

## CAPÍTULO 7

1

# Os Múltiplos Papéis dos Radicais Livres na Biologia e na Evolução dos Insetos.

---

Ana C. P. Gandara<sup>1,2</sup>, Felipe Dias<sup>1,2</sup>, José Henrique M. Oliveira<sup>1</sup>, Renata Gonçalves<sup>1</sup>, Pedro L Oliveira<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos, Instituto de Bioquímica Médica. Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP: 21941-590.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular -INCTEM.

Copyright: © 2012 [Ana C. P. Gandara, Felipe Dias, José Henrique M. Oliveira, Renata Gonçalves, Pedro L Oliveira]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## Considerações Iniciais.

Os radicais livres são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, o que leva estas moléculas a participarem de reações de oxidação (perda de elétrons) ou redução (ganho de elétrons). As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) são moléculas derivadas do oxigênio que podem funcionar como agentes redutores ou oxidantes<sup>1</sup>). No ambiente celular, é comum a presença de radicais livres derivados do oxigênio, formados durante o metabolismo oxidativo. Durante a evolução da vida na terra, a formação de radicais livres ocorreu após uma mudança do metabolismo energético, que se deu após o aumento dos níveis atmosféricos de oxigênio gerado pelo surgimento de organismos fotossintéticos, originando diversas respostas adaptativas na maioria dos organismos, como o surgimento das mitocôndrias e da respiração e o desenvolvimento de mecanismos antioxidantes. Dentre as ROS mais importantes estão o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ). O sítio mais importante de formação de ROS na maioria das células ocorre durante a própria respiração, no processo de fosforilação oxidativa que acontece na mitocôndria, onde os substratos reduzidos do metabolismo são completamente oxidados e os seus elétrons transferidos ao oxigênio, gerando água (produto da adição de quatro elétrons ao oxigênio). Apesar da maior parte do  $O_2$  consumido (mais de 90 %) ser completamente reduzida a  $H_2O$  na mitocôndria da maioria das células, uma fração que varia de 0,1 até 4% do total de  $O_2$  consumido pode ser reduzido apenas parcialmente (Nicholls and Ferguson, 2002), gerando espécies reativas de oxigênio.

## O Sucesso Evolutivo dos Insetos e o Oxigênio.

A formação de ROS desempenha uma série de papéis na manutenção da homeostase como, por exemplo, na ação antimicrobiana dos ROS produzidos por células fagocíticas do sistema imune em quase todos os metazoários estudados. A geração de ROS que acontece fisiologicamente nas células e em níveis controlados desempenham um papel importantíssimo na sinalização celular (Winterbourn, 2008). Por outro lado, a geração descontrolada de ROS pode levar à oxidação de proteínas, DNA e lipídeos causando danos que podem culminar na morte celular. Quando existe um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a ação dos mecanismos antioxidantes, ocorre o que se chama estresse oxidativo.

O filo Arthropoda compreende uma vasta quantidade de espécies e pode ser considerado o grupo de maior sucesso evolutivo entre os metazoários (organismos multicelulares). Dentre os representantes deste filo, estão os insetos que somam mais de um milhão de espécies descritas. Calcula-se que a todo instante cerca de  $10^{19}$  insetos nasçam, o que significa dizer que existem 200 milhões de insetos para cada homem, mulher e criança que há na terra! Os

---

<sup>1</sup> A expressão “espécies reativas” compreende tanto os chamados radicais livres (compostos que possuem elétrons não pareados) como espécies não-radicalares (mas que são particularmente reativas, como o peróxido de hidrogênio).

insetos surgiram no período siluriano há mais de 400 milhões de anos atrás (Engel and Grimaldi, 2004) e experimentaram um período fundamental da sua evolução - durante o qual foram originadas todas as ordens de insetos atualmente existentes - em um intervalo de aproximadamente 100 milhões de anos (350 a 250 milhões de anos passados) onde a concentração de oxigênio era próxima de 30 %, significativamente mais alta do que os 22% atualmente existentes. O sistema respiratório dos insetos é constituído por um sistema de aberturas na cutícula, a partir das quais, uma série de canais se ramificam pelo interior do corpo, sendo a entrada do oxigênio (e a saída do CO<sub>2</sub> para o exterior) baseada na difusão ao longo de um gradiente de concentração, o que se acredita que seja um dos principais fatores que limitam o crescimento dos insetos. Coerentemente com essa idéia, fósseis de insetos que viviam nesse período de maior concentração de O<sub>2</sub> revelaram a existência de insetos gigantes, como libélulas de mais de 70 cm de envergadura! Por outro lado, também como consequência desse período, os insetos são um grupo de animais capaz de sobreviver em um ambiente bastante mais oxidante do que a nossa atmosfera atual. Essa capacidade pode ser atribuída à posse de mecanismos antioxidantes bastante robustos, capazes de detoxificar radicais livres de oxigênio.

Neste capítulo, sem pretensão de exaurir o tema, procuraremos descrever alguns aspectos da biologia de insetos onde o metabolismo de radicais livres desempenha um papel relevante.

### **Radicais Livres e Herbivoria.**

Muitas plantas respondem à predação por insetos com um aumento acentuado da produção de espécies reativas de oxigênio. A produção aumentada de superóxido e peróxido de hidrogênio podem conduzir a um fenômeno conhecido como resposta de hipersensibilidade, onde as ROS produzidas pela planta provocam a morte das células do vegetal ao redor do inseto, isolando-o das partes saudáveis e eventualmente levando a morte do invasor por inanição, assim como pela exposição aos níveis elevados de ROS, um mecanismo descrito em insetos que formam galhas em vegetais tão diversos como trigo ou pinheiros (Heath, 2000; Mittapalli et al., 2007; Radville et al., 2011). A comparação de linhagens de *Arabidopsis thaliana* suscetíveis e resistentes à predação por larvas de uma mariposa, *Plutella xylostella*, mostrou um aumento de expressão na planta de genes ligados à produção de ROS e à tolerância a níveis elevados de radicais livres, como enzimas antioxidantes, o que em geral é interpretado como evidência de estresse oxidativo (Collins et al., 2010). Alternativamente, ocorre a produção de peróxido de hidrogênio associada à produção de compostos fenólicos pela planta, os quais são convertidos por peroxidases (utilizando o peróxido de hidrogênio) à semiquinonas, que são radicais livres orgânicos bastante tóxicos. Por exemplo, foi mostrado que uma variedade transgênica de álamo que superexpressa uma peroxidase é mais resistente à predação pela mariposa *Lymantria dispar* (Barbehenn et al., 2010).

## Formação da Cutícula, Endurecimento e Melanização.

O exoesqueleto rígido é talvez a mais importante das adaptações dos artrópodes, pois permitiu que representantes desse grupo fossem os primeiros animais a ocuparem o ambiente terrestre, que ocorreu aparentemente na transição entre o período siluriano e o devoniano, perto de 400 milhões de anos atrás (Buatois et al., 1998). A cutícula dos insetos é caracterizada pela presença de quitina e de uma série de proteínas estruturais (Willis, 2010). Logo após a ecdise, a cutícula dos insetos sofre um processo de endurecimento que é feito pelo ataque de radicais livres aos diferentes componentes levando à formação de ligações cruzadas covalentes entre as diferentes proteínas, envolvendo principalmente resíduos de tirosina e formando pontes de di-tirosina. Processo semelhante parece ocorrer no endurecimento da casca de ovos de insetos. Córion-peroxidases estão envolvidas no endurecimento do córion de ovos de insetos como *Bactrocera oleae*, *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti*, onde foi primeiramente descrita (Li et al., 1996). Essa atividade peroxidásica depende da redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio para formar ligações cruzadas de proteínas através de pontes de di-tirosina e tri-tirosina, que promoverão o endurecimento da parede dos ovos, importante para garantir sua resistência, assim como para evitar a perda de água, ambas funções essenciais para a sobrevivência do embrião. No caso do barbeiro *Rhodnius prolixus*, aparentemente, esse peróxido de hidrogênio provém da atividade de uma enzima NADPH oxidase, que seria expressa no epitélio folicular ovariano (FD, dados não publicados).

A resposta do sistema imune dos vertebrados frente a patógenos apresenta mecanismos desenvolvidos após o contato com o organismo invasor ou moléculas dele derivadas (a chamada resposta imune inata) e mecanismos de defesa cuja especificidade já está estabelecida no genoma, embora sejam acionados pela presença do organismo patogênico. Embora nos últimos anos tenham sido relatadas algumas evidências de que exista algum nível de imunidade adquirida em insetos, essa resposta parece ser baseada, em grande parte, em um poderoso arsenal de mecanismos inatos. A produção de ROS, com sua ação microbicida, é um dos pilares da resposta imune inata dos insetos<sup>2</sup>. Mas, além da atuação dos ROS diretamente sobre microorganismos, eles atuam também na resposta imune durante o processo de encapsulamento de patógenos, que é um componente fundamental da resposta imunológica dos insetos. Muito frequentemente, organismos invasores são "aprisionados" dentro de estruturas extracelulares formadas pela ação de hemócitos e que terminam por isolar o corpo estranho no restante do inseto. Esse fenômeno, a melanização, é um processo oxidativo que ocorre também durante o endurecimento da cutícula, após a ecdise, e envolve uma fenoloxidase (PO), que é uma enzima com atividade tirosinásica que catalisa a oxidação de monofenóis em difenóis e quinonas.

---

<sup>2</sup> A resposta imune dos insetos é discutida separadamente em maior detalhe no Capítulo XX (Título).

## Diapausa e Desenvolvimento.

A diapausa é um retardo no desenvolvimento, que pode ser descrito como uma dormência fisiológica em resposta a algum estímulo ambiental, em geral associado a alguma condição pouco favorável. Por exemplo, temperatura e duração do dia induzem a diapausa por mecanismos neuro-hormonais, sinalizando (em regiões frias do globo) um inverno rigoroso ou (em organismos de regiões tropicais) um verão muito quente. A diapausa é um programa de desenvolvimento que ocorre como resposta a algum tipo de estresse que existe nos metazoários há milhões de anos sendo encontrada em vermes, crustáceos, rotíferos, tardígrados, insetos, peixes e mamíferos. Ela se caracteriza por processos que limitam o crescimento, implicando em uma parada prolongada no desenvolvimento. A diapausa pode acontecer em qualquer estágio de vida, de embrião ao adulto, e as vias que acabam com a dormência em geral respondem ao reaparecimento de condições favoráveis de crescimento.

Em estudo realizado com o himenóptera *Nasonia nitripennis*, mostrou-se como as células do inseto se preparam para a resposta a condições de estresse induzindo a expressão de genes que diminuem o acúmulo de proteínas desnaturadas, impedem o seu congelamento ou aumentam a resistência à falta de nutrientes. Através de análise proteômica, observou-se uma grande mudança, durante a diapausa, de proteínas de estoque e de choque térmico, assim como proteínas envolvidas na síntese de glicerol (um crioprotetor bastante comum) e de ferritina (Wolschin and Gadau, 2009).

A eclosão de larvas de *Bombyx mori* a partir de ovos em diapausa é maior do que em ovos não-diapaúsicos, quando os mesmos são submetidos a baixas temperaturas por muito tempo. Os ovos em diapausa possuem níveis maiores de peróxido de hidrogênio, atividade de xantina oxidase aumentada e baixa atividade de catalase, o que significa que esses ovos se encontram mais protegidos ao estresse mediado por sinalização redox, que provavelmente ocorre no fim da diapausa (Sima et al., 2011). Peróxido de hidrogênio pode inibir caspases e outros efetores pró-apoptóticos, assim retardando a morte celular durante a exposição a estresses ambientais após o final da dormência.

Radiação ultravioleta intensa aliada a vários ciclos de congelamento e descongelamento e anóxia, podem gerar altos níveis de estresse oxidativo em organismos que vivem em ambientes congelados, como a Antártida. Em dípteros da região, como *Belgica antarctica*, superóxido dismutase (SOD) e catalase estão sempre altamente expressas nas larvas expostas à luz do sol, ao mesmo tempo que os níveis de lipídeos e proteínas oxidadas estão controlados (Lopez-Martinez et al., 2008).

De forma geral, os mecanismos que controlam a diferenciação de células proliferativas durante o desenvolvimento determinam as características anatômicas dos tecidos e órgãos. Em larvas de *Drosophila melanogaster* foi demonstrado que a inibição da NOS induz hipertrofia de alguns tecidos. Isso acontece pois o óxido nítrico suprime a síntese de DNA e a proliferação celular, de modo que a ausência de NO permite o crescimento exacerbado de alguns tecidos (Kuzin et al., 1996).

As peroxiredoxinas são enzimas antioxidantes com funções também anti-apoptóticas e têm sido muito estudadas. Em *Drosophila*, a peroxiredoxina 5 é expressa em todas as células do inseto, o que o torna resistente ao estresse oxidativo e a superexpressão em moscas transgênicas aumenta a longevidade por até 30%. Os níveis de peroxiredoxinas são especialmente altos nos embriões de *Drosophila* e os cinco genes existentes em *D. melanogaster* apresentam padrões distintos de expressão ao longo do desenvolvimento, sugerindo um papel no desenvolvimento e diferenciação (Radyuk et al., 2009).

## Os Artrópodes Hematófagos são Vetores de Doenças.

6

É interessante notar que apesar de existir um grande número de espécies de insetos, somente 1,4 % são hematófagas, sendo que algumas das ordens mais numerosas, como Coleoptera, não mostram uma espécie hematófaga sequer (Ribeiro, 1995). Esse fato sugere que deve haver pré-requisitos fisiológicos para o desenvolvimento deste hábito alimentar peculiar que seja limitante para permitir o seu surgimento em muitas ordens. Não obstante, a hematofagia é um hábito que surgiu independentemente diversas vezes (pelo menos sete!) durante a evolução dos insetos, provavelmente entre o final do período jurássico e o cretáceo, entre 150 e 70 milhões de anos atrás (Lukashevich and Mostovski, 2003; Mans and Neitz, 2004). Podemos também encontrar membros de outras classes deste mesmo filo que também são hematófagas como, por exemplo, os carrapatos. Além disso, a hematofagia não é restrita apenas a animais invertebrados como mosquitos, carrapatos e percevejos, pois podemos encontrar mamíferos (como os morcegos hematófagos) ou protozoários (como o plasmódio da malária, que se alimenta de hemoglobina) que adotaram esta estratégia alimentar.

A presença de um sistema circulatório fechado foi essencial para o desenvolvimento dos vertebrados, pois permitiu o surgimento de organismos de grande porte, onde o transporte de oxigênio por difusão, como ocorre nos insetos, seria impossível. Assim, o sangue é um tecido essencial à vida dos vertebrados, pois realiza essa função de levar oxigênio aos tecidos, e representa algo em torno de 5 % do peso do indivíduo. Desta forma, uma contrapartida ao aparecimento desse sistema circulatório foi o desenvolvimento de mecanismos voltados para evitar a perda de sangue, coletivamente denominados de hemostasia e que abrangem a agregação de plaquetas, a coagulação e a vasoconstrição. Para os animais hematófagos, a hemostasia consiste em uma dificuldade a ser vencida para a obtenção de alimento, e assim, ao picarem o vertebrado, os insetos hematófagos injetam sua saliva que possui uma série de moléculas anti-hemostáticas que além de anestesiarem o local da picada, evitando serem percebidos, inibem a agregação plaquetária, a coagulação e promovem vasodilatação, auxiliando na sucção do sangue (Ribeiro and Francischetti, 2003)<sup>3</sup>. Dessa forma, a alimentação com sangue, representa para os insetos hematófagos uma dieta rica em proteínas e lipídeos, capaz de sustentar a produção de uma prole extensa. Por outro lado, a injeção de saliva do inseto representa um ponto de entrada de patógenos no hospedeiro vertebrado. Diversos patógenos se

<sup>3</sup> Esse aspecto é discutido em maior detalhe no Capítulo 5.



aproveitam desta situação colonizando a glândula salivar do inseto, sendo jogados junto da saliva para dentro do vertebrado. O ciclo de vida do patógeno prossegue agora no vertebrado e quando um inseto não infectado for sugar o sangue deste, se infectará novamente, fechando o ciclo de transmissão.

Os insetos hematófagos são vetores de uma série de doenças para o homem e os animais domésticos. Eles impactam enormemente na agricultura, causando perdas na produção de leite e carne pelos bovinos, além do dano ao couro destes animais, reduzindo o seu valor. A lista de doenças transmitidas pelos insetos é enorme, incluindo algumas de grande prevalência no mundo hoje, que afetam milhões de pessoas, principalmente nas partes mais pobres do globo, tais como Malária, Filariose, Doença de Chagas, Leishmanioses e Dengue.

### A Hematofagia como um Desafio.

Uma vez que os artrópodes hematófagos em geral são muitas vezes menores do que os vertebrados dos quais eles obtêm o sangue, a alimentação implica muitas vezes em risco muito grande. A ingestão de grandes quantidades de sangue a cada repasto é uma forma eficiente de minimizar o número de visitas ao hospedeiro, o que é altamente vantajoso (Lehane, 2005). Nesses organismos, a quantidade de sangue que é ingerida depende de uma série de fatores, mas em geral eles são capazes de ingerir uma quantidade de sangue que é equivalente a mais de duas vezes o seu próprio peso. Ou seja, eles comem 200% do seu peso em uma única refeição, o que seria o equivalente a um leão de 250 kg comer 500 kg de carne. Alguns insetos, como o *R. prolixus*, comem até 10 vezes o seu peso em sangue.

Além do desafio físico que representa ingerir essa enorme quantidade de sangue, estes insetos enfrentam um desafio fisiológico que é digerir todo o sangue e direcionar os nutrientes da dieta para os ovos. O sangue representa uma dieta rica em proteínas, pois estas moléculas compõem 97% do seu peso seco. A hemoglobina é a proteína mais abundante do sangue, correspondendo a aproximadamente 60% (15g/100mL) do conteúdo protéico. A digestão da hemoglobina libera seu grupamento prostético, o heme, que possui no centro de sua estrutura o ferro, um metal de transição. O heme livre é capaz de amplificar cascatas de peroxidação lipídica, dando origem a espécies radiculares tóxicas para as células (Ryter and Tyrrell, 2000). Como se não bastasse, a degradação do heme pela enzima heme oxigenase (HO) libera como produto o átomo de ferro<sup>+</sup>, que pode participar de reações pró-oxidantes também levando à geração de ROS. Desta maneira, é imprescindível que os artrópodes hematófagos possuam um sofisticado sistema para se prevenir dos efeitos deletérios do heme<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> Como mencionado, o metabolismo oxidativo é uma fonte constante de ROS para as células. Além disso, a digestão do sangue libera grandes quantidades de heme e ferro. O ferro é um metal de transição e pode participar de reações de oxido redução. A mistura de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ferro reduzido (Fe<sup>+2</sup>) é uma reação conhecida há mais de 130 anos e foi descrita por um químico britânico chamado Henry Fenton (KEHRER, 2000 The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology 149: 43-50.). A reação de Fenton (Fe<sup>+2</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Fe<sup>+3</sup> + OH<sup>-</sup> + OH), como ficou conhecida, era usada para oxidar alguns contaminantes e destruir compostos orgânicos pois o produto desta reação, o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>), é a espécie reativa de oxigênio de maior reatividade. Devido à sua alta toxicidade, o HO<sup>•</sup> pode reagir com biomoléculas, dentre elas, lipídeos gerando

Os mecanismos de proteção que vários destes insetos apresentam podem ser classificados em dois grupos principais: i) mecanismos que lidam com o heme diretamente, agindo de forma preventiva ao impedir que o mesmo promova dano oxidativo. Isso pode ser feito tanto pela degradação da molécula de heme por uma enzima que o degrada oxidativamente, a heme oxigenase (Paiva-Silva e Cols., 2006), pela agregação do heme num cristal insolúvel denominado hemozoína, como ocorre em barbeiros (Oliveira e Cols., 1999), ou pela redução de sua reatividade através de proteínas que ligam heme na hemolifa<sup>5</sup> tais como as que foram descritas descritas em barbeiros e carrapatos. Alternativamente, também foram descritas estratégias que "corrigem" o desbalanço redox provocado pelo heme, através de enzimas e moléculas antioxidantes como a enzima catalase (uma enzima que elimina peróxido de hidrogênio), superóxido dismutase e antioxidantes de baixo peso molecular como biliverdina, glutatona ou ácido úrico (Graca-Souza et al., 2006).

Por outro lado, como já mencionamos, diversas vias metabólicas produzem ROS. Assim, a ingestão de grandes quantidades de heme parece ser acompanhada pela redução da produção de ROS por algumas dessas vias, mesmo que isso talvez implique em um certo "custo" para o organismo, por exemplo, a presença de heme no intestino do mosquito, reduz a produção de ROS por um mecanismo que depende da ativação de proteína kinase C (PKC) e envolve o "desligamento" da atividade da Duox (Oliveira et al., 2011a), uma enzima produtora de ROS que foi implicada no controle da microbiota intestinal em *Drosophila melanogaster* (Ha et al., 2005). Por outro lado, diversos relatos na literatura mostram que parasitos, após se alimentarem de sangue, tornam-se mais fermentativos, ou seja, reduzem o metabolismo mitocondrial e usam mais a via glicolítica com fonte de ATP, tendo sido sugerido que a redução do metabolismo oxidativo diminuiria a geração de ROS mitocondrial (Oliveira and Oliveira, 2002). Da mesma forma, a alimentação com sangue reduz a respiração no tórax de *Aedes aegypti*, (Goncalves et al., 2009).

---

radicais alquil ( $R^\bullet$ ) e a redução de  $HO^\bullet$  à  $H_2O$ . Este radical lipídico é capaz de reagir com o oxigênio molecular gerando radical peroxil ( $ROO^\bullet$ ) que é altamente reativo e reage com ácidos graxos insaturados sendo rapidamente convertido a hidroperóxidos orgânicos ( $ROOH$ ), que apresentam menor reatividade, e gerando um novo  $R^\bullet$ , reiniciando a reação, daí o nome "cadeia de peroxidação lipídica". A presença de heme neste sistema é capaz de converter  $ROOH$  novamente em espécies tóxicas como  $ROO^\bullet$  e o radical alcoxil ( $RO^\bullet$ ), regenerando os intermediários tóxicos e amplificando a reação ( Kalyanaraman, B., Mottley, C., Mason, R.P., 1983. A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin/hydroperoxide systems. *J Biol Chem* 258, 3855-3858, Van der Zee, J., Barr, D.P., Mason, R.P., 1996. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-Butyl hydroperoxide. *Free Radic Biol Med* 20, 199-206.). Este modelo explica como o heme pode funcionar como fonte de estresse oxidativo para organismos que tenham que lidar com concentrações extremamente altas dessa molécula, como é o caso de animais hematófagos.

<sup>5</sup> Os insetos não possuem sistema circulatório fechado, com vasos sanguíneos, como os vertebrados. Diferentemente, eles possuem um sistema circulatório denominado aberto, onde os órgãos internos estão todos em uma cavidade denominada de hemocele, na qual circula um líquido extracelular, a hemolinfa. A hemolinfa é um líquido que pode ser considerada o sangue dos artrópodes embora ela não tenha função respiratória (não ocorre transporte de gases).



## Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio e a Transmissão de Doenças por Mosquitos.

De forma geral, o ciclo de transmissão de doenças como dengue e malária começa com o mosquito picando uma pessoa infectada. Isso leva à ingestão de partículas infecciosas (dengue ou plasmódio, por exemplo) que inicialmente se estabelecem no intestino médio do mosquito e posteriormente atravessam a parede do epitélio intestinal em direção à hemolinfa. Após isso, os parasitas invadem a glândula salivar e são inoculados em um novo hospedeiro quando o mosquito se alimenta novamente de sangue. Durante essa “viagem” em direção à glândula salivar, os parasitas são desafiados pelo sistema imune dos mosquitos, que tem como objetivo destruir o microorganismo invasor. Como já mencionado, a geração de ROS no intestino é um importante mecanismo da imunidade inata de insetos, controlando a população de microorganismos intestinais. Os primeiros estudos relacionando a participação de ROS/RNS no sistema imune de mosquitos demonstraram que a alimentação de *Anopheles stephensi* com inibidores da síntese de óxido nítrico (NO) facilitam a infecção por *Plasmodium berghei*, (Luckhart et al., 1998). Posteriormente observou-se que a célula epitelial invadida pelo oocineto<sup>6</sup> expressa a enzima óxido nítrico sintase (NOS), que é acompanhado de apoptose e protrusão e eliminação dessas células do epitélio intestinal. Essa descoberta gerou o modelo que ficou conhecido como “*time-bomb*”, que postulava que a invasão da célula epitelial dispara a produção de NO - uma espécie reativa de nitrogênio (RNS) tóxica - como uma tentativa de destruir o parasita, mas que, somada à geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por uma enzima do tipo Duox, causaria danos às células do mosquito (Han et al., 2000; Kumar et al., 2004).

Após a invasão da célula epitelial, os oocinetos que escapam dos mecanismos do sistema imune dos mosquitos atingem a lâmina basal e ali se transformam em oocistos, uma forma do parasita bastante resistente à imunidade do mosquito. Apesar disso, observou-se que a produção de NO também era capaz de combater a infecção após a passagem do parasita pelo intestino, possivelmente agindo diretamente sobre os oocistos (Gupta et al., 2009). Foi descrito recentemente um interessante mecanismo pelo qual o parasita da malária “se esconde” do sistema imune dos mosquitos, prevenindo a ativação da NOS, para aumentar sua capacidade de proliferação. Foi observada a formação de uma rede extracelular formada a partir da formação de ligações cruzadas entre resíduos de tirosina de proteínas presentes na luz do intestino, catalisada por uma peroxidase extracelular (IMPer) produzida pelo epitélio intestinal. A IMPer utilizaria o peróxido de hidrogênio produzido pela Duox para oxidar esses resíduos de tirosina, formando uma rede que isolaria as células do epitélio intestinal de microorganismos da microbiota, que proliferam abundantemente após a ingestão de sangue. Essa barreira limitaria a ativação das vias de imunidade epitelial (principalmente a NOS) pela microbiota, criando um ambiente favorável ao *Plasmodium* quando o mosquito se alimenta de sangue infectado com esse parasita (Kumar et al., 2010).

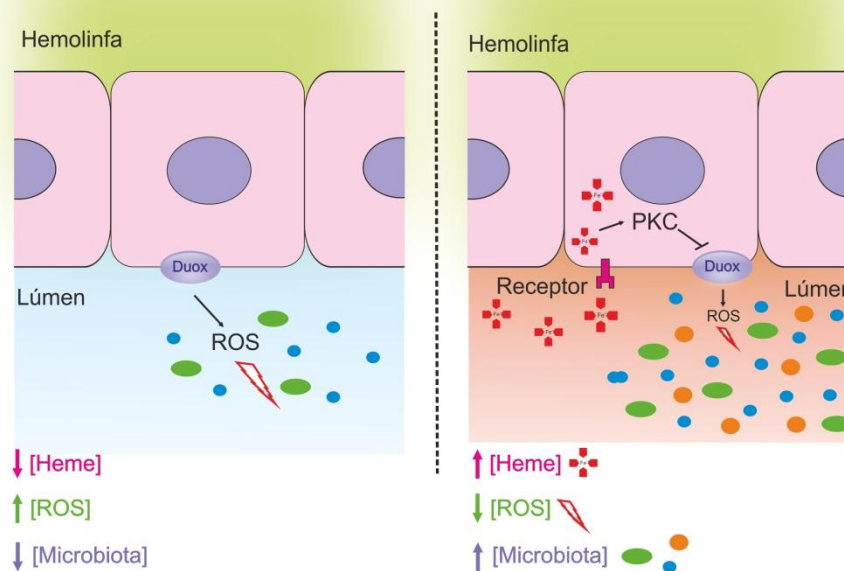
<sup>6</sup> Estágio do protozoário *Plasmodium* que habita o intestino dos mosquitos.

Outras espécies reativas também estão envolvidas na resposta à *P. berghei*, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), cujos níveis hemolinfáticos são aumentados 24 horas após alimentação com sangue infectado. Esse aumento parece ocorrer por uma diminuição nos níveis de RNA mensageiro e atividade específica da catalase (enzima que remove  $H_2O_2$ ), sugerindo que ocorre modulação por parte do mosquito das vias antioxidantes com o objetivo de reduzir a detoxificação de ROS, aumentando os níveis sistêmicos de  $H_2O_2$  e a destruição oxidativa de parasitas da malária (Molina-Cruz et al., 2008). Isso pode ser encarado como benéfico ao mosquito do ponto de vista da atividade imunológica, mas parece representar um custo elevado, pois leva à redução de sobrevivência e perda de fecundidade dos mosquitos (DeJong et al., 2007). Em acordo com essa hipótese, foi mostrado que a linhagem de *Anopheles gambiae* L3-5, que é refratária à malária, possui diferenças no metabolismo energético e oxidativo (Kumar et al., 2003) como, por exemplo, o envelhecimento precoce acompanhado do aumento da utilização de reservas lipídicas. Além disso, observou-se diminuição do consumo de oxigênio mitocondrial acoplado à síntese de ATP (uma respiração menos eficiente) e um provável aumento nas taxas glicolíticas para compensar a deficiência da função mitocondrial, sugerindo um importante cruzamento entre a eficiência da resposta imune dos mosquitos e o seu metabolismo energético, e criando uma interessante e pouco explorada relação entre a produção de ROS mitocondrial e a resposta anti-plasmódio dos mosquitos (Naik and Dixit, 2011; Oliveira et al., 2011b).

Por outro lado, o silenciamento da catalase por RNA de interferência (RNAi) em *Anopheles aquasalis* favoreceu o estabelecimento de *P. vivax* no interior dos mosquitos (Bahia e Cols, dados não publicados). O mecanismo pelo qual a ausência de catalase resulta em maior presença de parasitas no intestino dos mosquitos não foi elucidado, mas uma explicação seria que a diminuição dos níveis de catalase resulta em maior presença de  $H_2O_2$ , e essa espécie radicalar favorece esse parasita, seja diretamente ou porque reduz a competição por espaço e nutrientes entre Plasmódio e bactérias intestinais sensíveis a ROS. Dessa forma, o conceito de que ROS exerce efeitos deletérios sobre *Plasmodium* pode ser uma generalização que não se aplica a todas as formas de malária. Essa idéia está em acordo com a noção de que diferentes microorganismos são influenciados de formas diferentes pela presença de ROS, com alguns sendo desfavorecidos, enquanto outros levam vantagem (Ryu et al., 2006; Stecher et al., 2007).

O estudo das alterações na biologia redox no intestino de mosquitos hematófagos antes e após a ingestão de sangue foi estimulado pela demonstração de que a presença de bactérias intestinais é capaz de regular negativamente a infecção de *Aedes aegypti* pelo vírus dengue (Xi et al., 2008) e *Anopheles gambiae* pelo protozoário causador de malária *Plasmodium falciparum* (Dong et al., 2009). A atividade da Duox (gerando  $H_2O_2$ ) é aumentada em mosquitos alimentados apenas com açúcar, e isso mantém baixa a microbiota dos mosquitos. Entretanto, após a alimentação com sangue ocorre uma restrição à produção de ROS, imposta pelo heme da dieta, e isso favorece o crescimento da flora intestinal, que agiria como regulador negativo da infecção dos mosquitos. Sendo assim, após comer sangue, os mosquitos abrem mão de uma importante

defesa imunológica (produção de ROS), mas, por outro lado, permite a expansão da flora intestinal que antagoniza a infecção por dengue e malária (Figura 1). Este fato coloca a biologia redox no centro da discussão a respeito da modulação da capacidade vetorial dos mosquitos. Dessa forma, estratégias que controlam a flora dos mosquitos podem se tornar alternativas no controle da transmissão de dengue e malária.



**Figura 1:** A alimentação com sangue dispara uma via de sinalização celular que reduz a produção de ROS pelo epitélio intestinal de mosquitos, contribuindo para o aumento da microbiota.

## Considerações Finais

A formação de radicais livres, inicialmente tratados pela literatura como os "vilões" responsáveis apenas por doenças, são componentes essenciais do metabolismo de todos os seres vivos. Nos insetos, eles estão envolvidos em diversos aspectos da biologia e desempenham um papel essencial em processos como a formação de cutícula, a muda e o sistema imune inato, onde são determinantes não apenas da capacidade de sobrevivência dos insetos, como também da sua capacidade de transmitirem patógenos quando se trata de insetos vetores.

## Referências Bibliográficas.

Barbehenn, R., Dukatz, C., Holt, C., Reese, A., Martiskainen, O., Salminen, J.P., Yip, L., Tran, L., Constabel, C.P., 2010. Feeding on poplar leaves by caterpillars potentiates foliar peroxidase action in their guts and increases plant resistance. *Oecologia* 164, 993-1004.

Buatois, L.A., Mangano, M.G., Genise, J.F., Taylor, T.N., 1998. The ichnologic record of the continental invertebrate invasion: Evolutionary trends in environmental expansion, ecospace utilization, and behavioral complexity. *Palaios* 13, 217-240.

Collins, R.M., Afzal, M., Ward, D.A., Prescott, M.C., Sait, S.M., Rees, H.H., Tomsett, A.B., 2010. Differential proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* genotypes exhibiting resistance or susceptibility to the insect herbivore, *Plutella xylostella*. *PLoS One* 5, e10103.

DeJong, R.J., Miller, L.M., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Kumar, S., Barillas-Mury, C., 2007. Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2121-2126.

Dong, Y.M., Manfredini, F., Dimopoulos, G., 2009. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. *Plos Pathogens* 5, -.  
Engel, M.S., Grimaldi, D.A., 2004. New light shed on the oldest insect. *Nature* 427, 627-630.

Goncalves, R.L.S., Machado, A.C.L., Paiva-Silva, G.O., Sorgine, M.H.F., Momoli, M.M., Oliveira, J.H.M., Vannier-Santos, M.A., Galina, A., Oliveira, P.L., Oliveira, M.F., 2009. Blood-Feeding Induces Reversible Functional Changes in Flight Muscle Mitochondria of *Aedes aegypti* Mosquito. *PLoS One* 4(11):e7854.

Graca-Souza, A.V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G.O., Braz, G.R.C., Paes, M.C., Sorgine, M.H.F., Oliveira, M.F., Oliveira, P.L., 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 36, 322-335.

Gupta, L., Molina-Cruz, A., Kumar, S., Rodrigues, J., Dixit, R., Zamora, R.E., Barillas-Mury, C., 2009. The STAT pathway mediates late-phase immunity against *Plasmodium* in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Host Microbe* 5, 498-507.

Ha, E.M., Oh, C.T., Bae, Y.S., Lee, W.J., 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310, 847-850.

Han, Y.S., Thompson, J., Kafatos, F.C., Barillas-Mury, C., 2000. Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *Embo J* 19, 6030-6040.

Heath, M.C., 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 44, 321-334.

Kalyanaraman, B., Mottley, C., Mason, R.P., 1983. A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin/hydroperoxide systems. *J Biol Chem* 258, 3855-3858.

Kumar, S., Christophides, G.K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y.S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F.C., Barillas-Mury, C., 2003. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14139-14144.

Kumar, S., Gupta, L., Han, Y.S., Barillas-Mury, C., 2004. Inducible peroxidases mediate nitration of anopheles midgut cells undergoing apoptosis in response to *Plasmodium* invasion. *J Biol Chem* 279, 53475-53482.

Kumar, S., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Rodrigues, J., Barillas-Mury, C., 2010. A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*. *Science* 327, 1644-1648.

Kuzin, B., Roberts, I., Peunova, N., Enikolopov, G., 1996. Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87, 639-649.

Lehane, M.J., 2005. *The biology of blood-sucking in insects*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge ; New York.

Li, J., Hodgeman, B.A., Christensen, B.M., 1996. Involvement of peroxidase in chorion hardening in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 26, 309-317.

Lopez-Martinez, G., Elnitsky, M.A., Benoit, J.B., Lee, R.E., Jr., Denlinger, D.L., 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide

dismutase, catalase and heat shock proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 38, 796-804.

Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, L., Rosenberg, R., 1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5700-5705.

Lukashevich, E.D., Mostovski, M.B., 2003. Hematophagous insects in the fossil record. *Paleontol J* 37, 153-161.

Mans, B.J., Neitz, A.W., 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 1-17.

Mittapalli, O., Neal, J.J., Shukle, R.H., 2007. Antioxidant defense response in a galling insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1889-1894.

Molina-Cruz, A., DeJong, R.J., Charles, B., Gupta, L., Kumar, S., Jaramillo-Gutierrez, G., Barillas-Mury, C., 2008. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. *J Biol Chem* 283, 3217-3223.

Naik, E., Dixit, V.M., 2011. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med* 208, 417-420.

Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2002. *Bioenergetics* 3, [3rd ed. Academic Press, San Diego, Calif.

Oliveira, J.H., Goncalves, R.L., Lara, F.A., Dias, F.A., Gandara, A.C., Menna-Barreto, R.F., Edwards, M.C., Laurindo, F.R., Silva-Neto, M.A., Sorgine, M.H., Oliveira, P.L., 2011a. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathog* 7, e1001320.

Oliveira, J.H., Goncalves, R.L., Oliveira, G.A., Oliveira, P.L., Oliveira, M.F., Barillas-Mury, C., 2011b. Energy metabolism affects susceptibility of *Anopheles gambiae* mosquitoes to *Plasmodium* infection. *Insect Biochem Mol Biol* 41, 349-355.

Oliveira, P.L., Oliveira, M.F., 2002. Vampires, Pasteur and reactive oxygen species - Is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites? *Febs Letters* 525, 3-6.

Radville, L., Chaves, A., Preisser, E.L., 2011. Variation in plant defense against invasive herbivores: evidence for a hypersensitive response in eastern hemlocks (*Tsuga canadensis*). *J Chem Ecol* 37, 592-597.



Radyuk, S.N., Michalak, K., Klichko, V.I., Benes, J., Rebrin, I., Sohal, R.S., Orr, W.C., 2009. Peroxiredoxin 5 confers protection against oxidative stress and apoptosis and also promotes longevity in *Drosophila*. *Biochem J* 419, 437-445.

Ribeiro, J.M., 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4, 143-152.

Ribeiro, J.M., Francischetti, I.M., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology* 48, 73-88.

Ryter, S.W., Tyrrell, R.M., 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28, 289-309.

Ryu, J.H., Ha, E.M., Oh, C.T., Seol, J.H., Brey, P.T., Jin, I., Lee, D.G., Kim, J., Lee, D., Lee, W.J., 2006. An essential complementary role of NF-kappaB pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *Embo J* 25, 3693-3701.

Sima, Y.H., Yao, J.M., Hou, Y.S., Wang, L., Zhao, L.C., 2011. Variations of hydrogen peroxide and catalase expression in *Bombyx* eggs during diapause initiation and termination. *Arch Insect Biochem Physiol* 77, 72-80.

Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A.W., Westendorf, A.M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A.J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., von Mering, C., Hardt, W.D., 2007. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5, 2177-2189.

Van der Zee, J., Barr, D.P., Mason, R.P., 1996. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-Butyl hydroperoxide. *Free Radic Biol Med* 20, 199-206.

Willis, J.H., 2010. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochem Mol Biol* 40, 189-204.

Winterbourn, C.C., 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4, 278-286.

Wolschin, F., Gadau, J., 2009. Deciphering proteomic signatures of early diapause in *Nasonia*. *PLoS One* 4, e6394.

Xi, Z.Y., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2008. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. *Plos Pathogens* 4(7):e1000098.