pesquisas de banco de dados.....	69
6.2.10	Análise de bioinformática	700
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	700
6.3.1	Espécimes coletados	700
6.3.2	Glândulas salivares	712
6.4	CONCLUSÃO	93
6.5	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

Desde que o ser humano habita a face da terra, sua caminhada ao longo da evolução foi e vem sendo acompanhada por inúmeras criaturas, incluindo os insetos que serviram de alimento, passando por passaporte para o céu durante as trevas da Idade Média e chegando modernamente a produção de mel e seda. Os insetos foram então divididos em três grandes grupos, os benéficos, os nocivos e os indiferentes. Os insetos nocivos, que causam males ao homem e aos animais domésticos, são considerados parasitos. No Brasil, o número de pragas está estimado em 500 espécies, provocando perdas na produção estimadas em 7 a 79%. Apesar de todo conhecimento adquirido e disponível, ainda não se sabe acerca do papel dos insetos na transmissão de doenças (MACHADO, 1987; BUZZI, 2002). Os insetos úteis, que de uma forma ou de outra auxiliam na vida do homem produzindo algum produto, controlando pragas e mesmo servindo de alimento, os exemplos são variados, a seda produzida pela saliva do lepidóptero *Bombyx mori*, o mel, a própolis, a cera e a geléia real, produzidos por abelhas *Apis mellifera*, o pigmento de coloração vermelho-carmim, da cochonilha *Dactylopius coccus*. Os insetos podem ainda servir como alimentos para o homem e para animais, que transformam esse tipo de proteína em uma proteína de alta qualidade e digestibilidade, como aves e peixes, por exemplo. Ainda, a polinização de plantas que é feita por muitos insetos. Os insetos podem ser indiferentes diretamente ao homem, porém ainda assim, tem extrema importância, pois fazem parte da cadeia alimentar de inúmeros animais e por esse motivo tem seu papel assegurado na natureza. Finalmente os insetos nocivos, que causam muitos males ao homem e aos animais domésticos, um grande exemplo são aqueles considerados pragas. No Brasil, o número de insetos, pragas está estimado em 500 espécies. Algumas destas são, as cigarras-do-cafeiro, espécies exóticas como o bicudo-do-algodoeiro (*Antonomus grandis*), percevejo-das-gramíneas (*Blissus leucopterus*), dentre outros, que provocam perdas na produção estimadas em 7 a 79%. Há ainda insetos que destroem as plantas, pois alimentam-se de folhas, sugam seiva, podem ainda transmitir patógenos, como fungos e vírus para estas plantas (BUZZI, 2002). Para o homem e animais domésticos, além da perturbação, causam estresse e perda na produção, há ainda a inoculação de substâncias, como peptídeos, por exemplo, e agentes através de picadas. Os insetos podem servir como vetores mecânicos ou biológicos de patógenos. Vetor é uma criatura viva que devido ao seu relacionamento ecológico com outros, adquire um patógeno de um hospedeiro vivo e transmite-o para outros. Portanto, transmissão por vetor é uma forma de transmissão horizontal indireta em que um intermediário biológico, geralmente um artrópodo, carrega o agente de doença entre homens e animais. Os vetores mecânicos, são

aqueles que carregam patógenos, mas estes não se modificam, apenas são carregados de um local para outro, como por exemplo as moscas, que são os principais vetores mecânicos existentes, que apanham estes agentes patogênicos em locais sujos, depositando-os sobre alimentos, o que pode acarretar em males como febre tifóide, cólera, desintéria, entre outros (BUZZI, 2002). Os vetores biológicos são aqueles no qual o agente sofre algum tipo de replicação no vetor (MARCONDES, 2001; BUZZI, 2002). Os principais vetores biológicos são aqueles que se alimentam de sangue, e junto com este sugam os agentes patogênicos que, mais tarde inoculam em outros hospedeiros. A infecção pode se dar através da saliva ou de excrementos. Alguns exemplos são, a doença africana do sono, causada pelo *Trypanosoma gambiense* e *T. rhodesiense*, transmitida pela mosca tsé-tsé (*Glossina* sp.), a doença de Chagas, causada pelo *T. cruzi*, transmitida por barbeiros, principalmente dos gêneros, *Triatoma* e *Rhodnius*, peste bubônica, causada pela *Pasteurella pestis* (= *Yersinia pestis*), transmitida por várias pulgas, especialmente a *Xenopsylla cheopis*, a pulga do rato, desintéria amebiana, causada pela *Entamoeba histolytica*, transmitida pela mosca doméstica (*Musca domestica*), e várias moscas califorídeas e sarcófagídeas, acometendo homens e animais (BUZZI, 2002).

A saliva dos insetos hematófagos assegura o elo estabelecido pelo hábito hematofágico, acoplando os três principais elementos de uma cadeia epidemiológica: o vetor, o parasito e o hospedeiro. O conhecimento desta interação é de grande relevância para o entendimento da estrutura de transmissão de doenças através da hematofagia (SILVA, 2009). Portanto, o presente estudo teve como objetivo detectar os principais peptídeos com ação biológica na saliva dos tabanídeos, bem como pesquisar os protozoários tripanossomatídeos em seu aparelho bucal, contribuindo, assim, com os estudos epidemiológicos regionais e nacionais sobre estas enfermidades e vetores negligenciados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Artrópodos Vetores

Durante o repasto sanguíneo, os insetos hematófagos injetam saliva nos tecidos dos hospedeiros. As moléculas do conteúdo salivar auxiliam na busca por um local ideal para a hematofagia e na superação das consequências fisiológicas naturais ali encontradas. Para exercer com sucesso esta tarefa, os insetos hematófagos precisam superar os obstáculos hemostáticos e inflamatórios do hospedeiro (SILVA, 2009).

Alguns artrópodos podem sugar sangue diretamente de um vaso capilar, estes são caracterizados como solenófagos (triatomíneos, fitirápteros e culicídeos), outros alimentam-se de um hematoma formado sob a pele, são os telmófagos (flebotomíneos, simulídeos, ceratopogonídeos e tabanídeos) (GORDON e CREWE, 1948; MARCONDES, 2001). Insetos hematófagos precisam se alimentar de forma rápida e eficaz, a fim de se proteger dos hospedeiros, tanto das investidas mecânicas destes, quanto de suas barreiras e mecanismos de proteção imunológica (MARCONDES, 2001). Ao longo da evolução, animais hematófagos precisaram desenvolver mecanismos para o sucesso de sua sobrevivência, desta forma, suas glândulas salivares e sua saliva apresentam substâncias com atividade farmacológica anti-hemostática e de prevenção contra a atividade imunológica de seus hospedeiros, isto inclui inibidores de coagulação sanguínea e agregação plaquetária, bem como substâncias imunossupressivas e vasodilatadoras. A quantidade muito pequena destas substâncias no organismo dificultam seu estudo, ainda assim, o isolamento de agentes anticoagulantes e a caracterização de seus locais de ação tem sido cada vez mais estudados (RIBEIRO *et al.*, 1989; MARKWARDT, 1994; RIBEIRO, 1995; BOWMAN *et al.*, 1997; AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1999; CHARLAB *et al.*, 1999; SCHOELER e WIKEL, 2001; ZAVALOVA *et al.*, 2002).

Os anti-hemostáticos são encontrados em vários animais hematófagos, como, por exemplo, o primeiro inibidor de fator Xa encontrado na sanguessuga *Haementeria officinalis* (TUSZYNSKI *et al.*, 1987), ou a ixina, um inibidor de trombina presente em carrapatos da família Ixodidae (*Ixodes ricinus*) (HOFFMANN *et al.*, 1991), *Amblyoma americanum* (ZHU *et al.*, 1997a; ZHU *et al.*, 1997b), larvas e ninfas de carrapato do camelo *Hyaloma dromedarii* apresentam atividades anticoagulantes (IBRAHIM *et al.*, 2000) que agem sobre a fXa e trombina. Em carrapatos da família Argasidae o carrapato do gênero *Ornithodoros* apresenta atividade anti-fXa, antitrombina e antiagregação plaquetária (HELLMANN e HAWKINS, 1967), outro carrapato do mesmo gênero, *O. savignyi* também apresenta atividades

antihemostáticas (GASPAR *et al.*, 1996). Em culicídeos *Anopheles albimanus*, um dos transmissores da malária, possui um inibidor de trombina chamado anofelina (VALENZUELA *et al.*, 1999; FRANCISCHETTI *et al.*, 1999), *Aedes aegypti*, transmissor da febre amarela e dengue possui atividade anticoagulante dirigida ao fator Xa nas glândulas salivares das fêmeas (STARK e JAMES, 1995), *Culex quiquefasciatus* apresenta em sua saliva uma atividade fosfolipásica C específica para o fator de ativação plaquetária batizada de “PAF-fosforilcolina-hidrolase” (RIBEIRO e FRANCISCHETTI, 2001). Outros membros da família Culicidae, *Culex* spp., *Aedes* spp. contém inibidores de fXa enquanto membros da família Anofelidae, *Anopheles* spp. contém inibidores antitrombina (STARK e JAMES, 1996). Barbeiros, como o *Rhodnius prolixus* possuem no trato digestório antitrombina, a prolixina-G e na glândula salivar uma substância que inibe o fator VIII pela prolixina-S (HELLMANN e HAWKINS, 1964; HELLMANN e HAWKINS, 1965), o *Triatoma pallidipenis*, possui duas proteínas salivares que atuam em eventos anti-hemostáticos distintos, a triabina que inibe a trombina e a palidipina que inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno (NOESKE-JUNGBLUT *et al.*, 1995). O percevejo *Cimex lectularius* apresenta um anticoagulante que inibe a ativação de fX a fXa pela tenase intrínseca (VALENZUELA *et al.*, 1996).

As moscas hematófagas ao se alimentarem lesam capilares sanguíneos causando pequenos hematomas subcutâneos que são mantidos como fonte de alimentação devido a substâncias anti-hemostáticas presentes em sua saliva (RIBEIRO, 1987).

A primeira substância relatada por Hawkins (1966) com poder anticoagulante em glândulas salivares de moscas da espécie *Glossina austeri* foi um ativador de plasminogênio, que também apresentou um inibidor de trombina com atividade semelhante. Posteriormente, duas frações com inibidores de agregação plaquetária também foram descritas, um componente com alto peso molecular e um com peso molecular menor (MANT e PARKER, 1981). A molécula com baixo peso molecular chamada de *Tsetse Thrombin Inhibitor* (TTI) é um pequeno peptídeo com poderosa atividade inibitória sobre a trombina e possui função dupla de evitar a coagulação sanguínea no local da lesão no hospedeiro e de manter o sangue fluído no trato digestório do parasito (CAPPELLO, 1996).

Haematobia irritans (mosca-do-chifre), onde ambos os sexos são hematófagos, contém em sua saliva um inibidor de trombina e trombostatina, que inibem a agregação plaquetária induzida por trombina e bloqueia a atividade da enzima ligando-se ao seu sítio catalítico (ZHANG *et al.*, 2002).

O repasto sanguíneo é importante para a nutrição de insetos hematófagos, e para seu crescimento. Muitos artrópodos só são capazes de crescer e se reproduzir realizando a hematofagia, muitas vezes, desde sua primeira fase de vida até a fase adulta. Sem o repasto sanguíneo não ocorre a transformação completa, e os estágios imaturos, poderiam realizar apenas uma mudança de cutícula. Alguns artrópodos exercem a hematofagia apenas como fonte de proteínas e aminoácidos para desenvolvimento do ovário, tendo importante papel reprodutivo, aqui os machos não sugam sangue, necessitando somente das substâncias açucaradas obtidas de diversas fontes vegetais e que servirão para a sua manutenção biológica (CARRERA, 1991; REY, 1992; NEVES *et al.*, 2005; SILVA, 2009).

Do ponto de vista parasitológico e epidemiológico, a hematofagia tem papel na transmissão de agentes patogênicos aos animais e ao homem, vários destes, utilizam o hábito hematofágico dos insetos para a continuidade de seu ciclo de vida e podem passar de um hospedeiro a outro através (1) do fluxo salivar (*Plasmodium* spp.); (2) do bloqueio mecânico do canal alimentar (*Leishmania* spp.); (3) da excreção de fezes contaminadas durante a pré-diurese (*Trypanosoma cruzi*), e (4) pelo rompimento do aparato bucal (*Wuchereria bancrofti*). Em qualquer um destes casos, é durante a hematofagia que se estabelece o contato mais íntimo entre o inseto e seu hospedeiro sanguíneo (CARRERA, 1991; REY, 1992; NEVES *et al.*, 2005; SILVA, 2009).

A alimentação dos insetos hematófagos é caracterizada por várias etapas, penetração das peças bucais na pele do hospedeiro, localização do sangue, caracterizando a fase de sondagem ou *probing*, após vem a fase de ingurgitamento, onde o alimento entra no canal alimentar. Para transferir o sangue do hospedeiro para o intestino médio, os insetos apresentam bombas de sucção localizadas na sua cabeça. Estas podem ser uma (a bomba cibarial, triatomíneos) ou pode haver duas (a bomba faríngea culicídeos, flebotomíneos, simulídeos e tabanídeos). Estas bombas funcionam criando uma diferença de pressão entre a abertura do canal alimentar na pele do hospedeiro e o lúmen da cavidade criada pela contração da musculatura associada às mesmas (CHAPMAN, 1995; LEHANE, 2005; MARTINS, 2015). Tabanídeos possuem, ainda, um par de glândulas salivares (**Figura 1**).

Figura 1 – Glândula salivar de tabanídeo, 1 par - *Dichelacera (D.) alcicornis*.



Fonte: Acervo do autor, 2019.

2.2 Tabanídeos

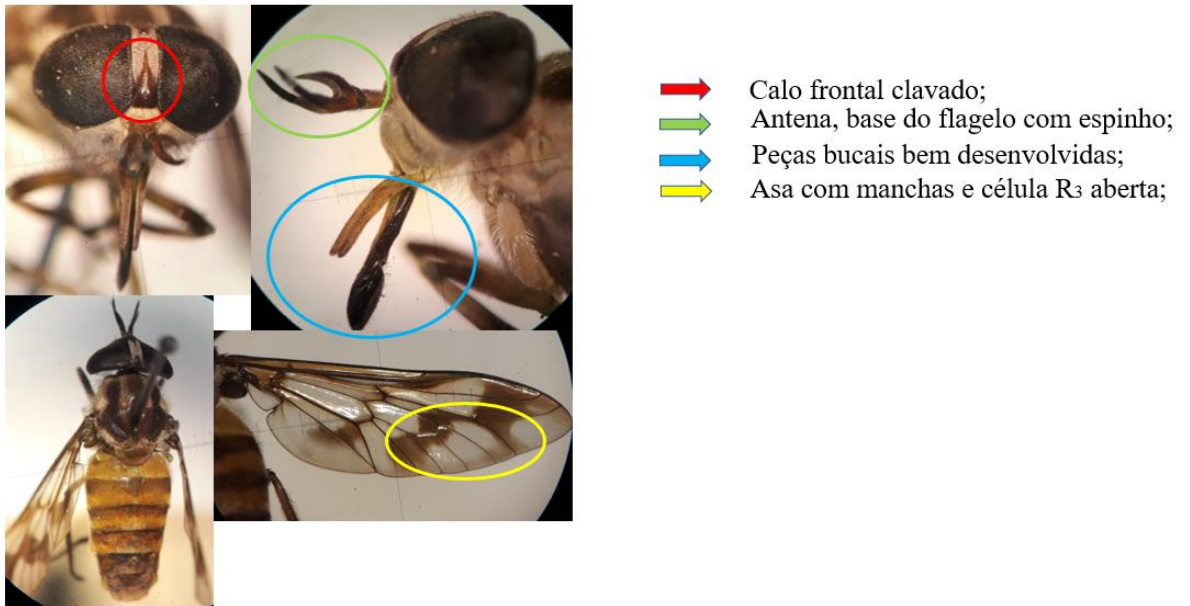
Tabanídeos são dípteros que compreendem 4400 espécies com 144 gêneros, a família inclui quatro subfamílias divididas em tribos: Chrysopsinae (Bouvieromyiini, Chrysopsini e Rhinomyzini), Pangoniinae (Mycteromyiini, Pangoniini, Philolichini e Scionini), Sceptidinae e Tabaninae (Diachlorini, Haematopini e Tabanini). Economicamente, os tabanídeos mais relevantes são os Chrysopsinae, particularmente o gênero *Chrysops* e os Tabaninae (COSCARÓN e PHILIP, 1979; MULLENS, 2002; LESSARD *et al.*, 2013; ROSKOV *et al.*, 2013).

São conhecidos comumente como mutucas, butucas, *deer flies*, *horse flies* e *clegs*. O termo *horse flies* geralmente se refere as espécies de Tabaninae, já o termo *deer flies* usado para *Chrysops* spp. e *cleg* para *Haematopota* spp. (CHVÀLA *et al.*, 1972).

Os tabanídeos possuem um corpo de 6 a 30mm de comprimento geralmente de cor escura (MARCONDES, 2001). A cabeça é hemisférica mais larga que o tórax, os ocelos estão ausentes em algumas espécies, as asas apresentam dois lobos sendo claras e com pequenas manchas. As tíbias posteriores são desprovidas de espinhos (FORTES, 2004).

Para identificação destes insetos é importante observarmos alguns aspectos anatômicos, como o tamanho, a cor, o calo frontal, as peças bucais, as antenas especialmente o terceiro artigo chamado de flagelo, as asas, se são manchadas ou não e o aspecto das células, dentre outros (**Figura 2**).

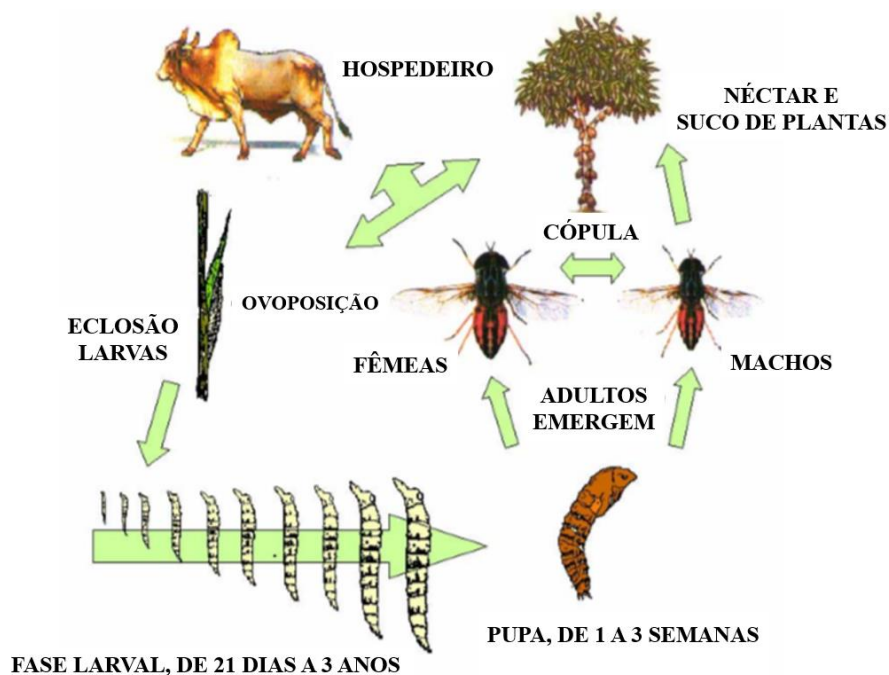
Figura 2 – Características anatômicas de tabanídeo - *Dichelacera (D.) alcicornis*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

As fêmeas colocam cerca de 100 a 800 ovos em uma massa, estes podem levar até 21 dias para eclodir, dependendo da espécie e das condições climáticas, quando umidade e temperatura são altas estes eclodem mais rapidamente (CHVÀLA *et al.*, 1972; MULLENS, 2002) (**Figura 3**). As larvas de tabanídeos podem ser encontradas em uma grande variedade de biomas e condições, adaptando-se facilmente a diversas condições e também podem ser excelentes predadoras e canibais. As larvas podem hibernar por até 2 ou 3 meses em temperaturas mais baixas. Espécies de clima temperado podem levar até 3 anos como larvas. Podem ocorrer 1 ou 2 gerações por ano, porém, em climas tropicais podem ocorrer até 3 gerações. Os machos, holópticos, emergem antes das fêmeas, dicópticos, e geralmente a relação macho/fêmea é de 1:1. A longevidade dos adultos é de cerca de 3 semanas a 2 meses (CHVÀLA *et al.*, 1972). As fêmeas e machos alimentam-se de suco de plantas para obter energia para o voo e a cópula. O macho ainda utiliza como alimento fezes de afídeos (pulgões, ordem Hemiptera). Em seguida, as fêmeas fazem o repasto sanguíneo e depois de 11 dias ocorre a oviposição, exceto àquelas não hematófagas (*Pangonius* sp.) e aquelas hematófagas autógenas (*Tabanus nigrovittatus*) (MULLENS, 2002; BOWMAN, 2006).

Figura 3 – Ciclo biológico geral dos tabanídeos.



Fonte: Adaptado de Desquesnes (2004).

O aparelho bucal do tipo picador-sugador é curto, largo e robusto, e possui mandíbulas em forma de lâminas afiadas e lacínias com dentes na extremidade, que ao perfurarem a pele do hospedeiro, com movimentos de tesoura, causam forte dor. Os lóbulos labelares são grandes, dotados de canais esclerotizados que servem para distribuir a saliva, mas que podem armazenar e manter durante algum tempo, coleção de sangue na qual se encontram os agentes etiológicos (KRENN e ASPÖCK, 2012).

São consideradas moscas voadoras poderosas. As asas possuem a nervura R2+3 não ramificada e apresentam cinco células posteriores (BORROR e DELONG, 1969). São os maiores dípteros sugadores de sangue, chegando a 2,5cm, corpo robusto e alguns com probóscida bem desenvolvida. As fêmeas procuram vários hospedeiros para se alimentarem, especialmente mamíferos, eles atacam os seres humanos (*Chrysops* e *Haematopota*), animais domésticos e silvestres, entre primatas, equinos, bovinos, roedores, jacarés, cobras, tartarugas e aves, especialmente durante as estações mais secas (KRINSKY, 1976; PECHUMAN e TESKEY, 1981; FOIL, 1989; HENRIQUES *et al.*, 2000; MARCONDES, 2001; FERREIRA *et al.*, 2002; MULLENS, 2002; TURCATEL *et al.*, 2007).

A população máxima destes dípteros é altamente sazonal e em climas temperados ocorre no verão, em geral, nos meses mais quentes, já nos climas tropicais o pico populacional e de atividade ocorre na época das chuvas (OKIWELU, 1975; BARROS, 2001).

Estes dípteros robustos se dispersam por muitos quilômetros além dos seus criadouros e são mais ativos durante os dias quentes e ensolarados. As fêmeas, hematófagas, localizam a presa, principalmente pela visão (URQUHART, 1998). Quando picam são capazes de ingerir até 0,5mL de sangue por hospedeiro, sendo mais sangue perdido por causa do escoamento pós-picada, o que gera reações como nódulos dérmicos que podem servir como alimentação secundária ou para oviposição de outras moscas, como as causadoras de míases (KROLOW *et al.*, 2007).

Devido às insistentes e irritantes picadas e pela veiculação de agentes patógenos, estes vetores são de grande interesse médico e veterinário, pois além de estarem (MARCONDES, 2001) distribuídos em todo o mundo e são importantes vetores mecânicos de vírus (por exemplo anemia infecciosa dos equídeos, uma das mais importantes doenças virais de equinos), bactérias, protozoários e helmintos causadores de doenças em animais selvagens e domésticos (KRINSKY, 1976; FOIL, 1989). Eles também poderiam estar implicados na transmissão aos seres humanos de *Anaplasma* spp. (DE LA FUENTE *et al.*, 2005).

Os cavalos são hospedeiros altamente atraentes para tabanídeos e são os animais mais afetados. Sua atratividade, provavelmente, se dê em função do tamanho e cheiro destes animais. Além disso, equinos têm uma pele mais fina que bovinos. Um cavalo no meio do gado atrai mais moscas do que o último, no entanto, o gado também é sensível aos efeitos nocivos dos tabanídeos. O significado econômico deste último é a principal razão do interesse que tem sido causado por esses insetos (DESQUESNES, 2004).

A Tripanossomíase equina e bovina que ocorre no Sul do Brasil tem seu agente transmitido possivelmente por tabanídeos (SILVA *et al.*, 2007). Apesar do aumento de casos de "Mal das Cadeiras" causada por *T. evansi* no Sul do Brasil, estudos têm sido pouco realizados nesta região para entender a ecologia dos tabanídeos. A maioria deles sobre taxonomia (KROLOW *et al.*, 2007; TURCATEL *et al.*, 2007).

No Brasil, a maioria dos estudos foram conduzidos no Pantanal (BARROS, 2001; KOLLE *et al.*, 2002) e Amazônia (FERREIRA *et al.*, 2002), sendo que nenhum investiga moléculas com potencial farmacológico, o que seria bastante importante para o possível desenvolvimento de medicamentos com uso mais seguro e eficaz.

A dimensão da biodiversidade brasileira, que está estimada ser entre 15 e 25% da biodiversidade mundial, e os crescentes desafios relacionados ao incremento da perda desta biodiversidade, discutidos no âmbito da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica, demandam um esforço agregado de grande porte para enfrentar os desafios científicos relacionados ao tema no Brasil. Estima-se existir em nosso país pelo menos dois

milhões de espécies distintas, enquanto são conhecidas cerca de duzentas mil, ou seja, conhecemos apenas 10% das espécies que possuímos (CNPq, 2010), há uma necessidade premente de pesquisar toda essa biodiversidade.

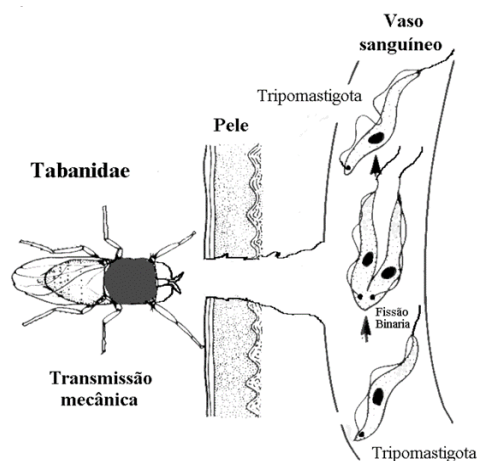
O Brasil está entre os maiores produtores e exportadores de leite bovino e carne do mundo (IBGE, 2015), também possui o maior rebanho de equídeos na América Latina e o terceiro do mundo, totalizando 8 milhões de cabeças e agregando cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MACHADO, 2017).

Dentre os artrópodos hematófagos, os tabanídeos têm sido negligenciados, por muito tempo, como vetores de agentes de enfermidades, tanto humanas como animais (BALDACCHINO *et al.*, 2014).

2.3 Tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos são distribuídos em duas seções: *Salivaria* - transmitidos através de picadas, por vetores biológicos (**Figura 4**); e *Stercoraria* – transmitidos através da contaminação da pele ou das mucosas do hospedeiro pelas fezes do vetor (HOARE, 1972). A maioria dos tripanossomatídeos da seção estercorária não são patogênicos, com exceção do *T. cruzi* (DE SOUZA *et al.*, 2010). Os tripanossomatídeos da seção *Salivaria* são considerados altamente patogênicos e estão distribuídos em três subgêneros de importância veterinária: *Nannomonas* (*T. congolense*), *Duttonella* (*T. vivax*) e *Trypanozoon* (*T. brucei* subsp. *brucei*, *T. equiperdum* e *T. evansi*) (DESQUESNES *et al.*, 2013).

Figura 4 – Ciclo de transmissão do *T. evansi* e *T. vivax*. Multiplicação na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado. Transmissão mecânica por vetor.



Estruturalmente, os tripanossomas são compostos por flagelo; corpo basal ou blefaroplasto, local onde se insere o flagelo; núcleo com cromatina; retículo endoplasmático; complexo de Golgi; cinetoplasto; mitocôndria, representada por um longo tubo que vai desde a porção anterior até a posterior; corda paraxial; microtúbulos; ribossomos; e membrana ondulante, constituída por uma série de pregas que são esticadas pelo movimento do flagelo (HOARE, 1972; BORST *et al.*, 1987). O cinetoplasto é uma malha de DNA localizada em uma dilatação da mitocôndria. Essa estrutura é envolvida por uma cápsula que recobre um grupo de fibrilas eletrodensas que contém DNA (kDNA) (HOARE, 1972).

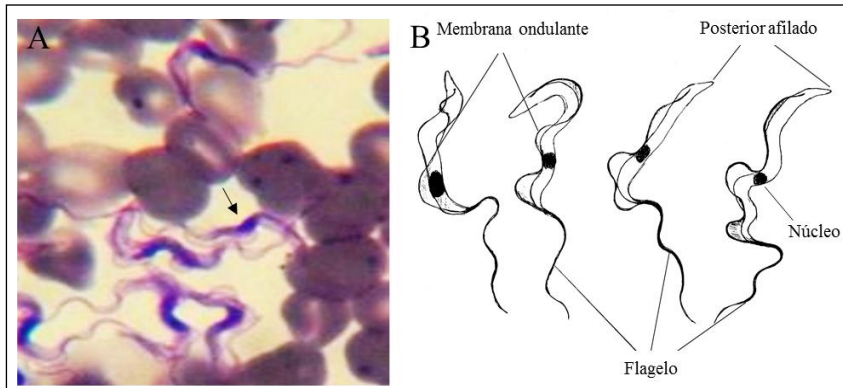
Os tripanosomas podem passar por vários estágios de desenvolvimento em seu ciclo digenético (HOARE, 1972), sendo: Amastigota: corpo arredondado, sem flagelo livre; Promastigota: corpo alongado, com flagelo na extremidade anterior; Epimastigota: cinetossomo é próximo e anterior ao núcleo e o flagelo sai livremente, não havendo membrana ondulante; Tripomastigota: o tripanosoma em sua forma clássica, infectiva.

A multiplicação dos tripanossomas do subgênero *Trypanozoon* ocorre por divisão binária, que é iniciada pela bipartição do cinetoplasto, seguido pelo desenvolvimento de um novo flagelo próximo à porção posterior do cinetoplasto. O novo flagelo cresce gradual e paralelamente ao antigo; ao mesmo tempo, o núcleo divide-se em dois, e finalmente quando os dois flagelos tiverem o mesmo tamanho, o citoplasma iniciará a divisão começando pela extremidade anterior do corpo (HOARE, 1972; MISRA *et al.*, 2016).

2.4 *Trypanosoma evansi*

T. evansi, possivelmente tem origem na África (DESQUESNES *et al.*, 2013), é monomórfico, encontrado apenas na forma tripomastigota, com tamanho que varia de 15 a 33µm, cinetoplasto pequeno 0,6µm com forma de bastonete e geralmente ocupa a porção subterminal ou marginal do corpo. Nas cepas brasileiras o cinetoplasto está ausente, tanto em isolados de animais domésticos quanto nos animais selvagens (VENTURA *et al.*, 2002)(**Figura 5**). Este protozoário tem ciclo direto, não há uma fase de desenvolvimento em hospedeiros intermediários, uma vez que, possivelmente durante o processo evolutivo perdeu o maxicículo do DNA cinetoplástico mitocondrial (cinetoplasto), e tornou-se incapaz de prosseguir com a multiplicação (LAI *et al.*, 2008; AUTY *et al.*, 2015). Desta forma, *T. evansi* apresenta apenas a forma tripomastigota, encontrada no sangue de vertebrados e é transmitido de forma acíclica por meio de vetores mecânicos, sendo carregado na probóscide após o repasto sanguíneo por insetos hematófagos (SPICKLER, 2009; DESQUESNES *et al.*, 2013).

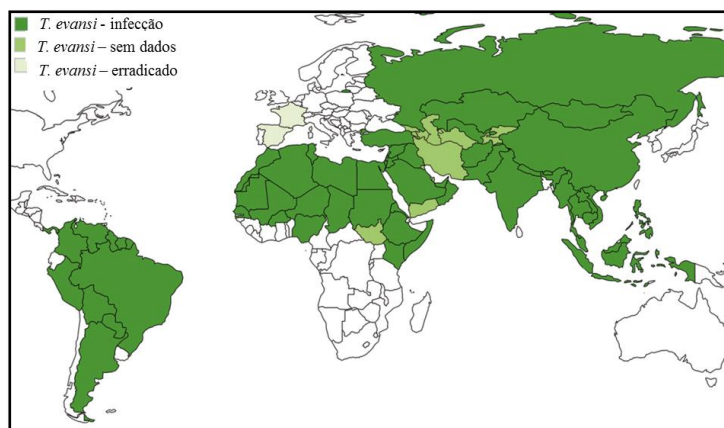
Figura 5 - Morfologia do *T. evansi*. (A) *T. evansi* (seta) em esfregaço sanguíneo de camundongo experimentalmente infectado. Coloração de Romanowsky. Aumento de 100x. (B) Desenho esquemático *T. evansi* encontrado no sangue de equinos, Pantanal, Brasil. Em (A) e (B) não observa-se cinetoplasto.



Fonte: Adaptado de Reck (2017).

Atualmente, *T. evansi* está amplamente distribuído na África, Ásia, América Latina, algumas regiões da Europa, Oriente Médio e Oceania (**Figura 6**), tanto no ciclo silvestre quanto doméstico, acometendo diferentes espécies animais e apresentando diferentes taxas de prevalência, de acordo com a área geográfica (SPICKLER, 2009; DESQUESNES *et al.*, 2013).

Figura 6 – Distribuição da infecção por *T. evansi* no mundo, considerando a presença da infecção com doença clínica (verde escuro), presença da infecção sem dados epidemiológicos (verde claro) e presença de surtos seguido da erradicação (cinza).



Fonte: Adaptado de Auty *et al.* (2015).

2.5 *Trypanosoma vivax*

T. vivax é um protozoário flagelado, pertencente à família Trypanosomatidae, e responsável pela tripanossomose, principalmente, em bovinos e outros ruminantes da América do Sul podendo afetar a saúde animal e produtividade levando à diminuição da produção, retardo no crescimento, aborto, infertilidade e mortalidade de animais adultos (HOARE, 1972; CUGLOVICI *et al.*, 2010).

O cinetoplasto de *T. vivax* é grande, isso é uma característica diagnóstica importante, pois facilita a identificação em esfregaços de sangue. O comprimento do corpo varia de 18µm a 31µm (incluindo o flagelo livre de 3 a 6µm de comprimento), com comprimentos médios variando de 21µm a 25,4µm. A maioria dos tripanossomas desta espécie (90%) varia de 20µm a 26µm de comprimento. As medidas tomadas em vários isolados do protozoário na América do Sul mostraram que eles estavam morfologicamente mais próximos da forma esbelta da África Ocidental do que dos isolados mais robustos encontrados nas regiões orientais do continente (HOARE, 1972).

Na América do Sul, *T. vivax* é enzoótico e apresenta constantes variações em sua população, espalhando-se por novas áreas (DESQUESNES *et al.*, 2009). No Brasil, estudos conduzidos com animais naturalmente infectados têm demonstrado que *T. vivax*, na maioria das vezes, causa infecção crônica e assintomática em bovinos, búfalos e ovelhas, o que dificulta seu diagnóstico na maioria dos rebanhos (BATISTA *et al.*, 2007).

A transmissão desses hemoparasitas nas Américas ocorre mecanicamente pela picada de dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus* spp. e *Stomoxys* spp., que inoculam as formas tripomastigostas presentes em seu aparelho bucal, e por via iatrogênica, por meio de agulhas contaminadas (GARDINER, 1989; FRANGE, 2013).

O curso da infecção por *T. vivax* depende de uma série de fatores, entre eles o hospedeiro, presença do vetor biológico ou mecânico e patogenicidade do inóculo (OSÓRIO *et al.*, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a tabanofauna na floresta ombrófila mista na região de Lages, hábitos alimentares, detectar a presença de *Trypanosoma evansi* e *T. vivax* no aparelho bucal de tabanídeos e determinar as principais proteínas e peptídeos presentes nas glândulas salivares das espécies de tabanídeos mais prevalentes da região.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar as espécies que buscam o repasto sanguíneo em equinos, seus hábitos alimentares e definir as mais abundantes.
- b) Detectar os protozoários *T. evansi* e *T. vivax* no aparelho bucal de tabanídeos pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).
- c) Determinar as principais proteínas e peptídeos presentes nas glândulas salivares de três espécies de tabanídeos *Dichelacera (D.) alcicornis*, *D. (D.) januarii* e *Fidena nigripes* da região de Lages, SC, conforme estudo anterior da mesma equipe de pesquisadores.

4 REFERÊNCIAS

AROCHA-PIÑANGO, C. L.; *et al.* Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism. **Blood Coag. and Fibrinolysis.**, v. 10, p. 43-68, 1999.

AUTY, H.; *et al.* Cattle trypanosomosis: the diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control. **Rev. Sci. Tech.**, v. 34, n. 2, p. 587-98, Aug 2015. ISSN 0253-1933 (Print) 0253-1933 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601459>.

BALDACCHINO, F.; *et al.* Tabanids: neglected subjects of research, but important vectors of disease agentes. **Infect. Genet. Evol.**, n. 28, p. 596-615, 2014.

BARROS, A. T. M. Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Díptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 917-923, 2001.

BATISTA, J. S.; *et al.* Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet. Parasitol.**, n. 143, v. 2, p. 174-181. 2007.

BORROR, D. J.; DELONG, D. M. **Introdução ao Estudo dos Insetos**. Programa de Publicações Didáticas-USAID, Rio de Janeiro, BR, 1969. 655 p.

BORST, P.; FASE-FOWLER, F.; GIBSON, W. C. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 23, n. 1, p. 31-8, Feb 1987. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851 (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3033499.

BOWMAN, A. S.; *et al.* Tick saliva: recente advances and implications for vector competence. **Med. and Vet. Entomol.**, v. 11, p. 277-285, 1997.

BOWMAN, D. D. **Parasitologia veterinária de Georgis**. 8. ed. Barueri, SP: Manole, 2006. 422 p.

BUZZI, Z. J. **Entomologia Didática**. 4 ed. Curitiba: Ed. UFPR, 2002. 348 p.

CAPPELLO, M.; *et al.* Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, n. 5, p. 475-480, 1996.

CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Paraná: UFPR, 1991, 228p.

CHAPMAN, R. F. Mechanics of food handling by chewing insects. In: Chapman R. F., de Boer G. (Eds.). **Regulatory mechanisms in insect feeding** (pp. 3–31). London: Chapman and Hall, 1995.

CHARLAB, R.; *et al.* Towards an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 15.155-15.160, 1999.

CHVÀLA, M.; LYNEBORG, L.; MOUCHA, J. The horse flies of Europe (Diptera: Tabanidae). **Entomological Society of Copenhagen**, Copenhagen. 1972.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq. **Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade - SISBIOTA Brasil**. (Edital MCT/CNPq/MMA/MEC/CAPES/FNDCT – Ação Transversal/FAPs Nº 47/2010). Disponível em: <http://www.cnpq.br/editais/ct/2010/047.htm>. Acesso em 10 out. 2016, 16:43:33.

COSCARÓN, S.; PHILIP, C. B., A revision of Mycteromyiini (genus *Mycteromyia* of authors), a new tribe of neotropical horse flies (Diptera: Tabanidae). **Proc. Calif. Acad. Sci.**, n. 41, p. 427-452, 1979.

CUGLOVICI, D. A.; *et al.* Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, n. 169, p. 320-326, 2010.

DE LA FUENTE, J.; *et al.* Potencial vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, p. 390-399, 2005.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int. J. Cell. Biol.**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-8884 (Electronic) 1687-8876 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486>.

DESQUESNES, M. **Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America**. OIE (World organisation for animal health), 2004. 143 p.

DESQUESNES, M.; *et al.* Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. **Int. J. Parasitol.**, n. 39, v. 3, p. 333-346, 2009.

DESQUESNES, M.; *et al.* *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p. 194176, 2013b. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024184>.

FERREIRA, R. L. M.; HENRIQUES, A. L.; RAFAEL, J. A. Activity of tabanids (Insecta: Diptera: Tabanidae) attacking the reptiles *Caiman crocodilus* (Linn.) (Alligatoridae) and *Eunectes murinus* (Linn.) (Boidae), in the Central Amazon, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 133-136, 2002.

FOIL, L. D. Tabanids as vectors of disease agents. **Parasitol. Today**, v. 5, p. 88-96, 1989.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Ícone, 2004.

FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J. M. Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 38, n. 50, p. 16.678-16.685, 1999.

FRANGE, R. C. C. **Tripanosomose em vacas da microrregião de Uberaba-MG: Estudo soropidemiológico e relato de surto**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Uberaba, Uberaba. 2013.

GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Adv. Parasitol.**, n. 28, p. 229-317, 1989.

GASPAR, A. R.; *et al.* Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Exper. and Applied Acar.**, v. 20, n. 10, p. 583-598, 1996.

GORDON, R. M.; CREWE, W. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse-flies obtain their blood-meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host; together with some observations on the feeding of *Chrysops* and *Cimex*. **Annals of Trop. Med. and Parasitol.**, v. 42, n. 3/4, p. 334-56, 1948.

HAWKINS, R. I. Factors affecting blood clotting from salivary glands and crop of *Glossina austeni*. **Nature**, v. 212, p. 738-739, 1966.

HELLMANN, K.; HAWKINS, R. I. Action of tick extracts on blood coagulation and fibrinolysis. **Throm. et Diath. Haemorrh.**, v. 18, n. 4, p. 617-623, 1967.

HELLMANN, K.; HAWKINS, R. I. Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus* Stal. **Nature**, v. 201, n. 492, p. 1008-1009, 1964.

HELLMANN, K.; HAWKINS, R. I. Prolixins-S and prolixin-G, two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stal. **Nature**, v. 207, n. 994, p. 265-267, 1965.

HENRIQUES, A. L.; *et al.* *Betrequia ocellata* Oldroyd (Diptera, Tabanidae, Rhinomyzini) blood feeding in *Cayman crocodillus* (Linnaeus) (Crocodylia, Alligatoridae) in Manaus, Brazil. **Rev. Bras. de Zoo.**, Curitiba, v. 17, n. 3, p. 609-613, 2000.

HOARE, C. A. **The Trypanosomoses of mammals**. Oxford: Blackwell, 1972. 749 p.

HOFFMANN, A.; *et al.* Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. **Die Pharmazie**, v. 46, n. 3, p. 209-212, 1991.

IBRAHIM, M. A.; GHAZY, A. H.; KHALIL, M. I. The embryos of the camel tick *Hyalomma dromedarii* contain a potent peptide inhibitor of both thrombin and FXa. **Jour. of The Egyptian-German Soci. of Zoo.**, v. 32, p. 99-114, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária**. 2015. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em fevereiro 2013.

KOLLE W. W.; BARROS A. T. M.; GOMES, A. Sazonalidade de tabanídeos (Diptera, Tabanidae) em área de transição entre o cerrado e o Pantanal, no Matogrosso do Sul, Brasil. **In Programas e Resumos do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro, Colégio Brasileiro de parasitologia Veterinária, 2002.

KRENN, H. W.; H. ASPÖCK. Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropod. **Arth. Struc. & Devel.**, Tucson, v. 4, p. 101-118, 2012.

KRINSKY, W. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). **Jour. of Med. Entom.**, Lanhan, v. 3, p. 225-275, 1976.

KROLOW, T. K.; KRÜGER, R. F.; RIBEIRO, P. B. Illustrated key for Tabanidae (Insecta: Diptera) genera of Campos Sulinos biome, Rio Grande do Sul, Brazil. **Biota Neotrop.**, v. 7, p. 253-264, 2007.

LAI, D. H.; *et al.* Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 105, n. 6, p. 1999-2004, Feb 12 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245376>.

LEHANE, M. J. **The Biology of Blood-Sucking in Insects**. Cambridge University Press, p. 9–321, 2005.

LESSARD, B. D.; *et al.* The Evolution and biogeography of the austral horse fly tribe Scionini (Diptera: Tabanidae: Pangoniinae) inferred from multiple mitochondrial and nuclear genes. **Mol. Phylogenet. Evol.**, n. 68, p. 516-540, 2013.

MACHADO, E. S. **Sanidade Equídea**. 2017.

MACHADO, P. A. O homem e os insetos, passado, presente, futuro. **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 474-479, 1987.

MANT, M. J.; PARKER, K. R. Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in in vitro platelet aggregation. **Brit. Jour. of Haemat.**, v. 48, n. 4, p. 601-608, 1981.

MARCONDES, C. B. **Entomologia: Médica e Veterinária**. Atheneu. 2001.

MARKWARDT, F. Coagulation inhibitors from blood-sucking animals. A new line of developing antithrombotic drugs. **Die Pharmazie**, v. 49, n. 5, p. 313-316, 1994.

MARTINS, K. A. **Comportamento alimentar de dípteros vetores de patógenos e estudo da expressão de proteínas de choque térmico (HSP 70 e 90) de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Phlebotominae) frente a diferentes estresses relacionados à hematofagia**. 2015. 103f. Tese (Doutorado em parasitologia) Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

MISRA, K. K.; ROY, S.; CHOUDHURY, A. Biology of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* in experimental heterologous mammalian hosts. **J. Parasit. Dis.**, v. 40, n. 3, p. 1047-61, Sep 2016. ISSN 0971-7196 (Print) 0971-7196 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27605836>.

MULLENS, B. A. Horse flies and deer flies (Tabanidae). In: MULLEN, G., DURDEN, L. (EDs.). **Med. and Vet. Entomol.**, Academic Press, San Diego, p. 263-277, 2002.

NEVES, D. P.; *et al.* **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. 524p.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; *et al.* Triabin a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **Jour. Biol. Chemistry**, v. 270, n. 48, p. 28.629-28.634, 1995.

OKIWELU, S. N. Seasonal distribution and variations in diurnal activity of Tabanidae in the Republic of Zambia. **Mosq. News**, n. 35, p. 551-554, 1975.

OSÓRIO, A. L. A. R.; *et al.* *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n. 103, v. 1, p. 1-13, 2008.

PECHUMAN, L. L.; TESKEY, H. J. Tabanidae. In: **Manual of Nearctic Diptera** (J. F. McAlpine *et al.* ed.). Research Branch Agriculture Canada, Ottawa, p. 464-478, 1981.

RECK, C. **Padronização de um antígeno tamponado para pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma evansi* em bovinos e equinos**. 2017. 60f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 350p.

RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infec. Agents Dis.**, v. 4, p. 143-152, 1995.

RIBEIRO, J. M. C.; *et al.* A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Science**, v. 243, p. 212-214, 1989.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 32, p. 463-478, 1987.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Platelet-activating-factorhydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Jour. of Exper. Biology**, v. 204, n. 22, p. 3887-3894, 2001.

ROSKOV, Y.; *et al.* Species 2000 & ITIS Catalogue of life, 10th December 2013. Species 2000, **Naturalis**, Leiden, The Netherlands. 2013.

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 95, p. 755-771, 2001.

SILVA, A.S.; *et al.* Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira-SC, Brasil. **Acta Sci. Vet.**, v. 35, p. 373-376, 2007.

SILVA, F. S. A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos. **Rev. Tróp. – Ciên. Agrá. e Bio.**, v. 3, n. 3, p. 4, 2009.

SILVA, R. A. M. S.; *et al.* *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: **Biologia, Diagnóstico e Controle**. Embrapa Pantanal, n. 140, 2002.

SPICKLER, A. R. **Surra (Last Updated)**. 2009.

STARK, K. R.; JAMES, A. A. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Exp. Parasitol.**, v. 81, n. 3, p. 321-331, 1995.

STARK, K. R.; JAMES, A. A. Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Jour. of Med. Entom.**, v. 33, n. 4, p. 645-650, 1996.

TURCATEL, M.; CARVALHO, C. J. B.; RAFAEL, J. A. Horse flies (Diptera: Tabanidae) of Paraná State, Brazil: pictorial identification key for subfamilies, tribes and genera. **Biota Neotrop.**, v. 7, p. 265-278, 2007.

TUSZYNSKI G. P.; GASIC, T. B.; GASIC, G. J. Isolation and characterization of antistasin. An inhibitor of metastasis and coagulation. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 20, p. 9718-9723, 1987.

URQUHART, G. M.; *et al.* **Parasitologia Veterinária**. Guanabara Koogan. 1998.

VALENZUELA, J. G.; FRANCISCHETTI, I. M.; RIBEIRO, J. M. Purification cloning and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. **Biochemistry**, v. 38, n. 34, p. 11.209-11.215, 1999.

VALENZUELA, J. G.; GUIMARAES, J. A.; RIBEIRO, J. M. A novel inhibitor of factor X activation from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. **Exp. Parasitol.**, v. 83, n. 2, p. 184-190, 1996.

VENTURA, R. M.; *et al.* Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, n. 1, p. 53-63, Jan 2002. ISSN 0020-7519 (Print) (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796122>.

ZAVALOVA, L. L.; BASANOVA, A. V.; BASKOVA, I. P. Fibrinogenfibrin system regulators from bloodsuckers. **Biochemistry**, v. 67, p. 135-142, 2002.

ZHANG, D.; CUPP, M. S.; CUPP, E. W. Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. **Ins. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 3, p. 321-330, 2002.

ZHU, K.; *et al.* Identification and characterization of anticoagulant activities in the saliva of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). **J. Parasitol.**, v. 83, p. 38-43, 1997a.

ZHU, K.; *et al.* Isolation and characterization of americanin a specific inhibitor of thrombin from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). **Exp. Parasitol.**, v. 87, p. 30-38, 1997b.

5 CAPÍTULO I – MANUSCRITO I

PESQUISA DE *Trypanosoma evansi* E *T. vivax* EM TABANÍDEOS, DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA NA REGIÃO DE LAGES, SC.

Trypanosoma evansi and *T. vivax* in tabanids, of the mixed ombrophilian forest in the Lages region, SC.

Carlos José Raupp Ramos^{1,2}; Luiz Claudio Mileti^{1*}; Luiz Flavio Nepomuceno do Nascimento¹; Gabriela Bassi das Neves¹.

¹ Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC). Av. Luís de Camões, 2090, Lages, SC, Brasil.

*Autor para correspondência: luiz.miletti@udesc.br.

² UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Laranjeiras do Sul – PR.

RESUMO

Tabanídeos são insetos onde somente a fêmea é hematófaga, além do incômodo provocado por sua picada, em animais de produção, companhia e humanos, podem também vetorar agentes patogênicos importantes, como os tripanossomatídeos. Desta forma, foi feito um estudo para verificar a presença de *Trypanosoma evansi* e *T. vivax* no aparelho bucal destes insetos, além de levantamento populacional e estudo de preferência anatômica para repasto. Foram capturados, semanalmente, na região de Lages-SC, Tabanídeos (Diptera, Tabanidae). As capturas com usando um equino de coloração escura como isca, ocorreram durante três horas. Os exemplares capturados foram armazenados conforme localização do repasto, no dispositivo SECTAB, foi procedida a identificação taxonômica, coleta de dados meteorológicos, os aparelhos bucais foram dissecados e armazenados em TNE. O número de espécies de tabanídeos variou de zero no outono/inverno a sete no verão (dezembro a fevereiro). *Dichelacera (D.) alcicornis* Wied. (276) foi a espécie mais abundante seguida de *Chrysops fuscipex* Lutz (94) e *C. patricia* Pechuman (56). As capturas de pico ocorreram durante o verão (dezembro a fevereiro). O comportamento de pouso para repasto sanguíneo variou de acordo com os gêneros e espécies: *Chrysops* sp. (98,93%) preferiu a cabeça, *Fidena nigipes* (100%) tórax e abdomen, já *Dichelacera* sp. (73,91%), *Poeciloderas* sp. (95,65%), *Acanthocera kroeberi* (100%) os membros. No material do aparelho bucal foi extraído DNA e PCR para detecção de *T. evansi* e *T. vivax* usando *primers* específicos. No aparelho bucal de *Dichelacera (D.) alcicornis* e *Dichelacera (D.) januarii* foi encontrado DNA de *T. evansi*.

Palavras chave: Tabanídeos, vetores, transmissão, PCR, *Trypanosoma evansi*.

5.1 INTRODUÇÃO

Membros da família Tabanidae tem grande interesse médico e veterinário, devido às insistentes e irritantes picadas e por serem capazes de transmitir cerca de 35 agentes patogênicos incluindo vírus, bactérias, helmintos e protozoários, como *Trypanosoma* (KRINSKY, 1976; FOIL, 1989 e MARCONDES, 2001). Os tabanídeos são moscas cosmopolitas conhecidas vulgarmente no Brasil como mutucas ou butucas (TURCATEL *et al.*, 2007). Estes insetos são classificados no filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Brachycera e família Tabanidae, compreendendo aproximadamente 4290 espécies (FORTES, 2004; FERREIRA e RAFAEL, 2006).

A abundância, variedade e dispersão dos tabanídeos ao redor do mundo é surpreendente. Algumas espécies foram descobertas recentemente, como por exemplo, sete novas espécies do gênero *Scapatia* spp., na Austrália (LESSARD e YEATES, 2012) e *Pangonius theodori*, na região que abrange norte de Israel e sul do Líbano (ZEEGERS *et al.*, 2013). No Brasil, a maior parte dos poucos trabalhos já publicados sobre tabanídeos é proveniente de estudos no Pantanal e Amazônia, onde o foco compreende a identificação de novas espécies e relacionamento com a sazonalidade (BARROS, 2001; FERREIRA *et al.*, 2002; KOLLE *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2007) sem, no entanto, aprofundarem-se usando ferramentas moleculares de identificação e bioprospecção. Estudos mais recentes, de 2012, relatam a descrição de espécies de tabanídeos na região amazônica brasileira, como *Protosilvius gurupi*, *Eutabanus pictus* e *Myiotabanus amazonicus* (RAFAEL *et al.*, 2012; KROLOW *et al.*, 2012). Apesar de novas espécies estarem sendo descobertas, quando se avalia a situação do conhecimento da biodiversidade em tabanídeos no Brasil, observa-se que não há muitos estudos e raros são os pesquisadores que se dedicam a esta área de conhecimento.

No Sul do Brasil, há poucos estudos abordando tabanídeos (KROLOW *et al.*, 2007; TURCATEL *et al.*, 2007). Marcondes (2001) afirma que no litoral do Paraná, e também de São Paulo, *Dichelacera alcicornis* e *Diachlorus bivittatus* são muito comuns e irritantes entre novembro e janeiro, sendo inclusive prejudiciais ao turismo. Na mesorregião do planalto serrano catarinense, foi realizado um projeto de identificação de tabanídeos, no qual o grupo do Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores (LABHEV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) em conjunto com o grupo do Museu Paraense Emílio Goeldi, de Belém, identificaram membros da família Tabanidae, e relataram três espécies que nunca haviam sido relatadas em Santa Catarina e que nunca haviam sido descritas no sul do Brasil

(MILETTI *et al.*, 2011). As espécies de tabanídeos foram identificadas nesse trabalho publicado por Miletti *et al.* (2011) para poderem ser correlacionadas como vetores potenciais de *T. evansi*, o principal organismo estudado no LABHEV da UDESC.

Alguns dos principais parasitos transmitidos por estes insetos são os tripanossomatídeos, protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Dentre os potencialmente transmitidos por tabanídeos, estão as espécies *Trypanosoma evansi* e *T. vivax*, ambas patogênicas e de importância para a pecuária brasileira; *T. evansi* é mais comum em equinos e *T. vivax* em bovinos (SILVA *et al.*, 1998; SEIDL *et al.*, 1999).

As tripanossomoses são enfermidades mundialmente importantes para o homem e para animais, pois podem diminuir consideravelmente os níveis de produção. Equinos acometidos por tripanossomose cujo agente causal é *T. evansi* apresentam sintomas de uma enfermidade popularmente conhecida por surra, derrengadera, peste quebra-bunda ou mal das cadeiras, que cursa com distúrbios hematopoiéticos, circulatórios e nervosos, com sinais clínicos como: febre, emaciação, anemia, edemas de região ventral do abdômen e genitais nos casos agudos, que também podem ocorrer em qualquer espécie animal (RODRIGUES, *et al.*, 2005). Nos casos crônicos, em equinos, pode ocorrer paralisia progressiva dos membros posteriores. Outras espécies domésticas podem ser infectadas servindo como reservatórios, bovinos, bubalinos e suínos, porém nestes, a doença é rara (FOIL, 1989; URQUHART, 1998; FORTES, 2004). Equinos são animais usados, ainda, como tração, especialmente por populações mais pobres, que deslocam-se em vários pontos de uma mesma região e até entre regiões, por isso, são ideais como sentinelas de agentes infecciosos e parasitários (FREITAS, 2007), representando naturalmente uma amostra dos vários pontos de uma região. A transmissão mecânica de *T. evansi* por tabanídeos vem sendo estudada mundialmente por muito tempo estando bem estabelecida (FOIL, 1989). Outras formas de transmissão são através de moscas da família Mucidae, por morcegos hematófagos, como *Desmodus rotundus*, transmissão iatrogênica, através de agulhas contaminadas com sangue infectado, e em carnívoros pode ocorrer a infecção por ingestão de carne de animais recentemente mortos (HERRERA, *et al.*, 2004). O protozoário encontra-se disseminado desde o norte da África, ocorrendo em partes da Ásia, América Central até a América do Sul (URQUHART, 1998; WOLF *et al.*, 2019), passando pelo sul da Argentina até o norte do Panamá onde *T. evansi* provoca infecções agudas em várias espécies animais (WELLS, 1984).

No ano de 2003, em uma região central do estado do Rio Grande do Sul, no Brasil, foi constatada a presença de *T. evansi* em equinos da raça crioula (CONRADO *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2005). Ainda, na mesma região, um cão sem raça definida, apresentou a

infecção por *T. evansi*, dado importante pois o animal é considerado um reservatório deste protozoário (COLPO *et al.*, 2005; FRANCISCATO *et al.*, 2007).

Os bovinos com tripanossomose causada por *T. vivax* na fase aguda, podem morrer em cinco semanas. Os sinais clínicos associados incluem febre, letargia, fraqueza, anemia, lacrimejamento, edema subcutâneo da cabeça, epistaxe, disenteria, abortamento sem encontro dos protozoários no líquido amniótico e sangue fetal, além de leve perda da condição física com perda de peso substancial em pouco tempo (LOSOS e IKEDE, 1972). Se o tratamento não for instituído, a doença evolui para a forma crônica, associada à parasitemia baixa, acarretando em morte do animal (GARDINER, 1989; URQUHART, 1998). A tripanossomose por *T. vivax* ocorre, principalmente, em bovinos e outros ruminantes da América do Sul podendo afetar a saúde animal e produtividade levando à diminuição da produção, retardo no crescimento, aborto, infertilidade e mortalidade de animais adultos (CUGLOVICI *et al.*, 2010; HOARE, 1972).

T. vivax é enzoótico na América do Sul e apresenta constantes variações em sua população, espalhando-se por áreas indenes (DESQUESNES *et al.*, 2009). No Brasil, estudos feitos com animais naturalmente infectados têm demonstrado que o *T. vivax*, na maioria das vezes, causa infecção crônica e assintomática em bovinos, búfalos e ovelhas, o que dificulta seu diagnóstico na maioria dos rebanhos (BATISTA *et al.*, 2007). No Maranhão no ano de 2015 em uma propriedade leiteira houve um surto de tripanossomose cujo diagnóstico clínico foi dificultado em função da semelhança com outras enfermidades presentes na região e possível associação de dois ou mais agentes patológicos no mesmo animal, o que ressalta a importância do diagnóstico adequado como forma de evitar a disseminação da enfermidade e reduzir maiores perdas econômicas (PEREIRA *et al.*, 2018). A recente dispersão e surtos cada vez mais frequentes do *T. vivax* no país causou impactos econômicos na produção que se devem ao amplo espectro de vetores e hospedeiros susceptíveis e à imunodeficiência dos animais, em sua maioria subnutrida (GARCÍA *et al.*, 2006; FIDELIS JUNIOR *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2017).

De acordo com a EMBRAPA (2002), doenças de animais continuam afetando a produção pecuária, o desenvolvimento agropecuário, o bem-estar humano e a luta contra a pobreza de diferentes maneiras em muitas regiões dos países em desenvolvimento. Algumas destas doenças afetam a população humana em regiões mais pobres, ocasionando mortes, incapacidade e sofrimento, impedindo que se vença a pobreza. Ainda, de acordo com estes autores, as tripanossomoses estão na lista das vinte doenças mais importantes de acordo com

seu impacto na pobreza. As tripanossomoses causadas por *T. vivax*, por exemplo, ocasionam cerca de três milhões de mortes de bovinos anualmente e tem um impacto significativo sobre a agricultura na África (região subsaariana) e em países endêmicos da América do Sul, levando às perdas na produção cerca de 1,2 bilhões dólares (OSÓRIO *et al.*, 2008).

O custo para controlar surtos de tripanossomoses é alto, bem como as consequências socioeconômicas, que podem ser diretas ou indiretas (FINELLE, 1974). As consequências diretas incluem mortalidade, retardo no crescimento, gastos no controle, custos de diagnóstico, tratamento dos animais, profilaxia e pesquisas sobre a enfermidade. Indiretamente, as tripanossomoses animais afetam a saúde humana em função da diminuição na produção de carne e leite, além da perda de animais de tração, afetando a agricultura, e a perda de reprodutores de raças exóticas, diretamente já foi descrito um caso humano de tripanossomose na Índia em 2005 (JOSHI *et al.*, 2005). Além disso, a economia da região fica afetada em função do déficit na produção de carne e leite, obrigando países ou regiões a importar estes produtos (FINELLE, 1974). Na África, as perdas estimadas pela tripanossomose, somente em bovinos chegam a 500 milhões de dólares anuais (RADOSTITIS *et al.*, 2000). Na sub-região pantaneira de Poconé, no ano de 1995, um surto de tripanossomose causado por *T. vivax*, causou um prejuízo estimado de 855 mil dólares, que, se extrapolado para toda região, poderia ter um custo de US\$ 160 milhões (SEIDL *et al.*, 1999).

Em Santa Catarina, são estimados 4.499,5 mil cabeças de bovinos, sendo 1,98% do total de bovinos do Brasil, alcançando uma produção leiteira anual de 3.113.769 toneladas em 2017 o que representa 9,3% da produção nacional. Em termos de carne bovina, em 2016 foram produzidas 91.526 toneladas de carcaça, que representa 1,2% da produção nacional. O número estimado do rebanho equino no estado em 2015 era de 118.342 cabeças, o que em termos nacionais representa 2,23% (EPAGRI, 2018; FIESC, 2015). Estes dados reforçam a importância da produção láctea e de carne no estado, o que demonstra a relevância em se conhecer e estabelecer a circulação dos agentes causadores de enfermidades e a presença destes em seus vetores, causas de impacto direto na economia regional.

A carência de trabalhos sobre tabanídeos e tripanossomas em nosso país, e, sobretudo na região Sul, faz com que se torne premente a realização de pesquisas neste sentido. Sabendo-se que com temperatura, pluviosidade e umidade elevadas o número de insetos hematófagos aumenta, quando o objetivo é averiguar também se nessas épocas de maior número de indivíduos ativos, existe a possibilidade de disseminação de agentes patógenos, importa averiguar as peças bucais, glândulas salivares ou tubo digestório dos insetos hematófagos, quanto à presença de patógenos (GUIMARÃES, 2015).

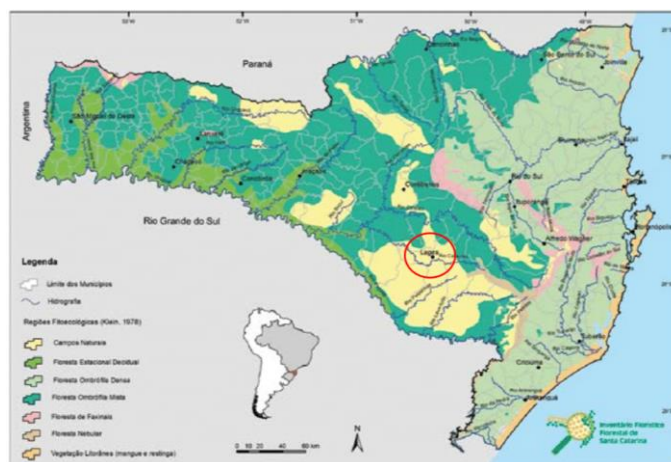
O presente estudo foi realizado na região de Lages, onde a produção leiteira é importante, especialmente para os pequenos produtores, representando um componente importante na geração de renda aos produtores locais, que, eventualmente, poderia ser colocada em risco frente a enfermidades como, por exemplo, a tripanossomose. Além de identificar a tabanofauna, definir as mais abundantes e analisar os hábitos alimentares, foi investigada a presença de protozoários das espécies *T. vivax* e *T. evansi* por PCR em aparelho bucal de três espécies de tabanídeos da região, *Dichelacera (D.) alcicornis*, *D. (D.) januarii* e *F. nigripes*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Descrição da região estudada

O presente estudo foi conduzido no município de Lages que possui uma área de 2.637,660 km², com aproximadamente 157.743 habitantes. Encontra-se situado no Planalto Serrano do estado de Santa Catarina, com altitude de 930m, latitude de 27°48'S e longitude de 50°20'O, possuindo como cenário natural superfície plana, ondulada e montanhas, com matas de Araucária, o que à caracteriza como floresta ombrófila mista (**Figura 1**), campos naturais, limpos, sujos e áreas de inundações (SANTA CATARINA, 2016). Quanto ao clima, este é temperado subtropical, com temperatura média de 16°C. Durante o inverno, o clima é frio, onde as temperaturas podem chegar a -4°C e sensação térmica de -10°C. Na região ocorrem fortes geadas e também queda de neve. Já no verão, o clima varia de agradável a quente, as temperaturas podem chegar a 30°C, podendo haver secas (CIDADE-BRASIL, 2019).

Figura 1 – Região de Lages SC, floresta ombrófila mista, local onde foi realizado estudo.

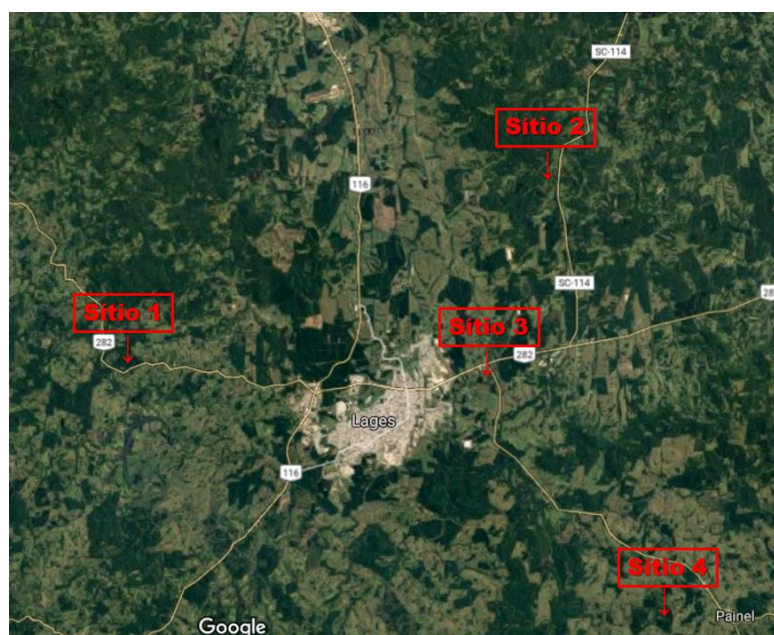


Fonte: Adaptado de mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina (KLEIN, 1978; VIBRANS *et al.*, 2013).

5.2.2 Coleta de amostras

No período de fevereiro de 2018 a fevereiro 2019 foram coletados, semanalmente, tabanídeos em quatro sítios (1, 2, 3 e 4) (**Figura 2**) distribuídas em pontos distintos da região, preferencialmente, que tivessem criação concomitante de bovinos e equinos.

Figura 2 – Locais de coleta de tabanídeos na região de Lages, SC.



Fonte: Adaptado de Google MAPS.

As coletas foram realizadas uma vez por semana em cada propriedade, sempre próximo a coleções de água, como açudes ou lagos e rios ou riachos com mata ciliar, ao término da quarta voltava-se a primeira e assim por diante. Duas propriedades eram frequentadas por capivaras (sítio 2 e sítio 3). Foram feitas 3 horas de coleta em cada propriedade, no intervalo das 15 às 18h., usando-se um equino de cada propriedade como isca, preferencialmente, animais mansos e de pelagem mais escura, que eram estimulados a suar a cada 30 minutos de coleta, através de galope. Também foi utilizado octenol embebido em chumaços de algodão e fixados com atlios nos arreios dos animais para atrair os insetos. A coleta foi feita com auxílio de um frasco de vidro, em seguida os insetos foram armazenados conforme localização do repasto (cabeça, membros, tórax e abdômen), no dispositivo SECTAB (CHRISTEN *et al.*, 2009), em seguida foram transportados ao LABHEV (Laboratório de Hemoparasitos e Vetores) do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC) e mortos em frascos mortíferos com clorofórmio. Em seguida procedeu-se a identificação, separação destes por espécie (escolhidas segundo as mais prevalentes na região de acordo com

Miletti *et al.*, (2011)), data da coleta e local. Na sequência, procedeu-se a retirada de aparelho bucal dos tabanídeos.

5.2.3 Identificação taxonômica dos tabanídeos

A identificação taxonômica foi feita segundo as chaves taxonômicas descritas por Fairchild (1969) e Barros e Gorayeb (1996). Em caso de dúvidas quanto às espécies, exemplares foram enviados para o Museu Goeldi em Belém-PA, para serem submetidos à avaliação pelo Dr. Inocência Gorayeb. Os espécimes coletados foram depositados no museu de entomologia da Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul/PR.

5.2.4 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos durante o período de execução, tais como temperatura, umidade, pluviosidade e comportamento dos ventos das regiões estudadas foram obtidos junto ao serviço disponível no estado, EPAGRI/CIRAM (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina).

5.2.5 Extração de DNA

Foram escolhidas as espécies mais prevalentes na região de Lages-SC para a retirada das peças bucais, dados obtidos segundo estudo prévio (MILETTI *et al.*, 2011) e também de acordo com o atual estudo. Os tabanídeos foram lavados duas vezes com solução de etanol a 70% e duas vezes em água destilada estéril. O aparelho bucal das espécies *Dichelacera (D.) alcicornis*, *D. (D.) januarii*, *Fidena nigripes*, *Chrysops patricia*, *C. fuscipex*, (**Figura 3**) foram retirados com o auxílio de lupa entomológica e tesoura pequena fina-fina esterilizada. Estas peças bucais foram armazenadas em “pool”, por espécie escolhida, separadas por datas de coleta, em microtubos de 1,5mL em TNE (Tris base 10mM, NaCl 200mM e EDTA 50mM) e congeladas a -8°C até a extração de DNA. Também foram retiradas as glândulas salivares destes insetos de acordo com o método de Takac *et al.* (2006), para análise molecular posterior.

Para extração de DNA, o “pool” das peças bucais foi colocado em microtubo de 1,5mL e maceradas com pistilo. Subseqüentemente, a amostra de DNA foi extraída uma vez com fenol,

pH 7,8, uma vez com fenol:clorofórmio [1:1] e uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico [24:1], respectivamente. Em seguida, o DNA foi precipitado com acetato de sódio, pH 6,0, e etanol absoluto e resuspenso em 50µL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) (Ventura *et al.*, 2001; Protozoologia UFSC: protocolos, 2010).

Figura 3 – Local de extração do aparelho bucal dos tabanídeos coletados, *Chrysops* spp.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

5.2.6 Detecção de DNA de *T. evansi* e *T. vivax* extraído das peças bucais dos tabanídeos

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação por meio PCR baseado em alguns protocolos previamente publicados (DÁVILA *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2013). Iniciadores para amplificação de espécies de *Trypanosoma* foram utilizados para excluir falso positivo, como os utilizados por Silva *et al.*, (2013) e Silveira *et al.*, (2013), para amplificação de *T. evansi* (primer *RoTat*, VSG, 1.2 F e 1.2 R com 205 pb) (CLAES *et al.*, 2004; ODENIRAM *et al.*, 2019) e *T. vivax* (primer *TviSL1* e *TviSL2* com 210 pb) (VENTURA *et al.*, 2001 adaptado por CUGLOVICI *et al.*, 2010). O acompanhamento da qualidade e da quantidade do DNA extraído foi avaliado com auxílio de nanodrop (NanoDrop™2000 Thermo Scientific Spectrophotometers, ThermoFisher®). A confirmação de amplificações e análises dos fragmentos amplificados, foram realizadas com eletroforese em gel de agarose 2%, a coloração do DNA com corante fluorescente, GelRed®, e documentação em sistema de fotodocumentação de géis.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Espécimes coletados

Foram coletados um total de 523 tabanídeos fêmeas no período de fevereiro de 2018 a fevereiro de 2019, sendo que as coletas efetivas, ou seja, as que resultaram em captura de algum indivíduo ocorreram nos meses de fevereiro, março, abril, novembro e dezembro de 2018 e janeiro e fevereiro de 2019. Nos demais meses não se evidenciou a presença de indivíduos, o que se traduz na ausência nas capturas (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Número de tabanídeos coletados usando-se isca equina durante os meses dos anos de 2018 e 2019, Lages/SC.

mês ano	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
2018	-	36	36	04	00	00	00	00	00	00	68	95
2019	160	124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: autor, 2019.

Os insetos foram capturados em quatro locais diferentes, Sítio 1 (4 exemplares), Sítio 2 (335 exemplares), Sítio 3 (42 exemplares) e Sítio 4 (143 exemplares).

Um total de 14 espécies e sete gêneros foram encontrados (**Tabela 2**), sendo que *Dichelacera (D.) alcicornis* foi a mais abundante, representando um total de 52,77% (276) das espécies capturadas, seguida por *Chrysops fuscipex* 17,97% (94) e *Chrysops patricia* 10,70% (56), resultado semelhante a estudos anteriores, como o de Bassi *et al.* (2000) que coletaram 785 exemplares sendo 29% (227) da espécie *Dichelacera (D.) alcicornis* e de Miletto *et al.*, (2011) que de um total de 915 tabanídeos coletados 62,1% (568) foi da espécie *Dichelacera (D.) alcicornis*, seguido de *Chrysops fuscipex* 6,7% (61) e *Chrysops patricia* 5,9% (53). As espécies menos abundantes foram *Tabanus fuscus*, *T. nebulosus* e *Acanthocera kroeberi*, todas com 0,19% de representação.

Os dados foram comparados com estudos das regiões Centro-Oeste e Sudeste, onde uma metodologia semelhante foi utilizada, isso em função da falta de estudos sobre tabanídeos no Sul do Brasil. O número de espécimes registrados durante as coletas no presente estudo sete gêneros e 14 espécies foi menor do que no Pantanal com 12 gêneros e 21 espécies capturadas (BARROS, 2001) e menor também que no Estado de São Paulo (BOUVIER, 1952),

possivelmente devido às menores temperaturas médias anuais no estado de Santa Catarina, pois os tabanídeos geralmente preferem um ambiente com clima mais quente. Comparado ao estudo anterior de Miletto *et al.* (2011), foi encontrado um gênero a mais, *Catachlorops* sp., com 5 indivíduos.

Tabela 2 – Espécies, gêneros e números de tabanídeos capturados usando-se isca equina nos anos de 2018 e 2019, Lages/SC.

Espécie	Quantidade	Porcentagem
<i>Dichelacera (Dichelacera) alcicornis</i>	276	52,77%
<i>Chrysops fuscipex</i>	94	17,97%
<i>Chrysops patricia</i>	56	10,70%
<i>Poeciloderas quadripunctatus</i>	23	4,39%
<i>Fidena nigripes</i>	17	3,25%
<i>Fidena longipalpis</i>	15	2,86%
<i>Tabanus colombensis</i>	15	2,86%
<i>Dichelacera (Dichelacera) januarii</i>	12	2,29%
<i>Acanthocera aureoscutellata</i>	5	0,95%
<i>Catachlorops</i> spp.	5	0,95%
<i>Tabanus</i> spp.	2	0,38%
<i>Acanthocera kroeberi</i>	1	0,19%
<i>Tabanus fuscus</i>	1	0,19%
<i>Tabanus nebulosus</i>	1	0,19%
Total	523	100%

Fonte: autor, 2019.

Com relação aos hábitos alimentares, sabe-se que somente as fêmeas são hematófagas e que diferentes espécies fazem o hematofagismo atacando seus hospedeiros em diversas e diferentes partes do corpo (GUIMARÃES, 2015), mas também existe uma preferência por local anatômico em equinos. Na cabeça e pescoço foram capturados 163 insetos, destes 93 (57,05%) foram da espécie *C. fuscipex* e 55(33,74%) foram da espécie *C. patricia*, gênero que prevaleceu nesta região. Na região do tórax e abdome foram coletados 104 insetos, sendo 67 (64,42%) da espécie *D. (D.) alcicornis*, seguida de 17 (16,34%) indivíduos da espécie *F. nigripes*, espécies prevalentes nesta região. Nas patas anteriores e posteriores foram coletados 256 insetos, destes 204 (76,68%) da espécie *D. (D.) alcicornis*, 22 (8,59%) da espécie *P. quadripunctatus* e 13 (5,07%) da espécie *T. colombensis*, espécies prevalentes nesta região (**Tabela 3**). Estas mesmas espécies e gêneros, em porcentagens muito semelhantes, também foram prevalentes nos mesmos locais anatômicos em estudos precedentes (BASSI *et al.*, 2000; MILETTI *et al.*, 2011). Uma única espécie diferiu bastante de estudo anterior com relação a comportamento de pouso para repasto sanguíneo, foi *D. (D.) alcicornis* que anteriormente

preferiu o tórax e o abdômen(56,3%) e no atual estudo a mesma espécie preferiu os membros(73,91%), porém, também foi capturada em tórax e abdômen (24,27%) e cabeça (1,81%). Os resultados do atual estudo corroboram os de Bassi *et al.* (2000) realizado no Estado do Paraná em termos das espécies mais prevalentes, *D. (D.) alcicornis* Wied., *C. patricia* e *C. fuscipapex*, e também ao trabalho feito por Miletta *et al.* (2011) na mesma região, especialmente os espécimes coletados nas regiões da cabeça e do flanco (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Hábitos de repasto sanguíneo das espécies de tabanídeos coletadas usando-se isca equina nos anos de 2018 e 2019, Lages/SC (continua)

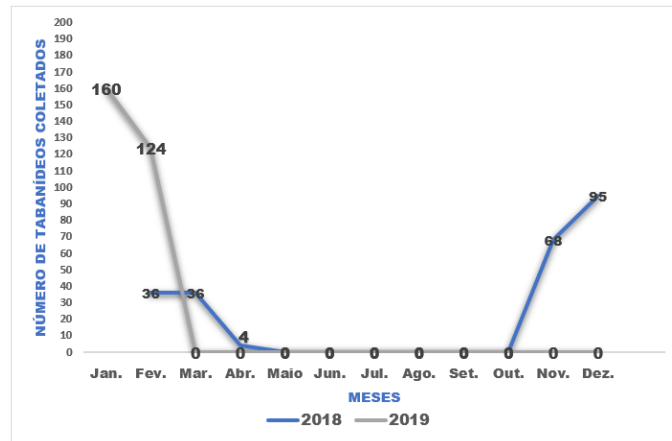
Espécie	Quantidade/Porcentagem
Cabeça e Pescoço	163 (100%)
<i>Chrysops fuscipapex</i>	93 (57,05%)
<i>Chrysops patricia</i>	55(33,74%)
<i>Dichelacera (Dichelacera) januarii</i>	8 (4,9%)
<i>Dichelacera (Dichelacera) alcicornis</i>	5 (3,06%)
<i>Fidena longipalpis</i>	1 (0,61%)
<i>Tabanus colombensis</i>	1 (0,61%)
Tórax e Abdômen	104 (100%)
<i>Dichelacera (Dichelacera) alcicornis</i>	67 (64,42%)
<i>Fidena nigripes</i>	17 (16,34%)
<i>Catachlorops</i> spp.	5 (4,8%)
<i>Dichelacera (Dichelacera) januarii</i>	3 (2,88%)
<i>Tabanus</i> spp.	3 (2,88%)
<i>Fidena longipalpis</i>	3 (2,88%)
Espécie	Quantidade/Porcentagem
<i>Acanthocera aureoscutellata</i>	2 (1,92%)
<i>Chrysops patricia</i>	1 (0,96%)
<i>Chrysops fuscipapex</i>	1 (0,96%)
<i>Tabanus colombensis</i>	1 (0,96%)
<i>Tabanus nebulosus</i>	1 (0,96%)
Patas anteriores e posteriores	256 (100%)
<i>Dichelacera (Dichelacera) alcicornis</i>	204 (76,68%)
<i>Poeciloderas quadripunctatus</i>	23 (8,59%)
<i>Tabanus colombensis</i>	13 (5,07%)
<i>Fidena longipalpis</i>	11 (4,29%)
<i>Acanthocera aureoscutellata</i>	3 (1,17%)
<i>Tabanus fuscus</i>	1 (0,39%)
<i>Acanthocera kroeberi</i>	1 (0,39%)
<i>Dichelacera (Dichelacera) januarii</i>	1 (0,39%)
Total	523

Fonte: autor, 2019.

Durante o estudo, o número máximo de tabanídeos foi registrado em janeiro de 2019, com 160 tabanídeos coletados (**Figura 1**), período muito próximo e com temperatura muito

semelhante ao estudo feito por Miletta *et al.* (2011) que registrou o pico de coletas em dezembro de 2007.

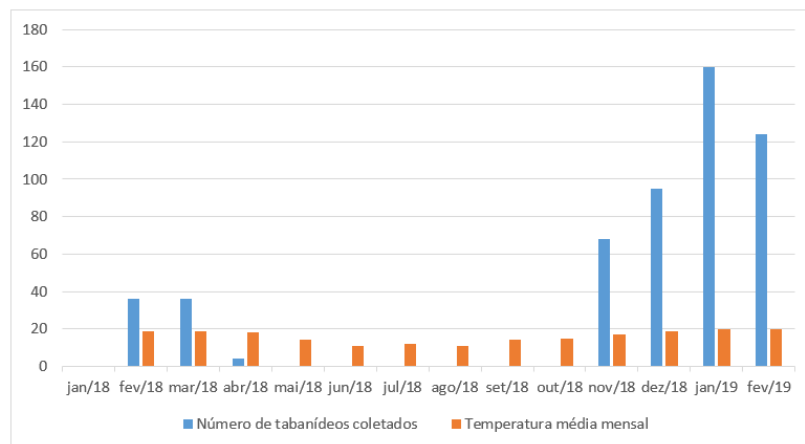
Figura 1 – Número total de tabanídeos coletados durante os anos de 2018 e 2019 na região de Lages SC.



Fonte: Elaborado pelo autor com dados meteorológicos cedidos pela EPAGRI/CIRAM.

O número máximo de espécimes coletados não aumentou durante a estação chuvosa, que corrobora os dados obtidos em estudo anterior feito por Miletta *et al.* (2011), porém esse dado foi contrário às observações feitas em regiões tropicais do Brasil (BARROS, 2001). No entanto, mais tabanídeos foram coletados quando a temperatura média se aproximou de 17°C ou mais, como aconteceu em janeiro e fevereiro de 2019 (**Figura 2**).

Figura 2 – Associação entre o número total de tabanídeos coletados durante os anos de 2018 e 2019 na região de Lages SC, com a temperatura média mensal.



Fonte: Elaborado pelo autor com dados meteorológicos cedidos pela EPAGRI/CIRAM.

Os tabanídeos, de uma maneira geral, foram mais comuns entre os meses de setembro a fevereiro, dados muito semelhantes aos encontrados em outros estudos (MILETTI *et al.*, 2011; GUIMARÃES, 2015), quando eram altas a temperatura, a umidade do ar e a pluviosidade. Esses dados permitem elaborar um modelo de previsão de quando os tabanídeos estarão mais ativos e numerosos, o que pode se traduzir em maior risco de transmissão.

A transmissão de enfermidades é fortemente influenciada pela abundância de vetores e, portanto, o número elevado durante os meses de verão representa uma ameaça considerável para as populações de animais no estado de Santa Catarina, especialmente para a produção de leite significativa nessa região. Desta forma, como os tabanídeos sofrem a influência de fatores climáticos sazonais que determinaram ao longo do período estudado, variação no número de indivíduos de todas as espécies, é possível identificar em que época do ano quais espécies são mais ou menos abundantes, de modo a subsidiar ações de controle (MILETTI *et al.*, 2011; GUIMARÃES, 2015).

Outra observação importante é a de que muitos dos insetos coletados, principalmente nos meses mais quentes estavam cobertos por pólen, o que evidencia sua importante contribuição neste aspecto já observado em estudos anteriores (SILVA, 2006).

5.3.2 Detecção de DNA de *T. evansi* e *T. vivax* em aparelho bucal dos tabanídeos coletados

As espécies escolhidas para a retirada do aparelho bucal foram também aquelas mais abundantes na região de Lages-SC (MILETTI *et al.*, 2011) e segundo o atual estudo. As peças do aparelho bucal foram retiradas de *D. (D.) alcicornis*, *D. (D.) januarii*, *F. nigripes*, *C. patricia*, *C. fuscipex*, e conservadas em TNE.

O “pool” de peças de aparelho bucal foi separado em grupos de acordo com local, data, número de exemplares da espécie e espécie de tabanídeo para extração de DNA e preparação de PCR (VENTURA *et al.*, 2001;) com a intenção de detectar os agentes da “surra”, “mal das cadeiras” e tripanossomose bovina, respectivamente, *T. evansi* e *T. vivax*. Essa separação resultou em 21 grupos A, B, C, D, E, F, G e assim por diante até a letra U (**Tabela 4**), que objetivou a facilitação e a identificação do local, caso fosse positivo. Desta forma não ocorreria a exposição dos proprietários, já que as doenças causadas nos animais, por estes agentes, são de notificação compulsória. Não houve espécimes com amostras de aparelho bucal provenientes do Sítio 1.

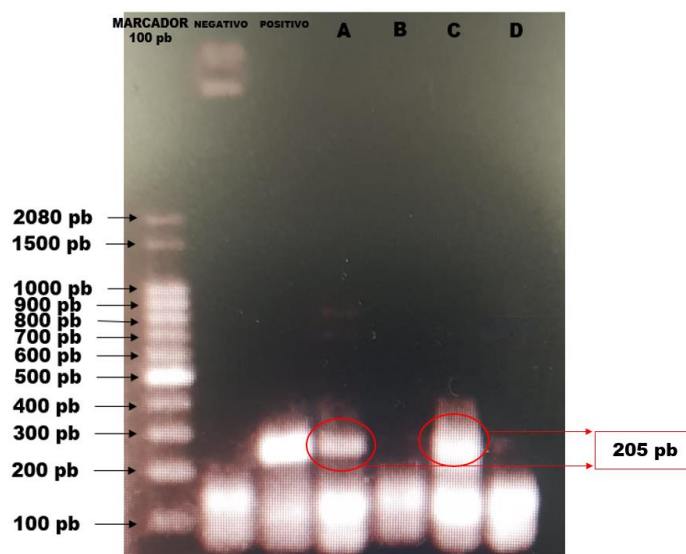
Tabela 4 – Espécies de tabanídeos usados para retirada de aparelho bucal, data da coleta, local, número de espécimes e resultados do PCR e sequenciamento.

NÚMERO ESPÉCIE	ESPÉCIE	DATA COLETA	LOCAL	AMOSTRA	RESULTADO PCR E SEQUENCIAMENTO
1	<i>Dichelacera (D.) januarii</i>	22/02/2018	Sítio 2	A	POSITIVO <i>T. evansi</i>
5	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	22/02/2018	Sítio 2	A	POSITIVO <i>T. evansi</i>
11	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	28/02/2018	Sítio 3	B	NEGATIVO
20	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	06/03/2018	Sítio 3	C	POSITIVO <i>T. evansi</i>
2	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	22/03/2018	Sítio 2	D	NEGATIVO
8	<i>Fidena nigripes</i>	13/11/2018	Sítio 4	E	NEGATIVO
9	<i>Fidena nigripes</i>	20/11/2018	Sítio 2	F	NEGATIVO
15	<i>Chrysops patricia</i>	20/12/2018	Sítio 2	G	NEGATIVO
19	<i>Chrysops fuscipex</i>	20/12/2018	Sítio 2	H	NEGATIVO
4	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	06/12/2018	Sítio 2	I	NEGATIVO
9	<i>Chrysops patricia</i>	06/12/2018	Sítio 2	J	NEGATIVO
17	<i>Chrysops fuscipex</i>	06/12/2018	Sítio 2	K	NEGATIVO
15	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	13/12/2018	Sítio 2	L	NEGATIVO
7	<i>Chrysops patricia</i>	13/12/2018	Sítio 2	M	NEGATIVO
21	<i>Chrysops fuscipex</i>	13/12/2018	Sítio 2	N	NEGATIVO
128	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	24/01/2019	Sítio 2	O	NEGATIVO
6	<i>Dichelacera (D.) januarii</i>	24/01/2019	Sítio 2	P	NEGATIVO
23	<i>Chrysops fuscipex</i>	24/01/2019	Sítio 2	Q	NEGATIVO
40	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	07/02/2019	Sítio 4	R	NEGATIVO
9	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	14/02/2019	Sítio 4	S	NEGATIVO
17	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	21/02/2019	Sítio 4	T	NEGATIVO
20	<i>Dichelacera (D.) alcornis</i>	28/02/2019	Sítio 4	U	NEGATIVO

Fonte: autor, 2019.

Os resultados da extração de DNA e PCR foram positivos para o agente *T. evansi* usando gene *RoTat* com 205 pb como parâmetro de comparação, mostrado em gel de agarose (**Figura 3**), ou seja, foi detectada a presença de DNA de *T. evansi* nas amostras A e C. O protocolo foi repetido, duas vezes, e o material foi purificado e enviado para sequenciamento na empresa *Myleus Facility*, onde as amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. que confirmou a presença de DNA de *T. evansi* nas amostras A e C, provenientes dos sítios 2 e 3, nas espécies *D. (D.) alcornis* e no gênero *Dichelacera* spp. com as peças bucais contaminadas. As demais amostras analisadas não apresentaram DNA de *T. evansi* e tampouco de *T. vivax*.

Figura 3 – Perfil de PCR de aparelho bucal de tabanídeos em gel de agarose para *T. evansi*.



Fonte: Acervo do autor, 2019.

Amostra A – “Pool” de extrato de aparelho bucal de *D. (D.) alcornis* e *D. (D.) januarii*, sítio 2, positivo.

Amostra B – “Pool” de extrato de aparelho bucal de *D. (D.) alcornis*, sítio 3, negativo.

Amostra C – “Pool” de extrato de aparelho bucal de *D. (D.) alcornis*, sítio 3, positivo.

Amostra D – “Pool” de extrato de aparelho bucal de *D. (D.) alcornis*, sítio 2, negativo.

Amostra negativa (-) – água miliQ, sem DNA.

Amostra positiva (+) – DNA purificado de *T. evansi*.

Marcador (M).

Os tripanosomas *T. evansi* e *T. vivax* encontrados na América do Sul são transmitidos apenas mecanicamente. Devido à perda da habilidade de se desenvolver ciclicamente, *T. evansi* também é transmitido mecanicamente na África (SILVA *et al.*, 2002). Cerca de 25 espécies de tabanídeos podem transmitir *T. evansi* segundo Freitas e colaboradores (1982), o que vem ao encontro dos resultados expostos acima.

Fermino *et al.* (2019) encontraram um tripanossomatídeo, chamado *Trypanosoma kaiowa* n. sp. em tabanídeos no Brasil, usando método de dissecação dos insetos e observação dos órgãos internos com microscopia óptica. Este coloniza fortemente o trato gastrointestinal de tabanídeos. Duas espécies de tabanídeos, *Phaeotabanus fervens* Linnaeus (48 moscas) e *Tabanus occidentalis* Linnaeus (3 moscas), foram capturadas no rio Miranda, no bioma Pantanal, Brasil. Dezenove moscas, todas fêmeas, eram positivas para tripanosomas por microscopia de seu conteúdo intestinal. No mesmo estudo a análise do *barcoding* revelou que infecções mistas por mais de um tripanossoma eram altamente prevalentes nos tabanídeos brasileiros. No bioma Pantanal, 65% dos tabanídeos apresentavam infecções mistas. Foram detectadas infecções únicas em apenas seis moscas.

No Gabão, com o intuito de identificar potenciais vetores de tripanossomatídeos, Mbang Nguema *et al.* (2015), usando método de dissecação dos insetos e observação dos órgãos internos com microscopia óptica no aumento de 400x, detectaram a presença de *Trypanosoma* sp. em

diversas espécies de *Glossina* spp. Infelizmente, os tabanídeos não foram inspecionados neste estudo, apenas coletados, sendo 23 *Chrysops* spp., 7 *Tabanus* spp. e 2 *Ancala* spp. Assim como no trabalho acima citado, muitos tratam de vetores e agentes causadores de enfermidades, porém, muito poucos relatam pesquisa de tripanossomas em tabanídeos. No Brasil, apenas o trabalho de Fermino *et al.* (2019) e o presente tratam deste assunto.

Na Polônia, Werszko *et al.* (2019) encontraram quatro espécies de tabanídeos *H. pluvialis*, *T. bromius*, *T. maculicornis* e *T. distinguendus* infectados por tripanossomatídeos do subgênero *Megatrypanum*, do qual faz parte o *Trypanosoma (M.) theileri*. Neste mesmo estudo a infecção dos insetos foi considerada alta em função do tamanho da amostra. O mesmo estudo aponta pela primeira vez a ocorrência deste tripanossomatídeo nas espécies *T. maculicornis* e *T. distinguendus*. Estes dados são muito semelhantes ao atual estudo, pois pela primeira vez, na América Latina e no mundo, a espécie *D. (D.) alcornis* e o gênero *Dichelacera* spp. são encontradas portando *T. evansi* no aparelho bucal com confirmação molecular. A amostra do atual estudo é pequena, o que também faz a infecção dos insetos ser alta.

Um grupo de Santa Catarina encontrou, pela primeira vez, *T. evansi* em bovino leiteiro na região de Videira situada no vale do Rio do Peixe, mas não relatou a presença do parasito em tabanídeos (SILVA *et al.*, 2007). Surtos de *T. vivax* em bovinos foram relatados na região do Pantanal, atingindo Brasil, Bolívia e Paraguai, além do norte da Argentina e Colômbia, onde a transmissão foi possivelmente via tabanídeos (SILVA *et al.*, 1998; SEIDL *et al.*, 1999).

Este estudo fornece evidências biológicas, comportamentais e moleculares que apóiam os tabanídeos como vetores de *T. evansi*. As análises por PCR e sequenciamento revelam que o protozoário está presente, ao menos, em uma espécie e um gênero de tabanídeos do local estudado. Esses resultados podem ser confirmados pela circulação do protozoário no estado, evidenciado pela descrição do primeiro surto autóctone de *surra* em equinos no Estado de Santa Catarina, Brasil, em uma propriedade localizada na região do Alto Vale do Itajaí onde seis equinos com sinais clínicos sugestivos de *surra* foram positivos na PCR para a infecção por *T. evansi* (RECK, 2017).

Está bem estabelecido que reservatórios desempenham um papel central na manutenção e expansão da infecção por *T. evansi*, entretanto a transmissão depende de várias características ecológicas e epidemiológicas, especialmente à presença de espécies de vetores competentes e hospedeiros mamíferos suscetíveis. Por isso, o aprimoramento das abordagens moleculares será cada vez mais útil para detecção de agentes causadores de enfermidades e seus vetores, além de facilitar o mapeamento da circulação destes agentes. No Brasil, não existem dados oficiais acerca da circulação de *T. evansi*, apenas estudos regionalizados. Em Santa Catarina, apesar de

um relato da infecção em bovinos e equinos, o Estado é considerado zona livre da doença (RECK, 2017). O Estado tem uma importante parcela de sua economia baseada na pecuária de corte e leiteira, bem como, um rebanho equino extenso usado em tração, manejo bovino e eventos culturais. Baseando-se nestes dados, trabalhos como o que foi realizado torna-se de grande importância para que sejam implementadas medidas profiláticas e de controle, já que os resultados apresentados indicam o risco iminente para a saúde animal e humana, além da economia.

5.4 CONCLUSÃO

Este estudo corrobora dados do estudo anterior feito na mesma região, pelos mesmos pesquisadores onde, praticamente as mesmas espécies de tabanídeos foram encontradas, mostrando que prevalecem *Dichelacera (D.) alcornis* que foi a mais abundante, seguida por *Chrysops fuscipex* e *Chrysops patricia*.

O estudo sugere uma íntima relação entre algumas das espécies estudadas e a preferência anatômica por determinados locais de repasto sanguíneo em equinos.

Tabanídeos tem uma relação estreita entre população e temperatura, quanto maior e mais constante a temperatura, maior é o número de insetos.

Uma espécie de tabanídeo foi encontrada portando o *T. evansi* em suas peças bucais, *Dichelacera (D.) alcornis* e o gênero *Dichelacera* spp. também foi positivo, e nenhuma espécie foi detectada com DNA de *T. vivax* nas peças bucais.

5.5 REFERÊNCIAS

BARROS, A. T. M. Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 917-923, 2001.

BARROS, A. T. M.; GORAYEB, I. D. S. A checklist and identification key to the Tabanids (Diptera: Tabanidae) from Nhecolândia subregion of the Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Bras. de Bio.**, v. 56, p. 547-551, 1996.

BASSI, R. M. A.; CUNHA, M. C. I.; COSCARON, S. A study of behavior of tabanids (Diptera, Tabanidae) from Brazil. **Acta Biol. Par.** v.29, p. 101–115, 2000.

BATISTA, J. S.; *et al.* Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet. Parasitol.**, v. 143, n. 2, p. 174-181, 2007.

BOUVIER G. Notes sur le Tabanides de la region de Campinas (Estado de São Paulo). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 50, p. 581–595, 1952.

CHRISTEN, S. E.; *et al.* SECTAB - A New Device for Tabanid Storage in Field Collections. **Neotr. Entomol.**, v. 38, n. 6, p. 883-884, 2009.

CIDADE-BRASIL. **Município de Lages**. 2019. Página inicial. Disponível em: <https://www.cidade-brasil.com.br/municipio-lages.html#desc>. Acesso em: 20 de jun. de 2019.

CLAES, F.; *et al.* Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. **Kinetoplastid Biol. Dis.**, v. 3, n. 1, p. 3, 2004. Published 2004 Sep 17. doi:10.1186/1475-9292-3-3

COLPO, C. B.; *et al.* Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciên. Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 717-719, 2005.

CONRADO, A. C.; *et al.* Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região Central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciên. Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 928-931, jul-ago, 2005.

CUGLOVICI, D. A.; *et al.* Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 169, p. 320-326, 2010.

DÁVILA, A. M.; *et al.* Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. **Vet. Parasitol.**, n. 3, v. 117, p. 1-13, 2003.

DESQUESNES, M.; *et al.* Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, n. 3, p. 333-346, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Pantanal. Trypanosoma evansi e T. vivax: Biologia, diagnóstico e controle**. Corumbá, 2002.
EPAGRI. **Números da Agropecuária Catarinense - 2018**. Florianópolis, SC, n. 277, 2018. 75p.

FAIRCHILD, G. B. Notes on Neotropical Tabanidae. XII. Classification and distribution, with keys to genera and subgenera. **Arq. Zoo.**, São Paulo, v. 17, p. 199-255, 1969.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SANTA CATARINA. **Santa Catarina em dados / Unidade de Política econômica e industrial**. Florianópolis: Fiesc, 2015. 192 p.

FERMINO, B. R.; *et al.* Shared species of crocodylian trypanosomes carried by tabanid flies in Africa and South America, including the description of a new species from caimans, *Trypanosoma kaiowan*. sp. **Paras. & Vect.**, v. 12, n. 225, p. 2-17, 2019.

FERREIRA, R. L. M.; HENRIQUES, A. L.; RAFAEL, J. A. Activity of tabanids (Insecta: Diptera: Tabanidae) attacking the reptiles *Caiman crocodilus* (Linn.) (Alligatoridae) and *Eunectes murinus* (Linn.) (Boidae), in the Central Amazon, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 133-136, 2002.

FERREIRA, R. L. M.; RAFAEL, J. A. Criação de imaturos de mutuca (Tabanidae: Diptera) utilizando briófitas e areia com substrato. **Neotr. Entomol.**, v. 35, p. 141-144, 2006.

FIDELIS JUNIOR, O. L.; *et al.* Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 25, n. 1, p. 69-81, 2016.

FINELLE, P. African animal trypanosomiasis; Part IV. Economic Problemes. **Wild. Anim. Rev.**, v. 110, p. 15-18, 1974.

FOIL, L. D. Tabanids as vectors of disease agents. **Parasitol. Today**, v. 5, n.3, p. 88-96, 1989.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3.ed. São Paulo: Ícone, 2004.

FRANCISCATO, C.; *et al.* Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciên. Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 288-291, jan-fev, 2007.

FREITAS, M. C. D. O. **Deteção de Rickettsias do Grupo febre Maculosa em Cães e Equinos em São José dos Pinhais, PR**. 2007. 70 f. Dissertação - Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade federal do Paraná, Paraná. 2007.

FREITAS, M. G.; *et al.* **Entomologia e Acarologia Médica Veterinária**. Belo Horizonte, Precisa ed. Gráfica, 1982. 253 p.

GARCÍA, H.; *et al.* Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 100, n. 4, p. 297-305, 2006.

GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Adv. Parasitol.**, v. 28, p. 229-317, 1989.

GUIMARÃES, R. R. **Tabanidae (Insecta: Diptera):** caracterização, ecologia e interação com a população Quilombola da Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. 2015. 187 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

HERRERA, H. M.; *et al.* Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 125, p. 263-275, 2004.

HOARE, C. A. **The Trypanosomoses of mammals**. Oxford: Blackwell, 1972. 749 p.

JOSHI, P. P. *et al.* Human Tripanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.73, n. 3, p. 491–495, 2005.

KLEIN, R. M. **Mapa fitogeográfico do Estado de Santa Catarina**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 24p. 1978.

KOLLE, W. W.; BARROS, A. T. M.; GOMES, A. Sazonalidade de tabanídeos (Diptera, Tabanidae) em área de transição entre o cerrado e o Pantanal, no Mato Grosso do Sul, Brasil. **In Programas e Resumos do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, Colégio Brasileiro de parasitologia Veterinária, 2002.

KRINSKY, W. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). **J. Med. Entomol.**, Lanhan, v. 3, p. 225-275, 1976.

KROLOW, T. K.; BAYLESS, K. M.; HENRIQUES, A. L. Newly discovered males and new records of the uncommon neotropical genera *Eutabanus* Kroeber and *Myiotabanus* Lutz (Diptera: Tabanidae). **Zootaxa**, n. 3389, p. 25-33, 2012.

KROLOW, T. K.; KRÜGER, R. F.; RIBEIRO, P. B. Illustrated key for Tabanidae (Insecta: Diptera) genera of Campos Sulinos biome, Rio Grande do Sul, Brazil. **Biota Neotr.**, v. 7, p. 253-264, 2007.

LESSARD, B. D.; YEATES, D. K. Seven new Australian species of the southern hemisphere horse fly subgenus *Scaptia* (*Pseudoscione*) (Diptera: Tabanidae), including descriptions and a revised key. **J. Med. Entomol.**, v. 49, n. 6, p. 1206-1225, 2012.

LOSOS, G. J.; IKEDE, B. O. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. Tororo: **Uganda East African Trypanosomiasis Research Organization**, 1972.

MARCONDES, C. B. **Entomologia: Médica e Veterinária**. Atheneu. 2001.

MBANG-NGUEMA, O. A.; *et al.* Inventory of potential vectors of trypanosoma and infection rate of the Tsetse fly in the National Park of Ivindo, Gabon. **Afric. Health Scien.**, v. 15, n. 3, p. 762–767, 2015.

MILETTI, L. C.; *et al.* Prevalence, seasonality and behaviour of Tabanidae (Diptera) captured on a horse in the Planalto Serrano of Santa Catarina State, Brazil. **Inter. Jour. of Trop. Ins. Scie.**, v. 31, n. 1–2, p. 122–126, 2011.

ODENIRAN, P.; MACLEOD, E.; ADEMOLA, I. O.; *et al.* Molecular identification of bovine trypanosomes in relation to cattle sources in southwest Nigeria. **Parasitol. Int.**, v. 68, n. 1, 2019.

OLIVEIRA, M. T.; BARAU, J. G.; JUNQUEIRA, A. C. M. Structure and evolution of the mitochondrial genomes of *Haematobia irritans* and *Stomoxys calcitrans*. The Musc. (Diptera: Calyptratae) persp. **Mol. Phylog. and Evol.**, v. 48, p. 850-857, 2007.

OSÓRIO, A. L. A. R.; *et al.* *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 103, 1, 1-13, 2008.

PEREIRA, H. D.; *et al.* Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 38, n. 5, p. 896-901, 2018.

PROTOZOOLOGIA UFSC. **Protocolos**. Florianópolis, Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2010.

RADOSTITIS, O. M.; *et al.* **Veterinary Medicine**. 9 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

RAFAEL, J. A.; MARQUES, D. W. A.; LIMEIRA-DE-OLIVEIRA, F. Tabanidae (Diptera) of Maranhão State, Brazil. V. Description of *Protosilvius gurupi* sp. n. (Pangoniinae, Pangoniini) and key to *Protosilvius* species. **Zookeys**, v. 235, p. 41-50, 2012.

RECK, C. **Padronização de um antígeno tamponado para pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma evansi* em bovinos e equinos.** 2017. 60f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC.

RODRIGUES, A.; *et al.* Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 239-249, 2005.

SANTA CATARINA. Fundação do Meio Ambiente (FATMA). **Lista comentada de espécies exóticas invasoras no estado de Santa Catarina:** espécies que ameaçam a diversidade biológica. Silvia R. Ziller (consultora). Floarianópolis: FATMA, 2016. 88p.

SEIDL, A.; DÁVILA, A. M.; SILVA, R. A. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian lowlands. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 269-272, 1999.

SILVA, A. G. Relações entre plantas e polinizadores - uma abordagem para o cerrado em comparação com outras formações vegetais. **Natureza on line**, v. 4, v. 1, p. 14-24, 2006. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>

SILVA, A. S.; *et al.* Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira-SC, Brasil. **Acta Sci. Vet.**, v. 35, p. 373-376, 2007.

SILVA, R. A. M. S.; *et al.* Bovine trypanosomiasis in the Bolivian and Brazilian lowlands. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 29-32, 1998.

SILVA, R. A. M. S.; *et al.* ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*:** Biologia, Diagnóstico e Controle. Embrapa Pantanal, 2002. 140.

SILVA, T. M. M.; *et al.* Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. **Vet. Res.**, n. 44, v. 1, p. 1-9. 2013.

SILVEIRA, J. A.; *et al.* Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.**, *in press*, 2013.

- TAKAC, P.; *et al.* Vasotab, a vasoactive peptide from horse fly *Hybomitra bimaculata* (Diptera, Tabanidae) salivary glands. **J. Exp. Biol.**, n. 209, p. 343-352, 2006.
- TURCATEL, M.; CARVALHO, C. J. B.; RAFAEL, J. A. Horse flies (Diptera: Tabanidae) of Paraná State, Brazil: pictorial identification key for subfamilies, tribes and genera. **Biota Neotrop.**, v. 7, p. 265-278, 2007.
- URQUHART, G. M.; *et al.* **Parasitologia Veterinária**. Guanabara Koogan. 1998.
- VENTURA, R. M.; *et al.* *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. **Exp. Parasitol.**, v. 99, n. 1, p. 37-48, 2001. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4641>. PMID: 11708832.
- VIBRANS, A. C.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A. L.; *et al.* **Floresta ombrófila mista**. Blumenau: Edifurb, 2013. 440p.
- VIEIRA, O. L. E.; *et al.* Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 26, n. 4, p. 516-520, 2017.
- WELLS, E. A. Animal Trypanosomiasis in South America. In: RIEMANN, H. P., BURRIDGE, M. J. **Impact of diseases on livestock production in the tropics**, Amsterdam: Elsevier, 1984, p. 31-41.
- WERSZKO, J.; *et al.* Molecular detection of *Megatrypanum* trypanosomes in tabanid flies. **Med. Vet. Entomol.** 2019.
- WOLF, C. A.; *et al.* (Org.). **Diagnóstico clínico-patológico e laboratorial das principais enfermidades dos animais domésticos**. 1 ed., Goiania: Editora Espaço Acadêmico, 2019. 789 p.
- ZEEGERS, T.; KRAVCHENKO, V. D.; MÜLLER G. C. *Pangonius theodori* a new horse fly species for science from Israel and Lebanon (Diptera: Tabanidae: Pangoniinae). **Acta Trop.**, v. 125, 2013, p. 247-250.

6 CAPÍTULO II – MANUSCRITO II

Análise proteômica DA GLÂNDULA SALIVAR DE TRÊS ESPÉCIES DE TABANÍDEOS DA FLORESTA OMBRÓFILA MISTA (SUL DO BRASIL).

Proteomics analysis of salivary gland from three tabanids species of mixed ombrophila forest (south Brazil).

Carlos José Raupp Ramos^{1,2}; Luiz Claudio Miletto^{1*}; Renato Simões Moreira¹, Luiz Flavio Nepomuceno do Nascimento¹; Gabriela Bassi das Neves¹.

¹ Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC). Av. Luís de Camões, 2090, Lages, SC, Brasil.

*Autor para correspondência: luiz.miletto@ udesc.br.

² UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Laranjeiras do Sul – PR.

RESUMO

Tabanídeos são um grupo de insetos onde a hematofagia é exclusiva da fêmea, provocam incômodo por sua picada tanto em animais de produção, de companhia e em humanos e podem transmitir diversos patógenos. As fêmeas possuem em sua saliva componentes com poder anti-hemostático, vasodilatador, inibidor de imunoglobulinas, entre outros, componentes estes que poderiam ser explorados na ciência e na terapêutica. Em função destas características foi realizado um estudo de bioprospecção de componentes da glândula salivar de tabanídeos da Floresta Ombrófila Mista (Sul do Brasil). Foram capturados, semanalmente, na região de Lages, tabanídeos (Diptera, Tabanidae) com o auxílio de isca equina. Os insetos coletados foram armazenados conforme localização anatômica no momento do pouso no dispositivo SECTAB. Após, foi procedida a identificação taxonômica, coleta de dados meteorológicos, as glândulas salivares foram dissecadas e transferidas para um microtubo de plástico com tampão fosfato - salina (PBS pH 7.2) e congeladas. Após foi procedida a análise dos peptídeos por espectrometria de massa com LC-MS/MS no CDC de Atlanta, EUA. Nas glândulas salivares das espécies *D. (D.) alcicornis*, *D. (D.) januarii* e *Fidena nigripes* foi encontrado 70 proteínas com funções nos processos metabólicos dos ácidos carboxílicos, proteínas, carboidratos e energético, bem como funções estruturais, oxirredutoras, de transporte e enzimático.

Palavras chave: Tabanídeos, saliva, glândulas salivares, proteínas, peptídeos.

6.1 INTRODUÇÃO

Os tabanídeos são moscas conhecidas vulgarmente no Brasil, como mutucas ou butucas (TURCATEL *et al.*, 2007). Estes insetos são classificados cientificamente no filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Brachycera e família Tabanidae (FORTES, 2004). Esta última contém aproximadamente 4290 espécies, sendo registradas na região Neotropical cerca de 1172 espécies em 65 gêneros (FERREIRA e RAFAEL, 2006).

A maior parte dos poucos trabalhos já publicados na literatura sobre tabanídeos no Brasil, tem se concentrado apenas em fazer a identificação de novas espécies e correlacioná-las com a sazonalidade (OLIVEIRA *et al.*, 2007), sem no entanto, se aprofundar usando ferramentas moleculares de identificação e bioprospecção. Provavelmente, as dificuldades no isolamento de substâncias bioativas de insetos hematófagos, a pequena quantidade, e por serem em sua maioria peptídeos ou proteínas que requerem avanços tecnológicos para obtenção, identificação e síntese faz com que poucos grupos se interessem pela pesquisa com estes componentes. De qualquer forma, muitos compostos tem sido isolados de animais hematófagos e testados para desenvolvimento de drogas mais específicas e seguras tendo menos efeitos colaterais. A grande quantidade de moléculas com propriedades inibitórias, imunológicas e farmacocinéticas diferentes mostra a possibilidade de drogas anticoagulantes mais adequadas estarem disponíveis no futuro (CIPRANDI *et al.*, 2003). Quando se avalia a situação do conhecimento da biodiversidade em tabanídeos, observa-se que não possuímos no Brasil estudos aprofundados relativos a essa família de insetos.

Com o objetivo de estudar apuradamente os tabanídeos presentes na floresta ombrófila mista e com o intuito de analisar as proteínas da glândula salivar usando análises moleculares e gerar informações sobre a proteômica de peptídeos, pretende-se “investigar” estes insetos como organismos passíveis de bioprospecção.

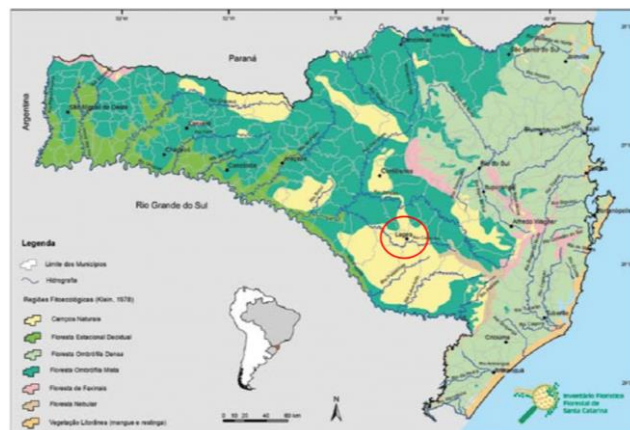
6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Descrição da região estudada

O presente estudo foi efetuado no município de Lages que possui uma área de 2.637,660 km², com aproximadamente 157.743 habitantes, encontra-se situado no Planalto Serrano do Estado de Santa Catarina, com altitude de 930m, latitude de 27° 48'S e longitude de 50°20'O, possuindo como cenário natural superfície plana, ondulada e montanhas, com matas de

Araucária, o que caracteriza a floresta ombrófila mista (**Figura 1**), campos naturais, limpos, sujos e áreas de inundações (SANTA CATARINA, 2016). Quanto ao clima, este é temperado subtropical, com temperatura média de 16°C. Durante o inverno, o clima é frio, onde as temperaturas podem chegar a -4°C e sensação térmica de -10°C. Na região ocorrem fortes geadas e também queda de neve. Já no verão, o clima varia de agradável a quente, as temperaturas podem chegar a 30°C, podendo haver secas (CIDADE-BRASIL, 2019).

Figura 1 – Região de Lages SC, floresta ombrófila mista, local onde foi realizado estudo.



Fonte: Adaptado de mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina (KLEIN, 1978; VIBRANS *et al.*, 2013).

6.2.2 Coleta de amostras

No período de fevereiro de 2018 a fevereiro 2019 foram coletados, semanalmente, tabanídeos em quatro sítios (1, 2, 3 e 4) (**Figura 2**) distribuídas em pontos distintos da região, preferencialmente, que tivessem criação concomitante de bovinos e equinos.

Figura 2 – Locais de coleta de tabanídeos na região de Lages, SC.



Fonte: Adaptado de Google MAPS.

As coletas foram realizadas uma vez por semana em cada propriedade, sempre próximo a coleções de água, como açudes ou lagos e rios ou riachos com mata ciliar, ao término da quarta voltava-se a primeira e assim por diante. Foram feitas 3 horas de coleta em cada propriedade, no intervalo das 15 às 18h., usando-se um equino de cada propriedade como isca, preferencialmente, animais mansos e de pelagem mais escura, que eram estimulados a suar a cada 30 minutos de coleta, através de galope. Também foi utilizado octenol embebido em chumaços de algodão e fixados com atílios nos arreios dos animais para atrair os insetos. A coleta foi feita com auxílio de um frasco de vidro, em seguida os insetos foram armazenados conforme localização do repasto (cabeça, membros, tórax e abdômen), no dispositivo SECTAB (CHRISTEN *et al.*, 2009) e transportados ao LABHEV (Laboratório de Hemoparasitos e Vetores) do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), mortos em frascos mortíferos com clorofórmio. Em seguida procedeu-se a identificação, separação destes por espécie (escolhidas segundo as mais prevalentes na região de acordo com Miletta *et al.*, (2011)), data da coleta e local, na sequência procedeu-se a retirada das glândulas salivares dos tabanídeos.

6.2.3 Identificação taxonômica dos tabanídeos

A identificação taxonômica foi feita segundo as chaves taxonômicas descritas por Fairchild (1969) e Barros e Gorayeb (1996). Em caso de dúvidas quanto às espécies, exemplares foram enviados para o Museu Goeldi em Belém-PA, para serem submetidos à avaliação pelo Dr. Inocêncio Gorayeb. Os espécimes coletados foram depositados no museu de entomologia da Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul/PR.

6.2.4 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos durante o período de execução, tais como temperatura, umidade, pluviosidade e comportamento dos ventos das regiões estudadas foram obtidos junto ao serviço disponível no estado, EPAGRI/CIRAM (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina).

6.2.5 Preparação dos extratos de glândula salivar

As fêmeas de tabanídeos foram separadas em grupos por espécie, grupo 1 contendo “pool” (276 pares) de extrato de glândula salivar de *Dichelacera (D.) alcicornis*, grupo 2 contendo “pool” (17 pares) de extrato de glândula salivar de *Fidena nigripes* e grupo 3 contendo “pool” (12 pares) de extrato de glândula salivar de *Dichelacera (D.) januarii*, processadas no dia da captura ou armazenadas em freezer. Após a coleta, as glândulas salivares foram dissecadas sob um estereomicroscópio e transferidas para um microtubo de plástico com tampão fosfato - salina (PBS pH 7.2). As glândulas salivares foram em seguida, aquecidas em um banho de água a 80°C por 5 minutos, homogeneizadas e centrifugado em microcentrífuga a 10.000 g durante 10 min. O sobrenadante (extrato de glândula salivar, SGE) foi colhido e armazenado a -80°C. A extração protéica foi feita conforme protocolo de Cordeiro *et al.* (2009). A concentração de proteína no extrato de glândula salivar foi determinada pelo ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976) e também com auxílio de nanodrop (NanoDrop™2000 Thermo Scientific Spectrophotometers, ThermoFisher®).

6.2.6 Eletroforese em gel de dodecil sulfato de poliacrilamida de sódio (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE foi realizada utilizando gel de separação de 15% e gel de concentração de 4%. As amostras das glândulas salivares foram misturadas com tampão de concentração de SDS 1:1. A mistura foi fervida durante 5 min. e carregada nos géis. O marcador de massa molecular (Thermo Scientific™ Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder #26634) foi aplicado a cada gel. A eletroforese foi realizada usando uma tensão constante de 110V, 70mA por 90 minutos, ou quando o corante de rastreamento atingiu o fundo do gel de separação. Após eletroforese, os géis foram corados com o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) e fotografados.

6.2.7 Digestão trípica (em gel e em solução)

As amostras 1, 2 e 3 foram enviadas ao CDC de Atlanta-EUA, para efetuar-se a análise dos peptídeos, estas foram em duas apresentações: um grupo com as amostras 1, 2 e 3 eluídas em 500µL de água ultrapura devidamente evaporadas em *Speed Vac*; outro grupo foi recortado do gel SDS (5µL por amostra) e colocado com 1mL de água ultrapura, todos devidamente

etiquetados (tubo 1- “Pool” SGE de *Dichelacera (D.) alcornis*; tubo 2- “Pool” SGE de *Fidena nigripes*; tubo 3- “Pool” SGE de *D. (D.) januarii*).

As bandas de proteínas coradas com *Coomassie* (2mm × 2mm) foram excisadas dos géis e tratadas duas vezes com 200µl de descoloração solução (5mM bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) em 50% de ACN) durante 60 minutos a 37°C com agitação e o excesso de ACN foi removido por secagem em um *SpeedVac* (Eppendorf, Hamburgo, DE) por 30 min. As proteínas foram reduzidas com 10mM de ditioneitol (DTT) por 30 min a 60°C, seguido de alquilação com 50mM iodo acetamida (IAA) por 1h. em temperatura ambiente. Géis foram lavados com 200µl de tampão descolorante por 15 min. a 37°C com agitação. As fatias de gel foram incubadas com 50µl de 100% ACN por 15 min. em temperatura ambiente e seco por 15 min. As proteínas foram digeridas com sequências modificadas tripsina (1µg) (Promega, Madison, WI) por 15 min. no quarto temperatura em tampão de digestão (NH₄HCO₃ 50mM/1mM CaCl₂, pH 8,5) e, em seguida, incubou-se por 16 horas a 37°C. As digestões foram interrompidas pela adição de HCl 175mM (pH 7,5). Os peptídeos foram recuperados do gel adicionando 100µl de NH₄HCO₃ 5mM em 50% de ACN e incubados por 1h. em temperatura ambiente. O restante peptídeo trípico extinto a solução foi transferida para um novo tubo, seca por 1h. em temperatura ambiente e reconstituído com 10µl de ácido fórmico a 0,1%. Para obter a digestão em solução, as frações das glândulas salivares foram reconstituídas com 20µl de 8M ureia em 400mM NH₄CO₃. Total de 30µg de proteínas SP foram digeridas com tripsina (2µg) e as os peptídeos foram recuperados com 25µl de ácido fórmico a 0,1%. Para remover detergente residual Triton X-114, os peptídeos trípticos foram tratados com colunas de centrifugação para remoção de detergente Pierce (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL), de acordo com as instruções do fabricante (WAGNER *et al.*, 2013).

6.2.8 Análise Nano-LC ESI-MS / MS

Os peptídeos trípticos foram separados e analisados usando um método on-line Sistema NanoAcquity (Waters Corporation, Milford, MA) associado a um LTQ Orbitrap Velos em nanospray (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL). Resumidamente, 3µl de cada digestão foram carregados em uma coluna analítica C18 PepMap™ (300µm × 5nm) (Waters Corporation, Milford, MA) a uma vazão de 5000µl/min. Os peptídeos foram eluídos a uma coluna analítica C18 PepMap™ (75µm id × 15cm) (Waters Corporation, Milford, MA), utilizando um gradiente de HPLC formado pelo solvente A (água de qualidade HPLC com

ácido fórmico a 0,1% (FA)) e solvente B (0,1% de FA em ACN). Para digestões em gel, o gradiente de HPLC foi estabelecido em 5–40% do solvente B ao longo de 16 min., seguido de uma aceleração 1 min. a 95% do solvente B. Houve uma espera de 3 min. a 95% do solvente B e, em seguida, uma gota de 1 min. a 5% do solvente B. A coluna foi então regenerada com 5% de solvente B durante 10 min. Para digestões em solução, após 10 min. de 5% de solvente B, o gradiente foi iniciado e aumentado para 40% de solvente B 10 min., seguindo uma rampa para 95% de solvente B em 2 min. Depois de 15 min. a 95% de solvente B, o sistema foi levado a 95% de solvente A e 5% de solvente B em 1 min. A coluna foi reequilibrada para 95% de solvente A e 5% de solvente B por 15 min. O espectrômetro de massa (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL) foi operado em modo de íon positivo com uma fonte tensão de 35kV; a aquisição de dados foi de 400 a 1400m/z a uma resolução de massa nominal de 60.000 e um tipo de dados de perfil de 16 verifica eventos. O tempo de aquisição de MS/MS foi de 30 minutos para digestões de gel e 130 minutos para digestões em solução (WAGNER *et al.*, 2013).

6.2.9 Pesquisas de banco de dados

Os arquivos de dados brutos do MS foram processados usando o Mascot Distiller. A busca no banco de dados foi realizada usando o software MaxQuant, <maxPeptideMass>4600</maxPeptideMass> <peptideFdr>0.01</peptideFdr> (probabilidade de ser falso positivo) <proteinFdr>0.01</proteinFdr> (probabilidade de ser falso positivo) <minPepLen>7</minPepLen> tamanho mínimo de peptídeo.

A busca no banco de dados foi feita da seguinte forma: TriTrypDB-39_TevansiSTIB805_AnnotatedProteins (10.109 proteínas) (extraído do TriTrypDB); Proteínas de *Tabanus* sp. (3517 proteínas) retirado do GenBank (todas as proteínas que apareceram); Proteínas de *Dichelacera* sp. (14 proteínas) retirado do GenBank (todas as proteínas que apareceram); Proteínas de *Fidena* sp. (63 proteínas) retirado do GenBank (todas as proteínas que apareceram); Proteoma de referência da *Stomoxys calcitrans* (23.328 proteínas) (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000095300>); 2800 proteínas de *Spiroplasma* sp. (bactéria que vivem em tabanídeos).

Foi adicionada tripsina suína, *Saccharomyces* sp. álcool desidrogenase (ADH) e queratina humana nas bases de dados como contaminantes controles. Além disso, pesquisas sincronizadas em bancos de dados foram automaticamente realizadas para os dois bancos de dados. Os parâmetros de pesquisa do Mascot consistiam em peptídeos trípticos com uma

clivagem perdida, carbamidometilação de resíduos de cisteína e metionina oxidação como modificações variáveis e 0,5Da para ambos os peptídeos com tolerância de massa e tolerância de massa de fragmento. Os resultados foram submetidos ao Scaffold Software (Proteome Software, Portland, OR), e este software executou a análise X! Os parâmetros e bancos de dados eram os mesmos que os utilizados na pesquisa Mascot. Posteriormente, o Scaffold foi usado para compilar e atribuir pontuações de probabilidade. Considerou-se como proteína válida apenas as aquelas proteínas com pelo menos dois peptídeos atribuídos, taxa de falsos positivos (FDR) <1% e peptídeo e proteína com probabilidades superiores a 95% e 99%, respectivamente (WAGNER *et al.*, 2013).

6.2.10 Análise de bioinformática

As 70 proteínas identificadas nas glândulas salivares dos tabanídeos foram submetidas ao Interproscan através do Blast2GO de onde foram obtidos os Gene Ontologies (CONESA *et al.*, 2005).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Espécimes coletados

Foram coletados um total de 523 tabanídeos fêmeas no período de fevereiro de 2018 a fevereiro de 2019, sendo que as coletas efetivas, ou seja, as que resultaram em captura de algum indivíduo ocorreram nos meses de fevereiro, março, abril, novembro e dezembro de 2018 e janeiro e fevereiro de 2019. Nos demais meses não se evidenciou a presença de indivíduos, o que se traduz na ausência de indivíduos nas capturas (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Número de tabanídeos coletados usando-se isca equina durante os meses dos anos de 2018 e 2019, Lages/SC.

<small>mês ano</small>	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
2018	-	36	36	04	00	00	00	00	00	00	68	95
2019	160	124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: autor, 2019.

Os insetos foram capturados em quatro locais diferentes, Sítio 1 (4 exemplares), Sítio 2 (335 exemplares), Sítio 3 (42 exemplares) e Sítio 4 (143 exemplares).

Um total de 14 espécies e sete gêneros foram encontrados (**Tabela 2**), sendo que *Dichelacera (D.) alcicornis* foi a mais abundante, seguida por *Chrysops fuscipex* e *Chrysops patricia*, resultado semelhante a estudos anteriores (BASSI *et al.*, 2000; MILETTI *et al.*, 2011). As espécies menos abundantes são *Tabanus fuscus*, *T. nebulosus* e *Acanthocera kroeberi*.

Os dados foram comparados com os de estudos das regiões centro oeste e sudeste, onde uma metodologia semelhante foi utilizada, isso em função da falta de estudos sobre tabanídeos no sul do Brasil. O número de espécimes registrados durante as coletas no presente estudo sete gêneros e 14 espécies foi menor do que no Pantanal com 12 gêneros e 21 espécies capturados (BARROS, 2001) e menor também que no Estado de São Paulo (BOUVIER, 1952), possivelmente devido às menores temperaturas médias anuais no Estado de Santa Catarina, pois os tabanídeos geralmente preferem um ambiente com clima mais quente.

Comparado ao estudo anterior de Milette *et al.* (2011), foi encontrado um gênero a mais, *Catachlorops* spp., com cinco espécimes.

Tabela 2 – Espécies, gêneros e números de tabanídeos capturados usando-se isca equina nos anos de 2018 e 2019, Lages/SC.

Espécie	Quantidade	Porcentagem
<i>Dichelacera (D.) alcicornis</i>	276	52,77%
<i>Chrysops fuscipex</i>	94	17,97%
<i>Chrysops patricia</i>	56	10,70%
<i>Poeciloderas quadripunctatus</i>	23	4,39%
<i>Fidena nigripes</i>	17	3,25%
<i>Fidena longipalpis</i>	15	2,86%
<i>Tabanus colombensis</i>	15	2,86%
<i>Dichelacera (D.) januarii</i>	12	2,29%
<i>Acanthocera aureoscutellata</i>	5	0,95%
<i>Catachlorops</i> spp.	5	0,95%
<i>Tabanus</i> spp.	2	0,38%
<i>Acanthocera kroeberi</i>	1	0,19%
<i>Tabanus fuscus</i>	1	0,19%
<i>Tabanus nebulosus</i>	1	0,19%
Total	523	100%

Fonte: autor, 2019.

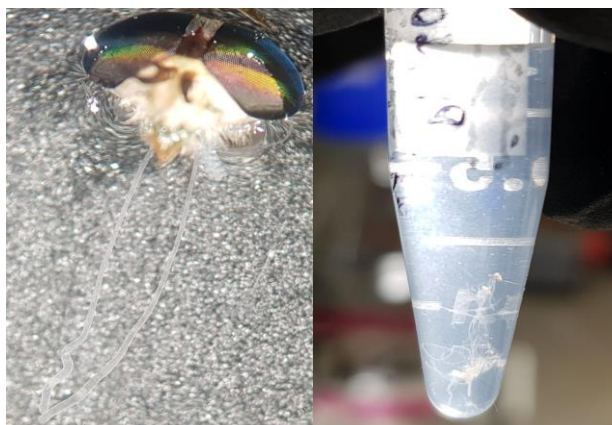
Em um primeiro trabalho com tabanídeos, Milette *et al.* (2011), do LABHEV do CAV - UDESC (Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina) em conjunto com o grupo do Museu Goeldi

identificaram membros da família Tabanidae na mesoregião do planalto serrano catarinense, sendo que algumas espécies nunca haviam sido descritas no Brasil. Este trabalho piloto tinha como objetivo inicial identificar as espécies de tabanídeos nessa região para poder correlacioná-las como vetores potenciais do *T. evansi*.

6.3.2 Glândulas salivares

Foram escolhidas as espécies mais prevalentes na região de Lages-SC para a retirada das glândulas salivares, dados obtidos segundo estudo prévio (MILETTI *et al.*, 2011), *D. (D.) alcornis*, *Fidena nigripes* e *D. (D.) januarii*. As glândulas salivares (**Figura 1**) foram retiradas com auxílio de estereomicroscópio e conservadas em PBS azida e congeladas para posterior extração de proteínas. Os extratos de proteínas das glândulas salivares foram obtidos e concentradas em acetona segundo protocolo de Cordeiro *et al.* (2009), sendo agrupadas em um “pool”, de acordo com a espécie, ou seja, um “pool” de glândulas salivares de *D. (D.) alcornis*, um segundo “pool” de glândulas salivares da espécie *Fidena nigripes* e um terceiro “pool” de glândulas salivares da espécie *D. (D.) januarii* que. O extrato dos três grupos de glândulas salivares foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) para obter-se um perfil protéico das mesmas.

Figura 1 – Glândula salivar de tabanídeo e armazenamento.

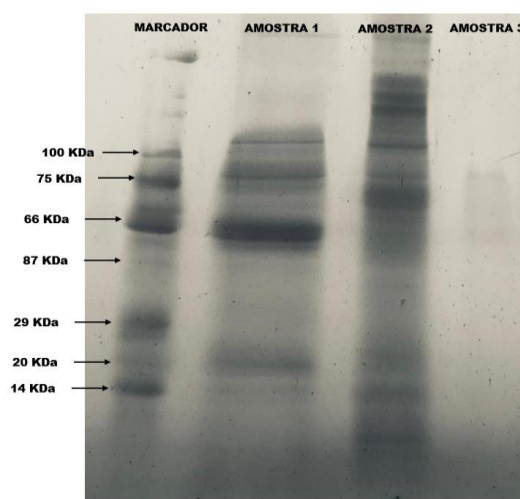


Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

O perfil eletroforético dos três grupos de glândulas salivares que foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) apresentou uma grande quantidade de proteínas que mostraram massas moleculares que variavam de menos de 14kDa a mais de 100kDa (**Figura 2**). Hempolchom e colaboradores (2019), trabalhando com extratos de

glândulas salivares de *Simulium nigrogilvum* e *S. nodosum* obtiveram um perfil eletroforético que variou, em termos de massa molecular, de 10kDa a 180kDa, o que difere do presente estudo.

Figura 2 – Perfil eletroforético de extrato de glândula salivar de tabanídeos em gel de poliacrilamida (SDS-Page).



Fonte: Acervo do autor, 2019.

Amostra 1 – “Pool” de extrato de glândula salivar de *D. (D.) allicornis*.

Amostra 2 – “Pool” de extrato de glândula salivar de *Fidena nigripes*.

Amostra 3 – “Pool” de extrato de glândula salivar de *D. (D.) januarii*.

Adicionado 5 µL das amostras 1, 2 e 3.

Quanto às proteínas encontradas nas glândulas salivares dos três grupos de tabanídeos (Amostras 1, 2 e 3) pesquisados, usando a metodologia descrita acima, foram identificadas um total de 70 proteínas (**Tabela 3**). Os contaminantes foram retirados da tabela, onde encontram-se as proteínas com dois ou mais peptídeos únicos. Deste total, 11 proteínas apareceram nas amostras 1, 2 e 3. Nas amostras 1 e 2 foram 33 proteínas em comum, e nas amostras 1 e 3 foram 12. Nas amostras 2 e 3, concomitantemente, apareceram 2 proteínas. Somente na amostra 1 foram 9 proteínas, na amostra 2 foram únicas 12 proteínas e na amostra 3 apenas 1.

Destas 70 proteínas, as que apresentaram maior representatividade foram aquelas envolvidas no processo de metabolismo dos carboidratos, provavelmente, em função do hábito alimentar dos tabanídeos, já que estes também utilizam suco de plantas ou néctar em sua dieta. Este dado é semelhante ao encontrado por Ribeiro e colaboradores (2015), estudando o sialoma de *Tabanus bromius*.

Proteínas com propriedades oxirredutoras também foram encontradas em grande quantidade nos extratos de glândula salivar dos tabanídeos pesquisados, especialmente as relacionadas com o metabolismo de ATP, GTP e ADP. Uma proteína denominada Tab1 foi encontrada por An e colaboradores (2011) e também demonstrou atividade enzimática para

hidrolisar ATP e ADP, sendo ainda um potente antiaglutinante de plaquetas e tendo atividade antitrombótica. Essa mesma proteína (Tab1) é uma apirase de 70 kDa, sendo encontrada na pele em 70% dos pacientes com quadro de alergia a picada de tabanídeos e 81% no soro sanguíneo destes (MA *et al.*, 2009). Kazimívorá (2001) *et al.* ressaltam que os tabanídeos possuem na glândula salivar inibidores de trombina diferentes para cada espécie estudada, sendo estas *Hybomitra muehlfeldi*, *Tabanus autumnalis*, *Haematopota pluvialis* e *Heptatoma pellucens*. No caso do gênero *Chrysops* spp. foi descrito um potente inibidor de agregação plaquetária induzida por trombina, ADP e colágeno, chamado crisoptina, uma proteína que atua como antagonista do receptor GPIIb/IIIa, que impede a ligação de plaquetas ativadas ao fibrinogênio com alta afinidade (REDDY *et al.*, 2000).

A atividade catalase, peroxidase com ligação ao grupo heme, ou heme-peroxidase, também foi encontrada, em pouca quantidade, diferentemente do que achou Ribeiro e colaboradores (2015). Essa proteína é encontrada em saliva de anofelinos e funciona como vasodilatador (RIBEIRO e VALENZUELA, 1999).

Além do poder expoliativo e da veiculação de patógenos, estudos em outros países (KAZIMÍROVÁ *et al.*, 2002) indicam que tabanídeos são uma fonte importantes de substâncias anti-hemostáticas e vasoativas. Em trabalho sobre os efeitos de extratos de glândula salivar de três espécies de tabanídeos em vasos cardíacos de ratos, Rajská *et al.* (2007), obtiveram resultados que sugerem a presença de substâncias vasoativas com efeitos sobre o miocárdio similares aos causados por antagonistas dos canais de cálcio. Rajská *et al.* (2003) já haviam demonstrado atividade vasodilatadora em extratos de glândula salivar de quatro espécies de tabanídeos. Em outro estudo uma potente atividade anticoagulante foi descoberta nas glândulas salivares de alguns representantes da subfamília Tabaninae. Um inibidor da trombina, isolada de *Tabanus bovinus*, foi denominado tabanina e atua como um inibidor da agregação plaquetária. Outro potente inibidor da glicoproteína IIb/IIIa de fibrinogênio foi isolado de *Chrysops* sp. da subfamília Chrysopsinae (GREVELINK *et al.*, 1993).

Segundo Kazimírová *et al.* (2001), a atividade anticoagulante de extratos de glândulas salivares obtidas de quatro espécies de tabanídeos provavelmente está baseada na inibição da trombina, porém, os compostos da saliva dos tabanídeos possuem outros locais de ação nos fatores da cascata de coagulação, sendo seus compostos uma excelente matéria prima para potencial uso farmacêutico.

Em pouca quantidade também, aparecem proteínas com função enzimática de peptidases, o que vem ao encontro do que Ribeiro e colaboradores (2015) reportam como tendo

possível ação fibrinolítica. Essas proteínas também podem estar envolvidas em processos alérgicos a picadas de tabanídeos, como a Tab 2, uma hialuronidase descrita em *Tabanus yao*, por Ma e colaboradores (2011) de peso molecular de 35 kDa que reage com IgE em 91,8% dos soros de indivíduos com reação alérgica. Essa mesma proteína (Tab 2) pode se combinar com IgE no soro de indivíduos com alergia à picada de vespas o que caracteriza a chamada Síndrome Vespa-Mutuca (FREYE e LITWIN, 1996; AN *et al.*, 2012).

Volfova *et al.* (2016), demonstraram uma atividade pronunciada de hialuronidase em dez espécies de tabanídeos dos gêneros *Chrysops*, *Haematopota*, *Hybomitra* e *Tabanus*. Comparado a outros insetos hematófagos, a capacidade das hialuronidases de tabanídeos em hidrolisar o ácido hialurônico (AH) é extremamente alta, o que poderia estar relacionado ao seu comportamento agressivo de picada, bem como à sua alta eficiência como vetores mecânicos. Por estarem supostamente envolvidos no aumento dos hematomas alimentares, as hialuronidases podem contribuir para a transmissão mecânica de patógenos. Os patógenos presentes nas peças bucais do vetor são inoculados no hospedeiro juntamente com a saliva e podem se beneficiar do aumento da permeabilidade tecidual e da atividade imunomoduladora da hialuronidase salivar.

Proteínas com atividade no transporte iônico, especialmente de cálcio, foram encontradas com relativa abundância, além de moléculas com domínio de ligação a proteínas e outros íons. Estas foram encontradas em pouca quantidade por Ribeiro e colaboradores (2015). Na saliva de carrapatos e insetos hematófagos, existem muitas proteínas que agem como eliminadoras de agonistas da hemostasia e da inflamação que são denominados kratagonistas (do Grego *kratos*=apreender) (RIBEIRO e ARCA, 2009).

Outras proteínas, em menor escala foram também encontradas, envolvidas em transporte transmembrana, processos metabólicos de ácidos carboxílicos, em propriedades estruturais moleculares e algumas com função de chaperonas.

Vale destacar que foram encontradas proteínas do complexo troponina, cuja troponina I encontrada em carrapatos é um potente inibidor de angiogênese, com alta capacidade de inibir a proliferação de células endoteliais (FUKUMOTO *et al.*, 2006). Também aparece uma proteína chamada angiomotina, isoforma 2, que é um fator de motilidade endotelial, ligada a angiogênese e é altamente expressa em tecidos tumorais humanos. Essa proteína é apontada como potencial alvo em terapia tumoral (JIANG *et al.*, 2006).

Nas três amostras também foram encontradas proteínas VSG (*Variant surface glycoprotein*) de *T. evansi*, sendo três espécies de tabanídeos diferentes, há grande possibilidade de estes estarem contaminados pelo protozoário. A equipe do LABHEV encontrou DNA de *T.*

evansi em PCR, confirmado por sequenciamento, em peças bucais *D. (D.) alcicornis* e *D. (D.) januarii*, nos mesmos insetos do presente estudo, amostras 1 e 3, respectivamente, (RAMOS *et al.*, 2019, no prelo).

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
XP_013100174.1;XP_013100154.1;XP_013100170.1;XP_013100169.1;XP_013100168.1;XP_013100167.1;XP_013100166.1;XP_013100165.1;XP_013100164.1;XP_013100163.1;XP_013100162.1;XP_013100161.1;XP_013100159.1;XP_013100158.1;XP_013100156.1;XP_013100157.1;XP_013100140.1;XP_013100173.1;XP_013100141.1;XP_013100142.1;XP_013100144.1;XP_013100145.1;XP_013100155.1;XP_013100146.1;XP_013100148.1;XP_013100150.1;XP_013100151.1;XP_013100152.1;XP_013100153.1;XP_013100147.1;XP_013100175.1;XP_013100172.1;XP_013100139.1	PREDICTED: myosin heavy chain, muscle isoform X31 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: myosin heavy chain, muscle isoform X13 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: myosin heavy chain, muscle isoform X28 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: myosin heavy chain, muscle isoform X2	F:motor activity; F:protein binding; F:ATP binding; C:myosin complex; F:actin filament binding	1,2 e 3
XP_013117562.1;JAI17574.1;XP_013105723.1;XP_013118517.1;XP_013118516.1;XP_013099722.1;XP_013099720.1;CON__ENSEMBL:ENSBTAP00000025008	PREDICTED: tubulin beta-1 chain [<i>Stomoxys calcitrans</i>];putative the tubulin superfamily includes five distinct family [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: tubulin beta-2 chain [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:GTPase activity; F:structural constituent of cytoskeleton; F:GTP binding; C:microtubule; P:microtubule-based process	1 e 2
JAI16006.1;XP_013110510.1	putative nad-dependent malate dehydrogenase [<i>Tabanus bromius</i>]	F:catalytic activity; P:carbohydrate metabolic process; P:tricarboxylic acid cycle; F:oxidoreductase activity; F:oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor; P:carboxylic acid metabolic process; F:L-malate dehydrogenase activity; P:oxidation-reduction process	1,2 e 3
JAI17560.1	putative glutathione s-transferase s1-like isoform x1 [<i>Tabanus bromius</i>]	F:protein binding	1,2 e 3
JAI14841.1;XP_013110892.1	putative tropomyosin-2-like isoform x2 [<i>Tabanus bromius</i>]	no GO terms	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
XP_013108459.1;XP_013100819.1;XP_013100818.1;JAI17581.1;TevSTIB805.9.6300-t26_1-p1;TevSTIB805.9.6310-t26_1-p1	PREDICTED: actin-5C [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: actin-5C [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: actin-5C [<i>Stomoxys calcitrans</i>];putative actin-2 [<i>Tabanus bromius</i>]	no GO terms	1,2 e 3
XP_013112831.1;JAI17576.1;JAI16141.1;XP_013103250.1	PREDICTED: tubulin alpha-1 chain [<i>Stomoxys calcitrans</i>];putative the tubulin superfamily includes five distinct family [<i>Tabanus bromius</i>];putative the tubulin superfamily includes five distinct family [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: tubulin alpha-2 chain	F:GTPase activity; F:structural constituent of cytoskeleton ; F:GTP binding; C:microtubule; P:microtubule-based process	1 e 2
JAI16138.1;TevSTIB805.10.7270-t26_1-p1	putative glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [<i>Tabanus bromius</i>]	P:glucose metabolic process; F:oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor; F:NADP binding; F:NAD binding; P:oxidation-reduction process	1,2 e 3
JAI17327.1;XP_013109000.1	putative histone h2b [<i>Tabanus bromius</i>]	C:nucleosome; F:DNA binding; F:protein heterodimerization activity	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI17439.1;XP_013105601.1	putative citrate synthase [<i>Tabanus bromius</i>]	F:citrate (Si)-synthase activity; P:tricarboxylic acid cycle; P:citrate metabolic process; F:transferase activity, transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer	1 e 2
JAI15940.1	putative calponin similarity domain-containing protein ddb g0272472-like isoform x19 [<i>Tabanus bromius</i>]	no GO terms	1 e 2
XP_013100645.1	PREDICTED: glycogen phosphorylase [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:phosphorylase activity; P:carbohydrate metabolic process; F:glycogen phosphorylase activity; F:pyridoxal phosphate binding	3
XP_013108612.1	PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:catalytic activity; F:fructose-bisphosphate aldolase activity; P:glycolytic process	1 e 2
XP_013110860.1;XP_013110883.1;XP_013110861.1;XP_013110865.1;XP_013110866.1;XP_013110867.1;XP_013110868.1;XP_013110869.1;XP_013110870.1;XP_013110871.1;XP_013110872.1;XP_013110875.1;XP_013110877.1;XP_013110878.1;XP_013110886.1;XP_013110884.1;XP_013110873.1;XP_013110876.1;XP_013110879.1;XP_013110880.1;XP_013110862.1;XP_013110864.1;XP_013110881.1;XP_013110882.1	PREDICTED: stress response protein NST1 isoform X1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: tropomyosin-2 isoform X22 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: angiominin isoform X2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: protein MLP1 homolog isoform X5 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PRED	no GO terms	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI16701.1;XP_013116013.1;XP_013116006.1;XP_013115999.1;XP_013115991.1;XP_013118130.1	putative sodium/potassium-transporting atpase subunit alpha-like isoform x5, partial [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha isoform X4 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit al	F:nucleotide binding; F:ATP binding; P:potassium ion transport; F:potassium transmembrane transporter activity, phosphorylative mechanism; C:integral component of membrane	2 e 3
JAI16356.1;XP_013105069.1;TevSTIB805.11_01.7070-t26_1-p1;XP_013110502.1;JAI16083.1	putative multifunctional chaperone [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: 14-3-3 protein zeta [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:protein domain specific binding	1,2 e 3
JAI16313.1;XP_013103999.1;XP_013103998.1;XP_013103997.1	putative creatine kinase [<i>Tabanus bromius</i>]	F:catalytic activity; F:creatine kinase activity; F:kinase activity; F:transferase activity, transferring phosphorus-containing groups; P:phosphocreatine biosynthetic process	1,2 e 3
JAI16263.1;XP_013117573.1	putative heat shock 70 kda protein cognate 4 [<i>Tabanus bromius</i>]	no GO terms	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI16274.1;XP_013109680.1;TevSTIB805.10.11560-t26_1-p1;TevSTIB805.10.11550-t26_1-p1;TevSTIB805.10.11530-t26_1-p1;TevSTIB805.10.11520-t26_1-p1;TevSTIB805.10.11500-t26_1-p1;TevSTIB805.10.11490-t26_1-p1;TevSTIB805.10.11480-t26_1-p1;TevSTIB805.10.11470-t26_1-p1	putative heat shock protein 83 isoform a, partial [<i>Tabanus bromius</i>]	F:ATP binding; P:protein folding; F:unfolded protein binding	1 e 2
XP_013106515.1;XP_013106514.1;XP_013106513.1;XP_013106512.1;XP_013106511.1;XP_013106510.1;XP_013106509.1	PREDICTED: troponin T, skeletal muscle isoform X7 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: troponin T, skeletal muscle isoform X6 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: troponin T, skeletal muscle isoform X5 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: troponin T, skeletal muscle i [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: troponin T, skeletal muscle isoform X6 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: troponin T	C:troponin complex; P:regulation of muscle contraction	1
JAI16296.1;XP_013100561.1;TevSTIB805.10.15600-t26_1-p1;TevSTIB805.10.15590-t26_1-p1;TevSTIB805.10.15580-t26_1-p1	putative adp/atp transporter on adenylate translocase, partial [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: ADP,ATP carrier protein-like [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	C:mitochondrial inner membrane; F:transmembrane transporter activity; P:transmembrane transport	1,2 e 3
JAI15922.1;XP_013111035.1;XP_013111034.1;XP_013111033.1	putative heat shock protein [<i>Tabanus bromius</i>]	no GO terms	1
JAI17490.1;XP_013099322.1;XP_013099321.1	putative enolase, partial [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: enolase [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: enolase [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	C:phosphorylate hydratase complex; F:magnesium ion binding; F:phosphorylate hydratase activity; P:glycolytic process	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
XP_013101849.1;XP_013101848.1;XP_013101847.1	PREDICTED: calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type isoform X2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type isoform X1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: calcium-transporting	F:nucleotide binding; F:calcium transmembrane transporter activity, phosphorylative mechanism; F:ATP binding; C:endoplasmic reticulum; P:calcium ion transport; C:integral component of membrane; P:calcium ion transmembrane transport	2 e 3
JAI17466.1;XP_013099919.1	putative ubiquinone oxidoreductase ndufv2/24 kd subunit [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process	1 e 2
JAI17486.1;XP_013106761.1	putative 3-phosphoglycerate kinase [<i>Tabanus bromius</i>]	F:phosphoglycerate kinase activity; P:glycolytic process	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI17523.1;XP_013105294.1	putative isocitrate dehydrogenase gamma subunit [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: probable isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:magnesium ion binding; F:isocitrate dehydrogenase (NAD+) activity; P:tricarboxylic acid cycle; F:oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor; F:NAD binding; P:oxidation-reduction process	1 e 2
JAI15673.1	putative ca ²⁺ -binding actin-bundling protein [<i>Tabanus bromius</i>]	F:calcium ion binding; F:protein binding	1 e 2
JAI17152.1	putative mitochondrial-processing peptidase subunit beta-like protein [<i>Tabanus bromius</i>]	F:catalytic activity; F:metalloendopeptidase activity; P:proteolysis; F:metal ion binding	1 e 2
JAI17491.1	putative phosphoglycerate mutase [<i>Tabanus bromius</i>]	F:catalytic activity; F:phosphoglycerate mutase activity; P:glycolytic process; F:intramolecular transferase activity, phosphotransferases	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI17550.1	putative tryparedoxin peroxidase [<i>Tabanus bromius</i>]	F:antioxidant activity; F:oxidoreductase activity; P:cell redox homeostasis; F:peroxiredoxin activity; P:oxidation-reduction process	1
AMR55521.1;ACH91551.1;CAE53260.1;XP_013116744.1;JAI16297.1;TevSTIB805.10.2250-t26_1-p1;TevSTIB805.10.2270-t26_1-p1;TevSTIB805.10.2260-t26_1-p1;XP_013110151.1;XP_013110150.1;JAI15576.1	translation elongation factor 1-alpha, partial [<i>Stomoxys calcitrans</i>];elongation factor 1 alpha, partial [<i>Stomoxys calcitrans</i>];elongation factor 1-alpha, partial [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: elongation factor 1-alpha 1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];putative elo	F:GTPase activity; F:GTP binding	1,2 e 3
JAI16951.1;XP_013098961.1;XP_013098960.1;XP_013098959.1;XP_013098958.1;XP_013098957.1;XP_013098956.1;XP_013098955.1;XP_013098954.1;XP_013098953.1;XP_013098952.1	putative cytoskeletal protein adducin [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: protein hu-li tai shao isoform X6 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: protein hu-li tai shao isoform X5 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: protein hu-li tai shao isoform X4 [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	no GO terms	1
AGM21236.1;AGM21234.1;AGM21226.1;AGM21174.1;ANR94993.1;ANR94984.1;ANR94983.1;ANR94982.1;ANQ91918.1;ACC86229.1	cytochrome oxidase subunit II, partial (mitochondrion) [<i>Fidena rhizophora</i>];cytochrome oxidase subunit II, partial (mitochondrion) [<i>Fidena nr. pallidula</i> BDL-2013];cytochrome oxidase subunit II, partial (mitochondrion) [<i>Fidena nr. pallidula</i> BDL-2013];cytochr	F:cytochrome-c oxidase activity; F:copper ion binding; C:membrane; C:integral component of membrane; F:oxidoreductase activity; P:electron transport chain	2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI17426.1;AKX33716.1;QBQ07267.1;AOG60021.1;ATZ21323.1;ATZ19224.1;ATQ35275.1;TevSTIB805.7.8160-t26_1-p1;TevSTIB805.7.8150-t26_1-p1	putative f0f1-type atp synthase alpha subunit [<i>Tabanus bromius</i>]	F:ATP binding; P:ATP synthesis coupled proton transport; F:adenyl ribonucleotide binding; C:proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1); P:ATP metabolic process; F:proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; P:proton transmembrane transport	2
JAI16137.1;XP_013109718.1;XP_013109717.1;XP_013109716.1;XP_013109715.1;XP_013109714.1	putative ezrin/radixin/moesin family, partial [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: moesin/ezrin/radixin homolog 1 isoform X4 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: moesin/ezrin/radixin homolog 1 isoform X3 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: moesin/ezrin/radixin homolog 1	F:actin binding; C:cytoskeleton; F:cytoskeletal protein binding	2
XP_013102193.1;JAI16213.1;XP_013097603.1;XP_013097602.1;XP_013097601.1;XP_013112893.1	PREDICTED: V-type proton ATPase catalytic subunit A isoform 1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];putative vacuolar h+-atpase v1 sector subunit a [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: V-type proton ATPase catalytic subunit A isoform 2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: V-type prot	F:ATP binding; C:proton-transporting V-type ATPase, VI domain; P:ATP metabolic process; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; P:proton transmembrane transport	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI15863.1;XP_013119524.1;XP_013119523.1;XP_013119522.1;XP_013119521.1	putative annexin [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: annexin B9 isoform X1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: annexin B9 isoform X3 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: annexin B9 isoform X2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: annexin B9 isoform X1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:calcium ion binding; F:calcium-dependent phospholipid binding	1 e 2
JAI15243.1;XP_013117729.1;JAI16077.1;XP_013112961.1	putative histone 2a [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: histone H2A-like [<i>Stomoxys calcitrans</i>];putative histone 2a [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: histone H2A.v [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	C:nucleosome; F:DNA binding; C:nucleus; F:protein heterodimerization activity	1
XP_013100061.1;XP_013100060.1;XP_013100059.1;XP_013100058.1	PREDICTED: glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic isoform X4 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic isoform X3 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	F:glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] activity; P:carbohydrate metabolic process; P:glycerol-3-phosphate metabolic process; C:glycerol-3-phosphate dehydrogenase complex; F:oxidoreductase activity; F:oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor; F:protein homodimerization activity; P:glycerol-3-phosphate catabolic process; F:NAD binding; P:oxidation-reduction process	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
XP_013102659.1;XP_013102658.1;XP_013102657.1;XP_013102661.1	PREDICTED: alpha-actinin, sarcomeric isoform X2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: alpha-actinin, sarcomeric isoform X1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: alpha-actinin, sarcomeric isoform X1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: alpha-actinin, sarcomeric isoform X	F:calcium ion binding; F:protein binding	2
XP_013112772.1;XP_013112771.1;XP_013112770.1;XP_013112769.1	PREDICTED: spectrin alpha chain isoform X4 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: spectrin alpha chain isoform X3 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: spectrin alpha chain isoform X2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: spectrin alpha chain isoform X1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:calcium ion binding; F:protein binding	1 e 2
XP_013114010.1;XP_013102502.1;XP_013098905.1;XP_013100389.1	PREDICTED: actin-57B [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: actin-87E [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: actin, indirect flight muscle [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: actin-5, muscle-specific [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	no GO terms	1,2 e 3
JAI16289.1;XP_013101349.1;XP_013101348.1	putative voltage-dependent anion-selective channel [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: voltage-dependent anion-selective channel [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: voltage-dependent anion-selective channel [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	C:mitochondrial outer membrane; F:voltage-gated anion channel activity; P:transmembrane transport; P:anion transmembrane transport	1 e 2
JAI17510.1;XP_013117770.1;XP_013117763.1	putative glucose-6-phosphate isomerase, partial [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: glucose-6-phosphate isomerase [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: glucose-6-phosphate isomerase [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:glucose-6-phosphate isomerase activity; P:gluconeogenesis; P:glycolytic process	1,2 e 3

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI17514.1;XP_013113327.1;XP_013113326.1	putative glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenase [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: glutamate dehydrogenase, mitochondrial isoform X2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: glutamate dehydrogenase, mitochondrial isoform X1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	P:cellular amino acid metabolic process; F:oxidoreductase activity; F:oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors, NAD or NADP as acceptor; P:oxidation-reduction process	2
JAI17520.1;XP_013117128.1;XP_013117127.1	putative isocitrate dehydrogenase alpha subunit [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial isoform X2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mitochondrial isoform X1	F:isocitrate dehydrogenase (NAD+) activity; P:tricarboxylic acid cycle; F:oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor; P:oxidation-reduction process	1 e 2
JAI15954.1;JAI17165.1	putative 23kda heat shock protein schsp23 [<i>Tabanus bromius</i>];putative heat shock protein 23 [<i>Tabanus bromius</i>]	no GO terms	1
JAI16011.1;XP_013098983.1	putative nadh-ubiquinone oxidoreductase ndufs3/30 kda subunit, partial [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity; F:oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H; P:oxidation-reduction process	1 e 2
JAI16041.1;XP_013111179.1	putative cytochrome c1 [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: cytochrome c1, heme protein, mitochondrial [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:electron transfer activity; F:heme binding	1 e 2
JAI16195.1;XP_013116109.1	putative 60s acidic ribosomal protein [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P0 [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	P:ribosome biogenesis	1

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI16208.1;XP_013099918.1	putative vacuolar h ⁺ -atpase v1 sector subunit b, partial [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: V-type proton ATPase subunit B [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:ATP binding; C:proton-transporting V-type ATPase, V1 domain; P:ATP metabolic process; P:proton transmembrane transport	1 e 2
JAI17181.1;XP_013109150.1	putative prohibitin-like protein [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: prohibitin-2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	C:membrane	1
JAI17380.1;XP_013107190.1	putative 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase, partial [<i>Tabanus bromius</i>]	F:3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity; P:fatty acid metabolic process; F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process	1 e 2
JAI17432.1;XP_013118702.1	putative mitochondrial f1f0-atp synthase [<i>Tabanus bromius</i>];PREDICTED: putative ATP synthase subunit f, mitochondrial [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	no GO terms	2
XP_013101694.1;XP_013101692.1	PREDICTED: pyruvate carboxylase, mitochondrial isoform X2 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: pyruvate carboxylase, mitochondrial isoform X1 [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:catalytic activity; F:pyruvate carboxylase activity; F:ATP binding; P:pyruvate metabolic process; P:gluconeogenesis; F:biotin binding; F:metal ion binding	2
XP_013101826.1;JAI16082.1	PREDICTED: cofilin/actin-depolymerizing factor homolog [<i>Stomoxys calcitrans</i>];putative cofilin/actin-depolymerizing factor [<i>Tabanus bromius</i>]	F:actin binding; C:actin cytoskeleton; P:actin filament depolymerization	2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
XP_013103050.1;XP_013103049.1	PREDICTED: heat shock 70 kDa protein cognate 3 [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: heat shock 70 kDa protein cognate 3 [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	no GO terms	1 e 2
XP_013104674.1;XP_013104673.1	PREDICTED: ADP,ATP carrier protein [<i>Stomoxys calcitrans</i>];PREDICTED: ADP,ATP carrier protein [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	C:mitochondrial inner membrane; F:transmembrane transporter activity; P:transmembrane transport	2
JAI14915.1	putative actin-related protein, partial [<i>Tabanus bromius</i>]	no GO terms	1 e 2
JAI14947.1	putative myosin regulatory light chain 2 [<i>Tabanus bromius</i>]	F:calcium ion binding	1 e 3
JAI15364.1	putative pyruvate kinase, partial [<i>Tabanus bromius</i>]	F:magnesium ion binding; F:catalytic activity; F:pyruvate kinase activity; P:glycolytic process; F:potassium ion binding	1 e 2
JAI15456.1	putative catalase, partial [<i>Tabanus bromius</i>]	F:catalase activity; P:response to oxidative stress; F:heme binding; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:oxidation-reduction process	2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (continua)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
JAI16117.1	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase/dihydroxyacetone 3-phosphate reductase [<i>Tabanus bromius</i>]	F:glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] activity; P:carbohydrate metabolic process; P:glycerol-3-phosphate metabolic process; C:glycerol-3-phosphate dehydrogenase complex; F:oxidoreductase activity; F:oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor; F:protein homodimerization activity; P:glycerol-3-phosphate catabolic process; F:NAD binding; P:oxidation-reduction process	1 e 2
JAI17169.1	putative calreticulin, partial [<i>Tabanus bromius</i>]	F:calcium ion binding; F:protein binding; C:endoplasmic reticulum; P:protein folding; F:unfolded protein binding	1
JAI17498.1	putative dimeric dihydrodiol dehydrogenase [<i>Tabanus bromius</i>]	F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process	2
XP_013100200.1	PREDICTED: probable aconitate hydratase, mitochondrial [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:aconitate hydratase activity; P:tricarboxylic acid cycle; F:4 iron, 4 sulfur cluster binding	1 e 2

Tabela 3 – Principais proteínas encontradas nas glândulas salivares nos três grupos de tabanídeos pesquisados (Amostras 1, 2 e 3) (conclusão)

IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	DESCRIÇÃO	FUNÇÃO	AMOSTRAS
XP_013108363.1	PREDICTED: ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:ATP binding; P:ATP synthesis coupled proton transport; F:adenyl ribonucleotide binding; C:proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1); P:ATP metabolic process; F:proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; P:proton transmembrane transport	1 e 2
XP_013111119.1	PREDICTED: dynein heavy chain 5, axonemal [<i>Stomoxys calcitrans</i>]	F:microtubule motor activity; F:ATP binding; P:microtubule-based movement; C:dynein complex	2

Fonte: autor, 2019.

Tabanídeos ainda são pouco estudados, poucos pesquisadores dedicam-se a estes insetos, mesmo a sistemática, área mais estudada, é pouco explorada. Os machos, em 50% das espécies, não está descrito, estágios imaturos de 96% das espécies não foram descritos. A biologia deste grupo é pouco conhecida em função da dificuldade de se manter um ciclo em cativeiro. A distribuição geográfica é pouco conhecida, faltam dados ecológicos, estudos biogeográficos, de biologia molecular, etológicos e citológicos. Há carência de comparação filogenética (MARCONDES, 2001).

Desta forma, os poucos trabalhos envolvendo biologia molecular usando tabanídeos são de grande valor na geração de dados, conhecimento científico e epidemiológico, mesmo que somente apresentem dados brutos. Muitos dos dados aqui apresentados são inéditos.

Os tabanídeos são negligenciados epidemiologicamente e são poucos os estudos moleculares feitos com estes insetos, por terem características pouco conhecidas e estudadas. Deve-se observar que essas características são diferentes daquelas de outras moscas superiores

que evoluíram independentemente para hematofagia, como a tsé-tsé *Glossina morsitans morsitans* (ALVES-SILVA *et al.*, 2010), que não se alimentam de açúcar, não têm glicosidases salivares e possuem grandes quantidades de uma endonuclease inativa com função desconhecida e várias famílias peptídicas únicas, ou *Stomoxys calcitrans* (WANG *et al.*, 2009) que possuem grandes quantidades de uma família de antígeno não RGD 5 que se liga a imunoglobulinas (AMERI *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2015). Moscas estas largamente investigadas.

6.4 CONCLUSÃO

Foram identificadas 70 proteínas em três amostras nos extratos de glândula salivar de *D. (D.) alcornis*, *D. (D.) januarii* e *Fidena nigripes*.

As proteínas identificadas apresentam funções nos processos metabólicos dos ácidos carboxílicos, proteínas, carboidratos e energético, bem como funções estruturais, oxirredutoras, de transporte e enzimático.

A proteína angiomotina isoforma 2 foi encontrada nos extratos de glândula salivar de *D. (D.) alcornis* e *Fidena nigripes*. Essa proteína é apontada como alvo potencial em terapia tumoral, dado importante em pesquisas a serem desenvolvidas.

6.5 REFERÊNCIAS

ALVES-SILVA J.; *et al.* An insight into the sialome of *Glossina morsitans morsitans*. **BMC genomics**, v. 11, p. 213, 2010.

AMERI, M.; *et al.* An immunoglobulin binding protein (antigen 5) of the stable fly (Diptera: Muscidae) salivary gland stimulates bovine immune responses. **J. Med. Entomol.**, v. 45, p. 94–101, 2008.

AN, S.; *et al.* A novel allergen Tab y 1 with inhibitory activity of platelet aggregation from salivary glands of horseflies. **Allergy**, Copenhagen, v. 66, n. 11, p. 1420-1427, 2011.

AN, S.; *et al.* Purification and Characterization of Two New Allergens from the Venom of *Vespa magnifica*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, e31920, 2012.

BASSI, R. M. A.; CUNHA, M. C. I.; COSCARON, S. A study of behavior of tabanids (Diptera, Tabanidae) from Brazil. **Acta Biol. Paran.**, v. 29, p. 101–115, 2000.

BARROS, A. T. M.; GORAYEB, I. D. S. A checklist and identification key to the Tabanids (Diptera: Tabanidae) from Nhecolandia subregion of the Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Bras. de Bio.**, v. 56, p. 547-551, 1996.

BARROS, A. T. M. Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Díptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 917-923, 2001.

BOUVIER, G. Notes sur le Tabanides de la region de Campinas (Estado de São Paulo). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.50, p. 581-595, 1952.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-256, 1976.

CHRISTEN, S. E.; *et al.* SECTAB - A New Device for Tabanid Storage in Field Collections. **Neotrop. Entomol.**, v. 38, n. 6, p. 883-884, 2009.

CIDADE-BRASIL. **Município de Lages. 2019.** Página inicial. Disponível em: <<https://www.cidade-brasil.com.br/municipio-lages.html#desc>>. Acesso em: 20 de jun. de 2019.

CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 25, p. 250-262, 2003.

CORDERO, M. E.; *et al.* Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. **J. Proteome Res.**, v. 8, n. 7, p. 3642-3652, 2009.

CONESA, A.; *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674-3676, 2005.

FAIRCHILD, G. B. Notes on Neotropical Tabanidae. XII. Classification and distribution, with keys to genera and subgenera. **Arq. Zoo.**, São Paulo, v. 17, p. 199-255, 1969.

FERREIRA, R. L. M.; RAFAEL, J. A. Criação de imaturos de mutuca (Tabanidae: Diptera) utilizando briófitas e areia com substrato. **Neotrop. Entomol.**, v. 35, p. 141-144, 2006.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ícone, 1997.

FREYE, H. B.; LITWIN, C. Coexistent anaphylaxis to Diptera and Hymenoptera. **Annals of Allerg., Asth. & Immunol.**, Jackson, v. 76, n. 3, p. 270-272, 1996.

FUKUMOTO, S.; *et al.* Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. **Microv. Research**, v. 71, p. 218-221, 2006.

GREVELINK, S. A.; YOUSSEF, D. E.; LOSCALZO, J. Salivary gland extracts from the deerfly contain a potent inhibitor of platelet aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 9155-9158, 1993.

HEMPOLCHOM, C.; *et al.* Proteomes of the female salivary glands of *Simulium nigrogilvum* and *Simulium nodosum*, the main human-biting black flies in Thailand. **Acta Tropica**, v. 194, p. 82-88, 2019.

JIANG, W.G.; *et al.* Angiomotin and angiomotin like proteins, their expression and correlation with angiogenesis and clinical outcome in human breast cancer. **BMC Cancer**, p. 6-16, 2006.

MA, D.; *et al.* Anti-thrombosis repertoire of bloodfeeding horsefly salivary glands. **Mol. & Cell. Proteomics**, v. 8, p. 2071-2079, 2009.

KAZIMÍROVÁ, M.; SULANOVÁ, M.; TRIMNELL, A. R. Anticoagulant activities in salivary glands of tabanid flies. **Med. Vet. Entomol.**, v. 16, p. 301-309, 2002.

KAZIMÍVORÁ, M.; *et al.* Identification of Anticoagulant Activities in Salivary Gland Extracts of four Horsefly Species (Diptera, Tabanidae). Anticoagulant Proteins and Diagnostic Agents. **Haemostasis**, v. 31, p. 294-305, 2001.

KLEIN, R. M. **Mapa fitogeográfico do Estado de Santa Catarina**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 24p., 1978.

MA, D.; *et al.* Purification and characterization of two new allergens from the salivary glands of the horsefly, *Tabanus yao*. **Allergy**, v. 66, p. 101-109, 2011.

MILETTI, L. C.; *et al.* Prevalence, seasonality and behaviour of Tabanidae (Diptera) captured on a horse in the Planalto Serrano of Santa Catarina State, Brazil. **Int. J. Trop. Insect. Sci.** v. 31, n. 1-2, p. 122-126, 2011.

OLIVEIRA, M. T.; BARAU, J. G.; JUNQUEIRA, A. C. M., Structure and evolution of the mitochondrial genomes of *Haematobia irritans* and *Stomoxys calcitrans*. The Musc. (Diptera: Calyptratae) perspe. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 48, p. 850-857, 2007.

RAJSKÁ, P.; *et al.* Effects of horsefly (Tabanidae) salivary gland extracts on isolated perfused rat heart. **Med. Vet. Entomol.**, v. 21, p. 384-389, 2007.

RAJSKÁ, P.; *et al.* Vasodilatory activity in horsefly and deerfly salivary glands. **Med. Vet. Entomol.**, v. 17, p. 395-402, 2003.

RAMOS, C. J. R.; *et al.* **Trypanosoma evansi e T. vivax em tabanídeos, da floresta ombrófila mista na região de Lages, SC.** Lages, 2019. No prelo.

REDDY, V. B.; *et al.* Chrysoptin is a potent glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen receptor antagonist present in salivary gland extracts of the deerfly. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 21, p. 15861-15867, 2000.

RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G. Purification and cloning of the salivary peroxidase/catechol oxidase of the mosquito *Anopheles albimanus*. **J. Exp. Biol.**, v. 202, p. 809–816, 1999.

RIBEIRO, J. M. C.; ARCA, B. From sialomes to the sialoverse: An insight into the salivary potion of blood feeding insects. **Adv. Insect. Physiol.**, v. 37, p. 59–118, 2009.

RIBEIRO, J. M. C.; *et al.* An insight into the sialome of the horse fly, *Tabanus bromius*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 65, p. 83–90, 2015.

SANTA CATARINA. Fundação do Meio Ambiente (FATMA). **Lista comentada de espécies exóticas invasoras no estado de Santa Catarina: espécies que ameaçam a diversidade biológica.** Silvia R. Ziller (consultora). Floarianópolis: FATMA, 2016. 88p.

TURCATEL, M.; CARVALHO, C. J. B.; RAFAEL, J. A. Horse flies (Diptera: Tabanidae) of Paraná State, Brazil: pictorial identification key for subfamilies, tribes and genera. **Biota Neotrop.**, v. 7, p. 265-278, 2007.

VIBRANS, A. C.; SEVEGNANI, L.; GASPER, A. L.; *et al.* **Floresta ombrófila mista.** Blumenau: Edifurb, 2013. 440p.

VOLFOVA, V; TOTHOVA, V; VOLF, P. Hyaluronidase activity in the salivary glands of tabanid flies. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 73, p. 38-46, 2016.

WAGNER, G.; *et al.* The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. **J. Proteom.**, v. 82, p. 52-63, 2013.

WANG, X.; *et al.* An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 39, p. 607–614, 2009.