# Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Metabolômica de *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) infectado por *Spiroplasma* 

### Fábio Ramon Martins Duarte

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

# Fábio Ramon Martins Duarte Licenciado em Ciências Biológicas

Metabolômica de Aphis citricidus (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) infectado po	r
Spiroplasma	

Orientador:

Prof. Dr. FERNANDO LUÍS CÔNSOLI

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

# Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Duarte, Fábio Ramon Martins

Metabolômica de *Aphis citricidus* (Kirkaldi) (Hemiptera: Aphididae) infectado por *Spiroplasma /* Fábio Ramon Martins Duarte. - - Piracicaba, 2017. 41 p.

Dissertação (Mestrado) -- USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Composição química 2. Interação inseto-simbionte 3. Metabolismo 4. Simbionte secundário 5. Simbiose I. Título

## Dedicatória

Aos meus pais, que foram as pessoas mais importantes durante esse momento da minha vida.

#### **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Cônsoli pelos ensinamentos, confiança, apoio emocional e profissional, conhecimentos, amizade e orientação que contribuíram para minha formação acadêmica;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate e a Dr<sup>a</sup>. Mônica T. Veneziano Labate, Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, pelo apoio nas análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/TOF);

À Dr<sup>a</sup>. Ana Flávia Canovas Martinez, Laboratório de Interações em Insetos, ESALQ/USP, pelos conhecimentos, assistência, amizade e pelo auxílio e treinamento no uso de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;

Ao Dr. Tiago Cardoso da Costa Lima, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa/Semiárido) pela recomendação, motivação e confiança que me levaram a escolher o Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP;

Às amigas de turma, Andreisa Fabri Lima e Patrícia Alessandra Sanches, pela amizade;

A equipe do Laboratório de Interações em Insetos, Ana Martinez, Diandra Achre, Luís Gustavo Almeida, Iara Donadão, Bianca Carbogim, Wanessa Scopel, Nathália Cavichioli, Camila Paiva, Marcele Coelho, Felipe Domingues, Letícia Slongo, Taisa Pavani, Mariane Gomes, Fabio Dossi, Pedro Rodrigues, Aline Guidolin, Bruna Merlin e Caio Zitelli, pela companhia e momentos de descontração;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

# **EPÍGRAFE**

O homem é uma corda estendida entre o animal e o Super-homem: uma corda sobre um abismo; perigosa travessia, perigoso caminhar; perigoso olhar para trás, perigoso tremer e parar. O que é de grande valor no homem é ele ser uma ponte e não um fim: o que se pode amar no homem é ele ser uma passagem e um ocaso.

Nietzsche

# SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Simbiontes de insetos	
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
<ul><li>3.1. Criação de <i>Aphis citricidus</i></li><li>3.2. Análise de metabólitos de <i>Aphis citricidus</i> em GCMS-TOF</li></ul>	17 17
4. RESULTADOS	
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	33

#### **RESUMO**

### Metabolômica de *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) infectado por Spiroplasma

A associação de diferentes seres vivos favoreceu a exploração de novos hábitats e outras fontes de alimento, contribuindo nos processos de adaptação e de diversificação biológica. Essa associação, em que duas espécies passam a viver juntas, é denominada simbiose, e as associações de simbiose podem resultar em relações benéficas (mutualismo), neutras (comensalismo) ou prejudiciais (parasitismo) aos organismos envolvidos. Insetos estabelecem associações de simbiose diversas com outros organismos, como leveduras, vírus, protistas e bactérias. Dentre esses organismos, as bactérias são as mais comumente associadas a insetos. Elas podem se localizar no interior do corpo do hospedeiro, tanto no espaço extracelular ou endocelular (endossimbionte), assim como associadas externamente ao corpo do hospedeiro (ectossimbionte). Endossimbiontes são os que mais diretamente influenciam a fisiologia e o metabolismo do hospedeiro, tornando-se, em alguns casos, essenciais à sobrevivência de seu hospedeiro. Exemplo disso são as bactérias endossimbiontes associadas a pulgões, Buchnera aphidicola, que são responsáveis pela síntese de aminoácidos essenciais e vitaminas para complementar os recursos nutricionais explorados pelos pulgões, seiva de plantas, que normalmente apresentam baixo valor nutricional. Mas vários outros simbiontes, mesmo que não estabelecendo essa obrigatoriedade na relação com o hospedeiro, acabam influenciando inúmeros aspectos da bioecologia de seus pulgões hospedeiros, como, por exemplo, a capacidade de defesa de seus hospedeiros a inimigos naturais. Spiroplasma são bactérias que influenciam o sistema de reprodução de borboletas, moscas-das-frutas, joaninhas e pulgões, além de influenciar a resposta de seus hospedeiros ao ataque de inimigos naturais, como parasitoides e nematoides. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos desse simbionte no metabolismo de seus hospedeiros. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de infecções por Spiroplasma no metaboloma de seu hospedeiro Aphis citricidus (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae). As análises foram conduzidas utilizando-se de isolinhagens irmãs de A. citricidus, infectadas ou não por Spiroplasma. Fêmeas adultas de A. citricidus, infectadas ou não por Spiroplasma, foram coletadas (25 mg/amostra), submetidas aos processos de extração com solução de clorofórmio, metanol e água (3:1:1) e derivatização com n-metil-n-(trimetilsilil)trifluoroacetamida e trimetilclorosilano, para posterior análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GCMS-TOF) para a detectação de metabólitos. Após tratamento e análise dos dados obtidos, foi observado que 40 metabólitos foram afetados significativamente em pulgões infectados por Spiroplasma. Dentre os metabólitos de A. citricidus alterados pela infecção por Spiroplasma, merecem destaque os hidrocarbonetos cuticulares, compostos nitrogenados e ácidos graxos. Os efeitos metabólicos da interação Aphis citricidus - Spiroplasma revelou informações importantes sobre a influência do endossimbionte na composição química de seus hospedeiros.

Palavras-chave: Composição química; Interação Inseto-Simbionte; Metabolismo; Simbionte secundário; Simbiose

### **ABSTRACT**

### Metabolomics of *Aphis citricidus* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) infected with Spiroplasma

The association between different living beings favored the exploitation of new habitats and food sources, contributing to adaptation and biological diversity. This association in which two species live together is named symbiosis, and associations of symbiosis can result in beneficial (mutualism), neutral (comensalism) or prejudicial (parasitism) interactions. Insects established a diverse range of associations with other organisms, such as yeasts, virus, protists and bacteria. Bacteria are by far the most commonly associates of insects. Bacteria can be located within the host body, either at the extra or intracellular space (endosymbionts), as well as on the body surface (ectosymbionts). Endosymbionts are the ones that most influence the host physiology and metabolism, and they may even become essential for the host survival. An example of such dependency is the aphid symbiont Buchnera aphidicola that synthesis essential amino acids and vitamins to complement the natural diet of host, which are of a low nutritional value. But many other symbionts that are not essential do the host can affect a number of bioecological aspects of their host aphids, as the host immune capacity to natural enemies. Spiroplasma are bacteria that can influence the reproduction system of butterflies, fruit flies, ladybugs and aphids, and interfere with the host immune response to parasitoids and nematodes. However, little is known of the effects of secondary symbionts on their host's metabolism. Thus, this work is aimed to detect the effects of Spiroplasmainfection on the metabolomics of the apid host Aphis citricidus (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae). Analysis were conducted using sister isolines A. citricidus, infected or not with Spiroplasma. Infected and uninfected adult females were collected from lab colonied (25 mg/samples), subjected to metabolite extraction in chloroform, methanol and water (3:1:1) and derivatization with n-methyl-n-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane, followed by metabolite analysis in a gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GCMS-TOF). After filtering and data analysis, 40 metabolites were observed in different intensities in between infected and uninfected aphids. The aphid's metabolites influenced by infection with Spiroplasma indicated the regulation of the metabolism of fatty acids, hydrocarbons and nitrogen compounds. The metabolic effects of the interaction Aphis citricus - Spiroplasma revealed interesting information on the host metabolism regulation by a secondary symbiont and on the role these changes may play on the associations of the host with other organisms.

Keywords: Chemical composition; Insect-Simbionte interaction; Metabolism; Secondary symbiont; Symbiosis

# 1. INTRODUÇÃO

Insetos são amplamente associados a microrganismos que influenciam o seu modo de vida e suas interações com outros níveis tróficos (Ferrari & Vavre, 2011). As bactérias estão entre os microrganismos mais comumente associados a insetos e várias das associações insetos-bactérias estabelecidas evoluíram para relações de mutualismo obrigatório (Rio et al., 2004; Sanchez-Contreras & Vlisidou, 2008). Devido à interdependência dos organismos envolvidos nessas associações, vários são os estudos que se debruçaram para identificar a contribuição metabólica oferecida pela bactéria e/ou as relações nutricionais/moleculares entre inseto-simbionte para a manutenção da simbiose (Buchner, 1965; Douglas, 1989; Douglas, 1998; Moran et al., 2008). No entanto, existe também um grande número de associações com bactérias que são facultativas, e que mesmo assim influenciam vários aspectos da biologia e ecologia de seu hospedeiros (Montllor et al., 2002; Russel & Moran, 2006; Oliver et al., 2009; Burke et al., 2010; Xie et al., 2010; Kikuchi et al., 2012). Mas os mecanismos e os efeitos das interações insetos – simbiontes secundários são conhecidos para um reduzido número de bactérias, merecendo destaque as bactérias que interferem nos mecanismos de reprodução dos hospedeiros, como Wolbachia, por exemplo (Stouthamer et al., 1999).

Pulgões apresentam interações com bactérias obrigatórias, *Buchnera aphidicola*, e um grupo diverso de bactérias simbiontes facultativas, sendo que todas elas desenvolveram estratégias para sua transmissão transovariana, garantindo sua associação com a progênie produzida (Braig, 1994; Moran & Baumann, 1994; Moya, 2009). *Buchnera aphidicola* é essencial ao pulgão por produzir aminoácidos essenciais e vitaminas, enquanto os diferentes simbiontes facultativos podem influenciar os processos de seleção hospedeira, o desenvolvimento de raças adaptadas à planta hospedeira, a resposta imunológica a patógenos e parasitoides, entre outros (Douglas, 1998; Leonardo & Muiru, 2003; Xie et al., 2011; Farahani et al., 2015; Moran et al., 2015).

A interação pulgão – *B. aphidicola* está entre as interações inseto-simbionte mais bem conhecidas, já tendo sido descrito o mecanismo molecular e a comunicação metabólica existentes (Shigenobu et al., 2000; Wilson et al., 2010). No entanto, pouco se sabe sobre as interações e os efeitos das associações com simbiontes facultativos no metabolismo de pulgões hospedeiros, apesar da existência de informações genômicas para alguns desses simbiontes (Carle et al., 1995; Kondo et al., 2002).

Apesar de *Spiroplasma* já ter sido relatado associado a algumas espécies de pulgões (Fukatsu et al., 2001; Guidolin & Cônsoli, 2017), esse simbionte é mais comumente estudado em associações com *Drosophila* (Williamson et al, 1999; Montenegro et al., 2005; Xie et al., 2010). Nas associações em que é estudado, *Spiroplasma* é descrito afetando o modo de reprodução do hospedeiro, principalmente por causar a eliminação de machos (Hursrt et al., 1999; Jiggins etal., 2000). No entanto, na associação *Spiroplasma - Drosophila hydei*, esse simbionte ofereceu maior proteção ao hospedeiro ao ataque de inimigos naturais (Xie et al., 2010).

Estudos comparativos do metabolismo de insetos sujeitos a diferentes condições de estresse auxiliam na compreensão dos eventos fisiológicos envolvidos, sendo possível a obtenção de um grande número de informações sobre o funcionamento do organismo (Overgaard et al., 2007). Análises metabolômicas auxiliaram na identificação das alterações metabólicas causadas pelo estresse e envelhecimento de *Ceratitis capitata* (Pujol-Lereis et al., 2016), choque térmico em *Drosophila melanogaster* (Malmendal et al., 2006), pela infecção de *Apis mellifera* por *Nosema ceranae* (Aliferis et al., 2012), além de auxiliar na identificação dos metabólitos secretados por *Metarhizium* e *Beauveria* em processos de infecção (De Bekker et al., 2013).

Dada à lacuna existente nos estudos dos efeitos da interação *Spiroplasma*-pulgões, a alta incidência desse simbionte em *Aphis citricidus* indica que essa associação se mostra como um modelo biológico promissor para se estudar os efeitos desse simbionte no seu hospedeiro através de estudos comparativos de metabolômica. Assim, nessa dissertação utilizamos de ferramentas de análises multivariadas dos metabólitos produzidos por isolinhagens irmãs de *A. citricidus*, infectadas ou não por *Spiroplasma*, para identificar as alterações metabólicas induzidas por *Spiroplasma* no hospedeiro e, dessa forma, buscar decifrar os efeitos dessas alterações na bioecologia do pulgão, contribui para o entendimento da interação pulgão – *Spiroplasma*.

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Simbiontes de insetos

Existem muitas associações entre os seres vivos, as quais são importantes para a diversidade biológica e o processo adaptativo. Em artrópodes, especificamente nos insetos, essas relações contribuíram para a exploração de novos recursos alimentares e o desenvolvimento de novos hábitos alimentares, favorecendo a adaptação de insetos aos mais diversos habitats. Dessa maneira, ocorreram várias interações entre insetos e bactérias, fungos, leveduras e protistas, uma vez que esses microrganismos podem se agregar nos espaços extra e endocelular (endossimbionte), desenvolvendo várias relações de simbiose (Tanaka & Kaya, 1993; Bourtzis & Miller, 2003).

As bactérias endossimbiontes hereditárias desempenham funções importantes em seus hospedeiros, como a produção de nutrientes essenciais (Douglas, 1998), proteção contra inimigos naturais (Brownlie & Johnson 2009), alterações nos sistemas reprodutivos (Engelstadter et al., 2008), entre outros. Simbiontes transmitidos verticalmente também podem ser classificados como primários/obrigatórios ou secundários/facultativos. Os simbiontes primários são mutualistas obrigatórios, os quais, geralmente, fornecem nutrientes essenciais ao inseto hospedeiro, o qual está normalmente associado a fontes de alimento com baixo valor nutritivo, como seiva de plantas, por exemplo (Baumann, 2005). Já os simbiontes secundários são conhecidos por causar efeitos diversos, como a manipulação do sistema reprodutivo, do sistema imunológico, entre outros (Stouthamer et al., 1993; Hoffmann et al. 1997; Stouthamer et al. 1999; Moran et al., 2008; Teixeira et al., 2008; Kambris et al., 2009).

Em insetos, os simbiontes primários localizam-se em células especiais, denominadas de bacteriócitos, que podem também ocorrer agrupadas, formando uma estrutura típica, denominada de bacterioma. O bacterioma é normalmente formado por uma camada unicelular de bacteriócitos que circunda um sincício, podendo hospedar diferentes simbiontes em cada uma dessas estruturas – bacteriócito e sincício. Simbiontes hospedados nessas estruturas são normalmente obrigatórios e fundamentais para a sobrevivência e reprodução de seus hospedeiros (Fukatsu & Nikoh, 1998). O papel desses simbiontes é comumente relacionado à nutrição, sendo eles responsáveis pelo fornecimento de nutrientes essenciais ao hospedeiro, como aminoácidos e vitaminas. Em algumas associações inseto-simbionte tem sido primários bacteriócitos/bacteriomas demonstrado que simbiontes que co-habitam compartilham e complementam suas contribuições para atender às exigências nutricionais do hospedeiro (Douglas, 1998; Buchner, 1965; Baumann, 2005). Em alguns casos, também tem sido sugerido o papel protetor de simbiontes associados ao bacterioma dada à sua capacidade em produzir compostos de defesa (Nakabachi et al., 2013).

Os simbionte secundários podem ser transmitidos verticalmente por meio de mecanismos celulares como a infecção de espermatozoides, sem alterar as funções da célula (Watanabe et al., 2014). Também podem ser transmitidos horizontalmente entre táxons (Russell et al., 2003) ou adquiridos da planta hospedeira (Caspi-Fluger et al., 2012). Muitos estudos vêm investigando os efeitos dos simbiontes secundários nos inimigos naturais. Oliver et al. (2005) demonstraram que o pulgão da ervilha *Acyrthosiphon pisum* infectado com *Hamiltonella defensa* apresenta variação de resistência entre 19-100% ao ataque do parasitoide *Aphidius ervi*. Entretanto, os impactos que os simbiontes secundários causam em seus hospedeiros são pouco conhecidos, já que não desempenham funções fundamentais para a sobrevivência de seus hospedeiros (Baumann, 2005).

Existem ainda simbiontes especializados na associação ao sistema reprodutor de seus hospedeiros, causando efeitos na determinação do sexo ou alterando a aptidão reprodutiva. Dentre estes, destacam-se as bactérias Spiroplasma (Filo Firmicutes, Classe Mollicutes, (Filo Spiroplasmatacea), Cardinium Bacteroidetes. Classe Sphingobacteria, Flexibacteraceae), e Wolbachia (Filo Proteobacteria, Alfa-Proteobacteria, Anaplasmataceae) (Enigl; Schausberger, 2007). Endossimbiontes do gênero Spiroplasma são bactérias Grampositivas, de tamanho pequeno, destituídas de parede celular e formato helicoidal (Whitcomb & Tully, 1982; Williamson et al., 1998). São conhecidas por alterar a razão sexual de besouros, moscas e borboletas pela eliminação de machos (Hurst & Jiggins, 2000). Além disso, foi relatado que Spiroplasma pode proteger Drosophila hydei do parasitismo por Leptopilina heteroma e Leptopilina bourlardi, além de aumentar a sobrevivência dos hospedeiros atacados por esses inimigos naturais (Xie et al., 2014). Essas bactérias podem ser transmitidas verticalmente de forma transovariana ou horizontalmente entre os hospedeiros por meio das plantas (Markham, 1983; Gasparich, 2002). Na condição de endossimbionte, Spiroplasma é normalmente encontrado na hemolinfa de seus hospedeiros, enquanto a fase intracelular do seu ciclo ocorre somente durante a transmissão vertical, quando a bactéria penetra o citoplasma do oócito e os sincícios iniciais do embrião (Gasparich, 2002; Anbutsu & Fukatsu, 2011).

### 2.2. Metabolômica

A técnica de metabolômica consiste em medir quantitativamente a resposta metabólica de sistemas biológicos aos estímulos fisiopatológicos ou alteração genética (Lindon et al., 2000). Vários campos da ciência têm utilizado essa ferramenta para diferentes finalidades, como estudar doenças humanas (Kaddurah-Daouk & Krishnan, 2009), a toxicidade de drogas (Wishart, 2008a) e análise de plantas e insetos (Hall et al., 2008; Cox et al., 2017). Os estudos de metabolômica são baseados em equipamentos que permitem a detecção, quantificação e identificação de metabólitos das amostras analisadas. Para isso, é necessária a utilização de ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia gasosa conectada a espectrometria de massas (GC-MS) (Wishart, 2008b). As análises geralmente são classificadas como direcionadas e não-direcionadas. A primeira visa grupos específicos de moléculas pretendidas, as quais, na maioria dos casos, precisam ser identificadas e quantificadas dentro do grupo (Ramautar et al., 2006). Já a análise não-direcionada explora a detecção de tantos grupos de moléculas quanto necessário para formar padrões ou impressões digitais sem necessariamente quantificar e/ou identificar um metabólito específico (Monton & Soga, 2007).

A metabôlomica oferece informações mais detalhadas na área da biologia de sistemas, as quais são reveladas a nível molecular de qualquer resposta genômica, transcritômica e proteômica de uma célula, tecido ou sistema vivo que são estimulados ou alterados (Weckwerth, 2003; Kell, 2004). Algumas reações podem ser elaboradas antes da análise completa dos dados. Por exemplo, na cromatografia gasosa é comum realizar a derivatização dos compostos para torna-los mais voláteis. Tal processo ocorre em duas etapas como a oximação das amostras (conversão de aldeídos e cetonas em oximas), para diminuir o tautomerismo, e a sililação, que torna os compostos mais voláteis por diminuir a hidrofilicidade dos grupos funcionais OH, SH ou NH. Para isso, muitos reagentes de oximação e sililação foram testados para verificar os compostos mais adequados para a reação. Dessa forma, foi observado que o cloridrato de metoxiamina em piridina e o N-metil-N-trimetilsilil-trifluorcetamida mostraram ser os reagentes mais eficientes para as reações de oximação e sililação (Gullberg et al., 2004).

Os metabólitos são os produtos de várias reações enzimáticas e proteicas que ocorrem dentro da célula. Dessa maneira, essas moléculas são mais próximas das respostas de um fenótipo ou doença do que a referência genética ou proteômica (Navon et al., 1983; Pfeuffer et al., 1999). Uma modificação no nível de expressão gênica ou de uma proteína nem sempre

está relacionado a oscilações no nível de atividade de um peptídeo; porém, uma alteração no metabólito só acontece através dessa mudança (Ter Kuile et al., 2001). Todos os seres vivos podem ser modificados por qualquer variável de fatores ambientais ou experimentais, como temperatura, idade, alimentação, pH, reprodução e ciclos de vida (Álvarez-Sanchez et al., 2010ab). As análises do metaboloma se tornam difíceis devido à variabilidade das amostras, pois cada célula, tecido, órgão e sistema é exclusivamente único (Rubakhin et al., 2011). No entanto, o objetivo geral da metabolômica é identificar algumas propriedades químicas contra uma grande quantidade de dados de metabólitos que constituem um sistema (Wishart et al., 2007).

Em insetos, alguns estudos demonstraram a importância da análise metabolômica para compreender o funcionamento de sistemas biológicos (Leiss et al., 2009; Kostal et al., 2011; Malmendal et al., 2013; Mamai et al., 2014). Já foram realizadas várias abordagens metabolômicas com o bicho da seda, Bombyx mori. Dentre elas, foi analisada a hemolinfa (Chen et al., 2015; Zhou et al., 2015) e o cérebro da larva (Li et al., 2015). Também, foram analisados o sistema nutricional (Chen et al., 2015), estágios de vida individual (Zhou et al., 2015) e o comportamento de locomoção (Li et al., 2015). Na mosca-das-frutas, Drosophila melanogaster, foi analisado o perfil metabolômico da mosca em resposta ao choque térmico (Malmendal et al., 2006; Overgaard et al., 2007). A metabolômica forneceu informações necessárias para compreender diferentes funções dos metabólitos alterados significativamente alterados em larvas de *Helicoverpa armigera* em resposta à diapausa (Zhang et al., 2013). O metaboloma de Anopheles gambiae foi analisado por meio de cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a espectrometria de massa em tandem (UPLC-MS/MS) para verificar alterações de metabólitos em mosquitos infectados por colônias de bactérias da espécie Mycobacterium ulcerans. Dessa forma, foi descoberto que esses microrganismos induzem a ruptura do metabolismo de lipídeos de seus hospedeiros (Hoxmeier et al., 2015). Técnicas metabolômicas auxiliaram em estudos da resposta metabólica dos insetos após infecção com fungos. Assim, foi visto que Beauveria bassiana pode alterar aminoácidos, lipídeos, derivados de ácidos graxos e açúcares em larvas de Bombyx mori (Xu et al., 2015).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Criação de Aphis citricidus

Duas linhagens isogênicas de *Aphis citridus* de laboratório, desenvolvidas por Guidolin (2016) à partir da microinjeção de *Spiroplasma* em parte da dos indivíduos da isolinhagem sadia, foram mantidas em mudas de *Citrus sinensis*, contendo brotações novas. As mudas eram mantidas no interior de gaiolas de acrílico (50cm de altura x 15cm de diâmetro), tendo aberturas em suas laterais para permitir a ventilação. Os insetos foram mantidos em condições controladas durante todo o experimento (25±2°C; 60 ± 10% UR; 14 h de fotofase).

### 3.2. Análise de metabólitos de Aphis citricidus em GCMS-TOF

Fêmeas adultas ápteras das isolinhagens irmãs infectadas (S+) ou livres (S-) de *Spiroplasma* foram selecionadas para a extração dos metabólitos do pulgão. Os insetos coletados foram agrupados em grupos de 25 fêmeas (= aproximadamente 25 mg/cada), para compor cada repetição biológica analisada para cada uma das isolinhagens estudadas, S+ e S-. As análises foram conduzidas utilizando-se de cinco repetições biológicas por tratamento, com um total de 125 fêmeas/tratamento (S+ e S-).

Os pulgões foram coletados nas plantas com auxílio de pincel e imediatamente imersos em 500 µL de solução de extração (clorofórmio:metanol:água; 3:1:1) dentro de microtubos. As amostras foram submetidas ao processo de lise celular mecânica pela adição de esferas de tungstênio de 3 mm à amostra, seguida por agitação a 20 Hz por 10 min (TissueLyser, Quiagen). Depois disso, as amostras foram centrifugadas (16000 g x 10 min x 4°C), o sobrenadante coletado e o material armazenado a -80°C em frascos de vidro.

As amostras foram secas em cabeça de nitrogênio para posterior derivatização. A derivatização foi realizada pela adição de 30 μL de metoxiamina-HCL (20 mg.mLμ-¹) em piridina às amostras por 16 h, em temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a trimetilsililação pela adição de 30 μL de n-metil-n-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) com 1% de trimetilclorosilano (TMCS) às amostras, seguida de incubação por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 30 μL de heptano a cada amostra. A análise das amostras foi realizada de forma casualizada, 30 min depois da adição do heptano,

seguindo as recomendações de Gullberg et al. (2004), utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-TOF/MS) (Pegasus HT, Leco, St. Joseph, MI, USA), com uma amostra controle (branco) e vários n-alcanos (C12-C40), os quais auxiliaram a calcular os índices de tempo de retenção (Schauer et al. 2005). Foram utilizadas duas repetições técnicas para cada repetição biológica de cada um dos tratamentos (S+ e S-), totalizando 10 corridas para cada tratamento.

As amostras derivatizadas foram injetadas automaticamente (1µL) por meio de um injetor em modo splitless com um amostrador automático [auto sampler-CTC Combi Pal Xt Duo (CTC Analytics AG, Switzerland)], ligado a cromatógrafo a gás (Agilent 7890A), equipado com duas colunas de sílica fundida. A primeira coluna (DB 5-Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA) tem 20 m comprimento x 0.18 mm diâmetro interno (d.i) x 0.18 µm de espessura; a segunda (RXT-17, ResteK Corporation, Bellefonte, PA, USA) possui 0.84 m comprimento x 0.1 mm (d.i) x 0.1 µm de espessura. O injetor foi programado na temperatura de 280°C com a taxa de purga do septo de 20 mL.min-1, a qual se iniciou depois de 250s do início da assimilação dos dados. A coluna estava com um fluxo de gás de 1 mL.min-1. Sendo assim, a temperatura da primeira coluna permaneceu a 80°C, por 2 min, elevando-se em 15°C.min<sup>-1</sup>, até a temperatura final de 310°C, a qual foi mantida por 10 min. Além disso, o efluente da coluna foi inserido na fonte de ionização do espectrômetro de massas GC-TOF/MS Pegasus HT (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). Houve um ajuste das temperaturas da linha de transferência e da fonte de ionização para 280 e 250°C. Os íons foram gerados por uma fonte de elétrons (70-eV), com corrente de ionização de 2.0 mA, sendo recebidos 20 spectros.s<sup>-1</sup> em uma faixa de m/z de 45-800; a voltagem do detector foi programada para 1.500 V. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

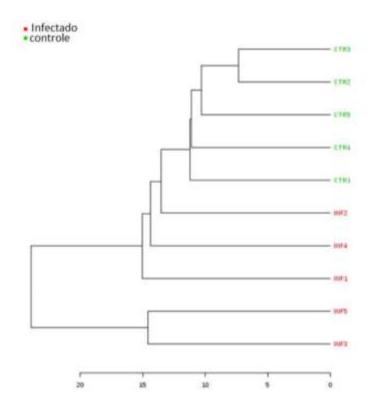
Os dados de espectrometria de massas gerados para identificação foram transferidos para o ChromaTOF 2.12 Software (LECO Corporation). Também foi utilizado o programa TargetSearch, com base na programação R (Inostroza et al., 2009), para corrigir linhas de base, retirar os ruídos, detectar e integrar os picos e alinhar os cromatogramas.

Os dados assim obtidos foram submetidos ao processo de verificação de integridade e de filtragem para a remoção de variáveis não informativas no processo de análise de dados, utilizando as ferramentas disponíveis no programa MetaboAnalyst (Xia et al. 2012). Na sequência, os dados foram normalizados pela mediana da amostra, com transformação log generalizada (glog<sub>2</sub>) e auto-escalonamento pela escala de Pareto, em que se utiliza a média centralizada dividida pela raíz quadrada do desvio padrão de cada variável. Os dados foram

submetidos à análise utilizando-se do teste t (p < 0.05), de componentes principais (PCA) e análise discriminante pelo método dos míminos quadrados parciais (PLS-DA). Todas as análises e imagens gráficas foram realizadas utilizando-se das ferramentas disponíveis no programa MetaboAnalyst (Xia et al. 2012).

### 4. RESULTADOS

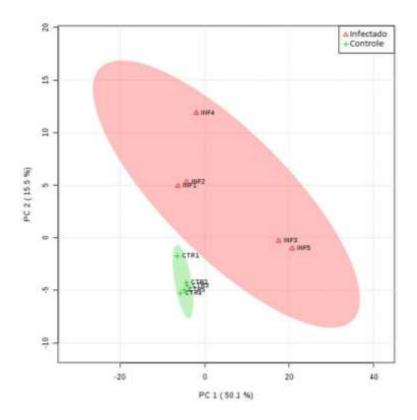
Análises de agrupamento com o conjunto total de metabólitos identificados demonstraram que o padrão de resposta obtido para cada repetição dos diferentes tratamentos analisados permitiu a separação dos mesmos em grupos bem definidos. Todas as repetições realizadas para os pulgões não-infectados se agruparam em um clado mais interno, com menor variação entre as repetições, sendo as repetições 2 (CTR2) e 3 (CTR3) as mais distintas do grupo. Variação maior foi encontra nas amostras de pulgões infectados por *Spiroplasma*. Nesse caso, as amostras se distribuíram em um subclado colocado mais proximamente ás amostras de pulgões não-infectados, enquanto duas delas, as amostras 3 (INF3) e 5 (INF5), formaram um clado à parte, localizado externamente (Figura 1).



**Figura 1.** Cladograma das amostras do metaboloma de *Aphis citricidus* infectado (INF) ou não (CTR) por *Spiroplasma*. Foi utilizada a medida de distância euclidiana e agrupamento pelo algoritmo com o método Ward D. A barra de escala representa as medidas de distância entre as amostras analisadas.

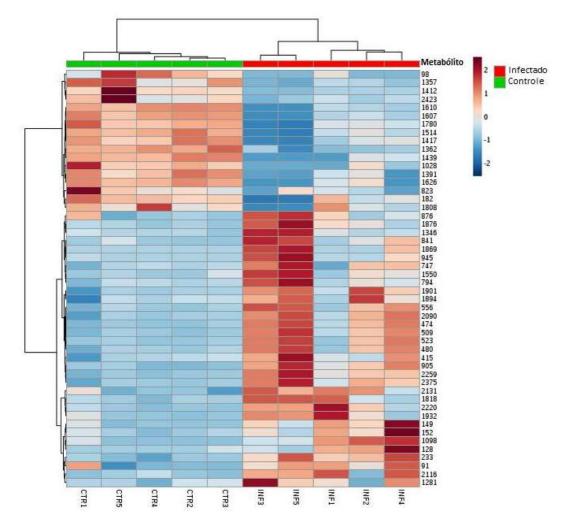
A maior dispersão dos dados entre as amostras de pulgões infectados também pode ser facilmente verificada pela análise de componentes principais, em que o conjunto de dados obtidos para o controle é muito mais homogêneo. Além disso, o componente 1 foi o que

melhor explicou a variação encontrada, 50,1%, contra apenas 15,5% do componente 2 (Figura 2).



**Figura 2.** Análise dos componentes principais (PCA) do perfil metabolômico de *Aphis citricidus* infectado e não infectado por *Spiroplasma*.

Quando apenas os 50 metabólitos que apresentaram as maiores diferenças entre os metabolomas analisados foram selecionados, foi possível verificar a formação de dois grupos bem definidos, representados ou por amostras de pulgões sadios, ou por amostras de pulgões infectados por *Spiroplasma*. Adicionalmente, foi possível verificar que maioria dos metabólitos apresentaram incremento do seu sinal iônico no metaboloma de *A. citricidus* quando infectado por *Spiroplasma*, nas condições estudadas, indicando que esse simbionte exerce regulação positiva na maioria dos metabólitos de seu hospedeiro que foram influenciados pelo processo de infecção (Figura 3).



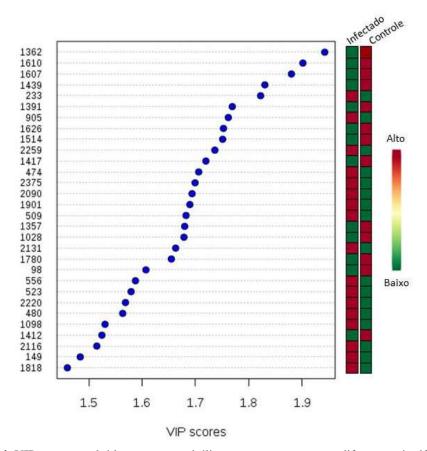
**Figura 3.** Heatmap ilustrativo com os 50 metabólitos que apresentaram as variações mais significativas na análise comparativa dos metabolomas de *Aphis citricidus*, infectados ou não por *Spiroplasma*. Os níveis de metabólitos foram expressos em relação ao valor médio dos metabólitos de insetos infectados e não-infectados pelo endossimbionte secundário. A discriminação hierárquica mostra as diferenças entre os dois grupos: verde (não infectado) e vermelho (infectado).

Mas após a utilização de filtros e análises estatística, 40 metabólitos apresentaram diferença significativa na intensidade do sinal m/z entre os tratamentos analisados (p < 0.05) (Tabela 1). Dos 40 metabólitos influenciados, 33 deles identificados putativamente, a análise do metaboloma de A. citricidus indicou regulação positiva de 21 metabólitos e a regulação negativa de 19 metabólitos em insetos infectados quando comparados aos não-infectado (Tabela 1).

**Tabela 1.** Metabólitos importantes que mostraram diferenças entre cada condição (pulgões infectados e livre de *Spiroplasma*). Os dados foram submetidos ao teste t (p < 0,05).

id	metabólito	valor <i>t</i>	valor <i>p</i>	$log_2 (Infectado/controle) \\$
91	ácido n-heptanoico	2.8653	0.020981	1,487
98	inderteminado	-3.6548	0.00645	-3,111
149	ácido oxâmico	3.0227	0.01649	2,936
152	alanina amida	2.394	0.043583	1,484
182	allo-treonina	-2.6349	0.02995	-1,118
233	1-metil-hidantoina	5.7306	0.000439	0,322
415	2-fenil-acetamida	2.697	0.027198	1,370
474	n-pentadecano	4.3707	0.002378	1,069
480	ácido 4-acetamido-butanoico	3.4066	0.009269	1,083
509	ácido n-metil-glutâmico	4.1745	0.003103	1,082
523	n-butanoil-homoserina lactona	3.4928	0.008165	1,034
556	ácido trans-cinâmico	3.5389	0.007632	1,037
747	ácido cisteinesulfínico	2.3812	0.044462	1,209
841	indeterminado	2.638	0.029807	3,275
905	indeterminado	4.9189	0.001166	0,109
1028	ácido hipúrico	-4.1437	0.003237	-2,479
1098	n-pentadecan-1-ol	3.2375	0.011923	3,498
1357	ácido 4-hidroximetil-3-metoxi-fenoxiacético	-4.1545	0.003189	-2,402
1362	ácido 9-(Z)-hexadecenoico	-9.2108	1.56E-05	-2,036
1391	ácido hexadecanoico	-5.0049	0.001046	-2,056
1412	5-hidroxi-lisina	-3.2088	0.012447	-2,350
1417	indeterminado	-4.4911	0.002026	-1,616
1439	alantoina	-5.8631	0.000377	-2,293
1514	ácido heptadecanoico	-4.8027	0.001351	-1,285
1607	ácido 9-(E)-octadecenoico	-6.8947	0.000125	-1,979
1610	ácido n-octadecadienoico	-7.5067	6.88E-05	-2,135
1626	ácido octadecanoico	-4.8194	0.001322	-2,051
1780	ácido metilester heneicosanoico	-3.9682	0.004129	-1,306
1818	n-pentacosano	2.9201	0.019287	0,207
1876	citidina-2',3'-monofosfato cíclico	2.5889	0.032168	-0,118
1894	n-hexacosano	2.8161	0.022629	-0,148
1901	n-tetradecanoyl-homoserina lactona	4.2318	0.002869	0,183
1932	espermina	2.8187	0.022539	0,261
2090	n-octacosano	4.2659	0.002739	0,196
2116	maltitol	3.1634	0.013327	1,147
2131	indeterminado	4.0268	0.003805	1,339
2220	indeterminado	3.4349	0.008891	0,341
2259	diidroprogesterona	4.6525	0.001639	0,168
2375	n-dotriacontano	4.3133	0.002569	0,131
2423	indeterminado	-2.5316	0.035169	-2,139

A diferença significativa identificada entre os metabólitos pelas análises utilizandose o teste t foi corroborada pelos escores da importância da variável na projeção (*Variable Importance in Projection - VIP*), a qual é uma variação da técnica Jackknife de reamostragem, demonstrando que todos os 40 metabólitos que apresentaram diferença estatística são importantes para explicar o efeito da infecção de *A. citricidus* por *Spiroplasma* (Figura 4).



**Figura 4.** VIP escores obtidos para metabólitos que apresentaram diferença significativa entre os metabolomas de *Aphis citricidus* infectados ou não por *Spiroplasma*, demonstrando a relevância dos mesmos, de acordo com as análises de PLS-DA, para comprovar o efeito da infecção por *Spiroplasma* no metaboloma de *A. citricidus*.

### 5. DISCUSSÃO

As análises metabolômicas mostraram que existem diferenças na intensidade de metabólitos de *Aphis citricidus* infectados por *Spiroplasma*. As análises indicaram que cerca da metade dos 40 metabólitos influenciados pela infecção por *Spiroplasma* apresentaram regulação positiva, enquanto a outra metade regulação negativa. A infecção pelo endossimbionte alterou, principalmente, o metabolismo de ácidos graxos, hidrocarbonetos e de compostos nitrogenados do pulgão.

Dos dez ácidos graxos de *A. citricidus* innfluenciados pela infecção por *Spiroplasma*, 8 sofreram redução em sua intensidade, sendo aumentada a intensidade apenas dos ácidos oxâmico e n-heptanoico. Ácidos graxos desempenham papel comum no transporte, mobilização e armazemento de energia e como componentes fundamentais na composição de membranas celulares (Stanley-Samuelson et al., 1998). Nos insetos, os ácidos graxos também tem papel importante na composição de ceras que são depositadas na superfície da cutícula dos insetos (Lockey, 1988), como precursores na síntese de feromônios (Howard, 1993), como componentes das secreções de defesa de insetos (Callow et al., 1973), e na produção de eicosanoides, que também tem papel na resposta imunológica de insetos (Miller et al., 1994), incluindo a subclasse representada pelas prostaglandinas, que também desempenham função na regulação da reprodução (Blomquist et al., 1991).

Eicosanoides, incluindo as prostaglnadinas, são comumente produzidos a partir dos ácidos graxos de cadeia com 20 carbonos, como o di-homo-γ-linolênico (20:3, n-6), ácido aracdônico (20:4, n-6) e o ácido eicosapentenoico (20:5, n-3) (Stanley-Samuelson & Loher, 1986). Assim, mesmo com a ausência dos ácidos graxos precursores de eicosanoides na lista de metabólitos regulados pela infecção por *Spiroplasma*, os dados encontrados sugerem que a regulação negativa dos ácidos graxos de cadeia longa levariam à redução na disponibilidade de eicosanoides, interferindo, dessa forma, no papel dessas substâncias na regulação da resposta imunológica. Isso seria possível devido à deficiência de insetos em sintetizarem ácidos graxos de cadeia com 20 carbonos, sendo esses metabólitos obtidos diretamente do alimento ou pela conversão de ácidos graxos de cadeia longa (Shen et al. 2010). Dessa forma, os resultados encontrados permite a formulação de hipótese que a regulação negativa dos ácidos graxos de cadeia longa em *A. citricidus* por *Spiroplasma* estaria ligada à diminuição da capacidade de resposta imunológica do hospedeiro, buscando, assim, favorecer a colonização do hospedeiro por *Spiroplasma*.

Ácidos graxos também desempenham função de defesa como componentes de secreções defensivas, sendo encontrados no fluido da cornícula de pulgões, junto com compostos voláteis do feromônio de alarme (Callow et al., 1973). Dados recentes demonstraram que os ácidos octadecanoico (= ácido esteárico) e hexadecanoico (= ácido palmítico) foram encontrados em secreções da cornícula de *A. citricidus*, sendo o ácido hexadecanoico o mais abundante (Alfaress et al., 2016). Assim, a menor intensidade do ácido hexadecanoico nas secreções da cornícula de *A. citricidus* infectados por *Spiroplasma* pode comprometer o as funções que essas secreções deveriam desempenhar.

O ácido oxâmico, a monoamida do ácido oxálico, um dos ácidos graxos que apresentaram regulação positiva de sua intensidade em pulgões infectados por *Spiroplasma*, é potente inibidor da atividade da lactato deidrogenase, uma das enzimas envolvidas no metabolismo energético das células, incluindo as de procariotos (Markert, 1984). Nossos dados não nos permite propor se a maior intensidade do inibidor da atividade da lactato deidrogenase, o ácido graxo ácido oxâmico, teria como papel influenciar o metabolismo das células do hospedeiro ou do simbionte primário hospedado pelo mesmo, já que ambos (tecidos do hospedeiro e simbiontes primários) representariam competidores pelos nutrientes disponíveis.

Ácidos graxos também são importantes componentes da cutícula de insetos, já que a camada de lipídeos que recobre o tegumento dos insetos tem papel fundamental na proteção do inseto contra a dessecação, assim como na defesa cuticular (Golebiowski et al., 2008, 2013, Gibbs & Rajpurohit, 2010) . Assim, a mudança na disponibilidade desses metabólitos pode influenciar a capacidade dos lipídeos que compõem a camada mais externa da cutícula em proteger o inseto contra dessecação e infecção por patógenos.

Vários hidrocarbonetos cuticulares de *A. citricidus* foram influenciados pela infecção por *Spiroplasma*. A alteração da disponibilidade de ácidos graxos presentes no organismo, assim como descrito anteriormente, pode ter influenciado a produção de metabólitos derivados, como os hidrocarbonetos cuticulares (Otte et al., 2015). Mas o perfil de hidrocarbonetos cuticulares também podem ser influenciado por processos de infecção, idade, sexo e atividade reprodutiva (Lecuona et al. 1991, Cuvillier-Hot et al. 2001, Polerstock et al. 2002). Todos os hidrocarbonetos detectados na análise do metaboloma de *A. citricidus* como sendo influenciados pela infecção por *Spiroplasma*, foram mais intensos nas amostras infectadas. Hidrocarbonetos cuticulares, assim como os ácidos graxos, participam no revestimento da cutícula dos insetos, desempenhando função importante na proteção do inseto contra a dessecação (Gibbs, 1998). Apesar da composição dos hidrocarbonetos cuticulares

poder ser variável ao longo da vida do inseto, seja ela influenciada pela alimentação ou pela idade, esses metabólitos funcionam como marcadores que acabam resultando em padrões específicos para cada espécie, população e/ou sexo do inseto, podendo, inclusive, servir na identificação de espécies, mesmo aquelas que são muitos próximas filogeneticamente (Carlson, 1979, Cobb & Jallon, 1990, Phillips et al., 1990). Dessa forma, os hidrocarbonetos cuticulares também são importantes na ecologia comportamental dos insetos, participando da comunicação química intra e interespecífica (Howard & Blomquist, 2005; Chung & Carroll, 2015). Assim, é possível que a alteração dos hidrocarbonetos cuticulares do pulgão possa influenciar no reconhecimento de indivíduos da mesma colônia e nas interações com o terceiro nível trófico, já que muitos inimigos naturais utilizam essas substâncias para o reconhecimento de seus hospedeiros/presas (Singer, 1998, Morehead & Feener 2000). A modificação no perfil desses hidrocarbonetos na cutícula também poderia indicar alterações na capacidade de proteção em relação às condições adversas do ambiente, mas essa hipótese necessitaria de maiores informações acerca da composição de hidrocarbonetos apenas na cutícula do inseto.

O metabolismo de compostos nitrogenados de A. citricudus também foi influenciado pelo parasitismo por Spiroplasma. Apesar de reduzir a intensidade dos amino ácidos 5hidroxi-lisina e allo-treonina, a infecção por Spiroplasma elevou a intensidade do amino ácido ácido cisteinesulfinico e de metabólitos que podem participar da síntese de outros amino ácidos, como a 1-metil-hidantoina, que pode ser hidrolisada a glicina, a 2-fenil-acetamida, que é intermediário da fenilalanina. Derivativos de amino ácidos também foram influenciados, como o ácido n-metil-glutâmico. A regulação do metabolismo de nitrogênio também pode ser verificada pela regulação negativa na intensidade de alantoina, um produto da degradação do ácido úrico (Donnellan & Kilby, 1967). Os dois aminoácidos que apresentaram redução em sua intensidade, lisina e treonina, são produzidos pelo simbionte primário dos pulgões, Buchnera aphidicola, no processo de produção complementar de metabólitos junto ao hospedeiro. Ácido glutâmico e fenilalanina são aminoácidos que precisam ser produzidos pelo hospedeiro e transferidos ao simbionte primário para seu metabolismo (Wilson et al. 2010; Hansen & Moran 2010). A regulação desses aminoácidos pela conversão em derivativos ou pelo acúmulo de intermediários, sugere que Spiroplasma interfere na relação metabólica hospedeiro-simbionte primário, interferindo no crescimento de B. aphidicola. precisa ser fornecido ao simbionte pelo pulgão.

A redução do metabolismo nitrogenado em pulgões infectados, assim como indicado pela forte redução na intensidade de alantoína, associada também à maior intensidade do inibidor da lactato deidrogenase, corroboram com a hipótese de que *Spiroplasma* interfira na relação metabólica hospedeiro-*B. aphidicola* para favorecer o seu processo de infecção. A regulação do metabolismo do hospedeiro-simbionte primário para o favorecimento do crescimento de *Spiroplasma* pode ser argumentado pelo aumento da intensidade da poliamina espermina em pulgões infectados, visto o papel desse metabólito como fator de crescimento para bactérias (Michael, 2016).

Adicionalmente, há elevação da intensidade de dois metabólitos, n-butanoil-homoserina lactona e n-tetradecanoyl-homoserina lactona, os quais participam dos mecanismos de comunicação "quorum sensing" e "quorum quencing". Quorum sensing é um mecanismo de comunicação química utilizada para que a célula possa perceber as informações do meio e alterar sua resposta de transcrição gênica, regulando, por exemplo, seu crescimento em resposta a densidade de células. Já o quorum quenching é um mecanismo de regulação do quorum sensing (Huang et al., 2016). A presença desses metabólitos indica a comunicação entre as células bacterianas presentes no hospedeiro.

# 6. CONCLUSÕES

- Spiroplasma altera o metaboloma Aphis citricidus;
- Spiroplasma interfere negativamente no metabolismo de ácidos graxos de Aphis citricidus;
- Spiroplasma interfere positivamente no metabolismo de hidrocarbonetos de Aphis citricidus;
- *Spiroplasma* interfere no metabolismo de compostos nitrogenados de *Aphis citricidus*, interferindo no metabolismo associado de *Aphis citricidus Buchnera aphidicola*.

# REFERÊNCIAS

- ALFARESS, Serine et al. Chemical composition of cornicle secretion of the brown citrus aphid *Toxoptera citricida*. **Physiological Entomology**, v. 41, n. 1, p. 38-47, 2016.
- ALIFERIS, Konstantinos et al. Gas chromatography—mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. **Journal of insect physiology**, v. 58, n. 10, p. 1349-1359, 2012.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B et al. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 111-119, 2010a.
- ALVAREZ-SANCHEZ, B et al. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 120-127, 2010b.
- ANBUTSU, Hisashi; FUKATSU, Takema. *Spiroplasma* as a model insect endosymbiont. **Environmental microbiology reports**, v. 3, n. 2, p. 144-153, 2011.
- ANDERSON, Roy M.; MAY, R. M. Coevolution of hosts and parasites. **Parasitology**, v. 85, n. 02, p. 411-426, 1982.
- ARRESE, Estela L.; SOULAGES, Jose L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.
- BAUMANN, Linda et al. Sequence analysis of DNA fragments from the genome of the primary endosymbiont of the whitefly *Bemisia tabaci*. **Current microbiology**, v. 48, n. 1, p. 77-81, 2004.
- BAUMANN, P. Bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 155-189, 2005
- BLACKLOCK, Brenda J.; RYAN, Robert O. Hemolymph lipid transport. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 24, n. 9, p. 855-873, 1994.
- BLOMQUIST, Gary et al. Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in insects. **Insect Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 99-106, 1991.
- BOURTZIS, K.; MILLER, T.A. Insect symbiosis. Boca Raton: CRC Press, 276p, 2003.
- BRAIG, Henk R. et al. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila* simulans with a mosquito counterpart. **Nature**, v. 367, n. 6462, p. 453-455, 1994.
- BROWNLIE, J.C.; JOHNSON, K.N. Symbiont-mediated protection in insect host. **Trends Microbiol**, v.17, p. 348-354, 2009.
- BUCHNER, P. Endosymbiosis of animals with plant microorganism. **Interscience**. New York: John Wiley, 909p. 1965.
- BULL, J et al. Selection of benevolence in a host-parasite system. **Evolution**, p. 875-882, 1991.
- BURKE, Gaelen et al. Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of pea aphids. **The ISME journal**, v. 4, n. 2, p. 242, 2010.
- CALLOW, R. K.; GREENWAY, A. R.; GRIFFITHS, D. C. Chemistry of the secretion from the cornicles of various species of aphids. **Journal of Insect Physiology**, v. 19, n. 4, p. 737-748, 1973.
- CAMPBELL JR, L. Leon. The mechanism of allantoin degradation by a *Pseudomonas*. **Journal of bacteriology**, v. 68, n. 5, p. 598, 1954.
- CARLE, P. et al. Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 178-181, 1995.
- CARLSON, D. A.; SERVICE, M. W. Differentiation between species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae) by analysis of cuticular hydrocarbons. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 73, n. 6, p. 589-592, 1979.

- CASPI-FLUGER, A. et al. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. Proc. **R. Soc. B**, v. 279, p. 1791-1796, 2012.
- CHEN, De-Qiao et al. A new *Rickettsia* from a herbivorous insect, the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris). **Current microbiology**, v. 33, n. 2, p. 123-128, 1996.
- CHEN, Quanmei et al. GC/MS-based metabolomic studies reveal key roles of glycine in regulating silk synthesis in silkworm, *Bombyx mori*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 57, p. 41-50, 2015.
- CHIN, Jacqueline SR et al. Sex-specific triacylglycerides are widely conserved in *Drosophila* and mediate mating behavior. **Elife**, v. 3, p. e01751, 2014.
- CHUNG, Henry; CARROLL, Sean B. Wax, sex and the origin of species: dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. **Bioessays**, v. 37, n. 7, p. 822-830, 2015.
- COBB, Matthew; JALLON, Jean-Marc. Pheromones, mate recognition and courtship stimulation in the *Drosophila melanogaster* species sub-group. **Animal Behaviour**, v. 39, n. 6, p. 1058-1067, 1990.
- COX, James et al. Metabolomic Studies in *Drosophila*. **Genetics**, v. 206, n. 3, p. 1169-1185, 2017.
- CUADROS-INOSTROZA, Álvaro et al. Target Search-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 428, 2009.
- CUVILLIER-HOT, Virginie et al. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 4, p. 485-493, 2001.
- DARBY, A. C. et al. The significance of a facultative bacterium to natural populations of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. **Ecological Entomology**, v. 28, n. 2, p. 145-150, 2003.
- DARBY, Alistair C. et al. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, n. 1, p. 43-50, 2001.
- DE BEKKER, Charissa et al. Metabolomics reveals the heterogeneous secretome of two entomopathogenic fungi to ex vivo cultured insect tissues. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70609, 2013.
- DONNELLAN, J. F.; KILBY, B. A. Uric acid metabolism by symbiotic bacteria from the fat body of *Periplaneta americana*. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 22, n. 1, p. 235-252, 1967.
- DOUGLAS, A. E. Mycetocyte symbiosis in insects. **Biological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 409-434, 1989.
- DOUGLAS, A. E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 17-37, 1998.
- DOWNER,R.G.H.; MATTHEWS, J. R. Patterns of lipid distribution and utilisation in insects. **American Zoologist**, v. 16, n. 4, p. 733-745, 1976.
- ENGELSTADER, J. et al. N. Coexistence of cytoplasmic incompatibility and male-killing-inducing endosymbionts, and their impact on host gene flow. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 73, p. 125-133, 2008.
- ENIGL, M.; SCHAUSBERGER, P. Incidence of the endosymbionts *Wolbachia*, *Cardinium* and *Spiroplasma* in phytoseiid mites and associated prey. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.42, n.2, p.75-85, June 2007
- EWALD, P. VV. Transmission modes and evolution of parasitism-mutualism continuum. **Ann. NY Acao'. Sci**, v. 503, p. 295-306. 1987.
- FERRARI, Julia; VAVRE, Fabrice. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 366, n. 1569, p. 1389-1400, 2011.

- FUKATSU, T.; NIKOH, N. Two intracelluar symbiotic bacteria from the mulberry psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology**, Washignton, v. 64, n. 10, p. 3599-3606, 1998.
- FUKATSU, Takema et al. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1284-1291, 2001.
- FUKATSU, Takema et al. The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2748-2758, 2000.
- FUKATSU, Takema. Secondary intracellular symbiotic bacteria in aphids of the genus *Yamatocallis* (Homoptera: Aphididae: Drepanosiphinae). **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5315-5320, 2001.
- FUKATSU, Takema; NIKOH, Naruo. Endosymbiotic Microbiota of the Bamboo Pseudococcid *Antonina crawii* (Insecta, Homoptera). **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 2, p. 643-650, 2000.
- GASPARICH, Gail E. *Spiroplasmas*: evolution, adaptation and diversity. **Front. Biosci**, v. 7, n. 6, p. 19-40, 2002.
- GHERNA, Robert L. et al. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 563-565, 1991.
- GIBBS, Allen G. Water-proofing properties of cuticular lipids. **American Zoologist**, v. 38, n. 3, p. 471-482, 1998.
- GIBBS, Allen G.; RAJPUROHIT, Subhash. Cuticular lipids and water balance. **Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology**, p. 100-120, 2010.
- GOŁĘBIOWSKI, Marek et al. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 6, p. 619-627, 2008.
- GUIDOLIN, A. S.; CÔNSOLI, F. L. Diversity of the Most Commonly Reported Facultative Symbionts in Two Closely-Related Aphids with Different Host Ranges. **Neotropical Entomology**, p. 1-7, 2017.
- GUIDOLIN, Aline Sartori. Multipartite interactions of *Aphis (Toxoptera)* and their associated symbionts. **Tese de Doutorado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 200p, 2016.
- GULLBERG, Jonas et al. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical biochemistry**, v. 331, n. 2, p. 283-295, 2004.
- HALBERT, Susan E. *Toxoptera Citricida* (Kirkaldy), Brown Citrus Aphid: Identification, Biology and Management Strategies. **Fla. Department Agric. & Consumer Services**, Division of Plant Industry, 1996.HALL, Robert et al. Plant metabolomics and its potential application for human nutrition. **Physiologia plantarum**, v. 132, n. 2, p. 162-175, 2008.
- HENRY, S. M.; BLOCK, R. J. Amino Acid Synthesis, A Ruminant-Like Effect Of Intracellular Symbionts Of German Cockroach. In: **Federation Proceedings**. 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3998: Federation Amer Soc Exp Biol, p. 9-&. 1962.
- HOFFMANN, A et al. Cytoplasmic incompatibility in insects, pp. 42-80. In O'NEILL, S et al. A (ed). Influential passengers. **Oxford University Press**, New YorK, 1997.
- HOWARD, Ralph W. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. **Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology**, p. 179-226, 1993.
- HOWARD, Ralph W.; BLOMQUIST, Gary J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 50, p. 371-393, 2005.

- HOXMEIER, J. Charles et al. Analysis of the metabolome of *Anopheles gambiae* mosquito after exposure to Mycobacterium ulcerans. **Scientific reports**, v. 5, 2015.
- HUANG, Jinhui et al. Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing and quorum quenching hold promise to determine the performance of biological wastewater treatments: an overview. **Chemosphere**, v. 157, p. 137-151, 2016.
- HURST, G. D. D. et al. Invasion of one insect species, *Adalia bipunctata*, by two different male-killing bacteria. **Insect molecular biology**, v. 8, n. 1, p. 133-139, 1999.
- HURST, G. D.; JIGGINS, Francis M. Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. **Emerging infectious diseases**, v. 6, n. 4, p. 329, 2000.
- ISHIKAWA, H. Insect symbiosis: An introduction. Insect Symbiosis. 2003.
- JIGGINS, F. M. et al. The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. **Parasitology**, v. 120, n. 5, p. 439-446, 2000.
- KADDURAH-DAOUK, Rima; KRISHNAN, K. Ranga Rama. Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 173, 2009.
- KAMBRIS, Z et al. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. **Science**, Washington, v. 326, p. 134-136, 2009.
- KELL, Douglas B. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 3, p. 296-307, 2004.
- KIKUCHI, Yoshitomo et al. Symbiont-mediated insecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 22, p. 8618-8622, 2012.
- KISHANI FARAHANI, Hossein et al. Does *Wolbachia* infection affect decision-making in a parasitic wasp?. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 155, n. 2, p. 102-116, 2015.
- KOENIGER, N.; VEITH, H. J. Glyceryl-1, 2-dioleate-3-palmitate, a brood pheromone of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 39, n. 9, p. 1051-1052, 1983.
- KONDO, Natsuko et al. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14280-14285, 2002.
- KOSTAL, Vladimir et al. Long-term cold acclimation extends survival time at 0 C and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**, v. 6, n. 9, 2011.
- KREMER, Natacha et al. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 10, p. e1000630, 2009.
- KÜHBANDNER, Stephan et al. Deciphering the signature of cuticular lipids with contact sex pheromone function in a parasitic wasp. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 14, p. 2471-2478, 2012.
- KÜHBANDNER, Stephan; RUTHER, Joachim. Solid Phase Micro-extraction (SPME) with In Situ Transesterification: An Easy Method for the Detection of Non-volatile Fatty Acid Derivatives on the Insect Cuticle. **Journal of chemical ecology**, v. 41, n. 6, p. 584-592, 2015.
- LECUONA, R. et al. Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. brongniartii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 1, p. 10-18, 1991.
- LEISS, Kirsten A. et al. NMR metabolomics of thrips (*Frankliniella occidentalis*) resistance in Senecio hybrids. **Journal of chemical ecology**, v. 35, n. 2, p. 219-229, 2009.
- LEONARDO, Teresa E.; MUIRU, Gladys T. Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl 2, p. S209-S212, 2003.

- LI, Yi et al. Integrative proteomics and metabolomics analysis of insect larva brain: Novel insights into the molecular mechanism of insect wandering behavior. **Journal of proteome research**, v. 15, n. 1, p. 193-204, 2015.
- LINDON, John C. et al. Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 12, n. 5, p. 289-320, 2000.
- LOCKEY, Kenneth H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, v. 89, n. 4, p. 595-645, 1988.
- MALMENDAL, Anders et al. Metabolomic analysis of the selection response of *Drosophila melanogaster* to environmental stress: are there links to gene expression and phenotypic traits?. **Naturwissenschaften**, v. 100, n. 5, p. 417-427, 2013.
- MALMENDAL, Anders et al. Metabolomic profiling of heat stress: hardening and recovery of homeostasis in *Drosophila*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 1, p. R205-R212, 2006.
- MALMENDAL, Anders et al. Metabolomic profiling of heat stress: hardening and recovery of homeostasis in *Drosophila*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 1, p. R205-R212, 2006.
- MAMAI, Wadaka et al. Metabolomic and ecdysteroid variations in *Anopheles gambiae* sl mosquitoes exposed to the stressful conditions of the dry season in Burkina Faso, West Africa. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 87, n. 3, p. 486-497, 2014.
- MARKERT, Clement L. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. **Cell biochemistry and function**, v. 2, n. 3, p. 131-134, 1984.
- MARKHAM, P. G. *Spiroplasmas* in leafhoppers: a review. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 56, n. 5-6, p. 745, 1983.
- MICHAEL, Anthony J. Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 29, p. 14896-14903, 2016.
- MILLER, Jon et al. Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 26, p. 12418-12422, 1994.
- MONTENEGRO, H. et al. Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. **Insect molecular biology**, v. 14, n. 3, p. 281-287, 2005.
- MONTLLOR, Clytia et al. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon* pisum under heat stress. **Ecological Entomology**, v. 27, n. 2, p. 189-195, 2002.
- MONTON, Maria Rowena N.; SOGA, Tomoyoshi. Metabolome analysis by capillary electrophoresis—mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1, p. 237-246, 2007.
- MORAN, N.A. et al. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. Annu. **Rev. Genet.**, v.42, p.165-190, 2008.
- MORAN, Nancy; BAUMANN, Paul. Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 9, n. 1, p. 15-20, 1994.
- MOREHEAD, Shellee A.; FEENER, Donald H. Visual and chemical cues used in host location and acceptance by a dipteran parasitoid. **Journal of Insect Behavior**, v. 13, n. 4, p. 613-625, 2000.
- MOYA, Andrés et al. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. **Nature reviews. Genetics**, v. 9, n. 3, p. 218, 2008.
- NAKABACHI, A. et al. Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. **Current Biology**, Cambridge, v.23, n.15, p. 1478-1484, 2013.

- NAVON, Gil et al. Differences in metabolite levels upon differentiation of intact neuroblastoma× glioma cells observed by proton NMR spectroscopy. **FEBS letters**, v. 162, n. 2, p. 320-323, 1983.
- NICHOLSON, Jeremy K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. **Molecular systems biology**, v. 2, n. 1, p. 52, 2006.
- NICHOLSON, Jeremy K.; WILSON, Ian D. Understanding' global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 8, p. 668-676, 2003.
- NIRGIANAKI, Androniki et al. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. **Current microbiology**, v. 47, n. 2, p. 0093-0101, 2003.
- OLIVER, K.M. et al. Variation in resistence to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 102, n36, p. 12795-12800, 2005.
- OLIVER, Kerry M. et al. Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 992-994, 2009.
- OTTE, Tobias et al. The effect of dietary fatty acids on the cuticular hydrocarbon phenotype of an herbivorous insect and consequences for mate recognition. **Journal of chemical ecology**, v. 41, n. 1, p. 32-43, 2015.
- OVERGAARD, Johannes et al. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 12, p. 1218-1232, 2007..
- PENG, Yu; WANG, YuFeng. Infection of *Wolbachia* may improve the olfactory response of *Drosophila*. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, n. 8, p. 1369-1375, 2009.
- PENNANEC, H. et al. Insect hydrocarbons: analysis, structures and functions. **EPPO Bulletin**, v. 25, n. 1-2, p. 343-348, 1995.
- PFEUFFER, Josef et al. Toward an in vivo neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time 1H NMR spectra of the rat brain. **Journal of magnetic resonance**, v. 141, n. 1, p. 104-120, 1999.
- PHILLIPS, A. et al. Intraspecific variation in the cuticular hydrocarbons of the sandfly *Phlebotomus perfiliewi* from Italy. **Medical and veterinary entomology**, v. 4, n. 4, p. 451-457, 1990.
- POLERSTOCK, Addie et al. Mating alters the cuticular hydrocarbons of female Anopheles gambiae sensu stricto and Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 39, n. 3, p. 545-552, 2002.
- PUJOL-LEREIS, Luciana Mercedes et al. Chill-coma recovery time, age and sex determine lipid profiles in *Ceratitis capitata* tissues. **Journal of insect physiology**, v. 87, p. 53-62, 2016.
- PUJOL-LEREIS, Luciana Mercedes et al. Lipid profiles as indicators of functional senescence in the medfly. **Experimental gerontology**, v. 47, n. 6, p. 465-472, 2012.
- RAMAUTAR, Rawi et al. Capillary electrophoresis in metabolomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 455-466, 2006.
- RIO, Rita VM; HU, Youjia; AKSOY, Serap. Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 7, p. 325-336, 2004.
- RUBAKHIN, Stanislav S. et al. Profiling metabolites and peptides in single cells. **Nature methods**, v. 8, n. 4s, p. S20-S29, 2011.
- RUSSELL, Jacob A.; MORAN, Nancy A. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1586, p. 603-610, 2006.

- RUSSELL, Jacob. et al. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 4, p. 1061-1075, 2003.
- SANCHEZ-CONTRERAS, Maria; VLISIDOU, Isabella. The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 25, n. 1, p. 203-244, 2008.
- SANDSTRÖM, Jonas P. et al. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 1, p. 217-228, 2001.
- SCHAUER, Nicolas et al. GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS letters**, v. 579, n. 6, p. 1332-1337, 2005.
- SCHMIDT, Charles W. Metabolomics: what's happening downstream of DNA. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 7, p. A410, 2004.
- SHIGENOBU, Shuji et al. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. **Nature**, v. 407, n. 6800, p. 81, 2000.
- SINGER, Theresa L. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. **American Zoologist**, v. 38, n. 2, p. 394-405, 1998.
- STANLEY, David Warren et al. **Insect lipids: chemistry, biochemistry, and biology**. U of Nebraska Press, 1993.
- STANLEY-SAMUELSON, David W. et al. Fatty acids in insects: composition, metabolism, and biological significance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 9, n. 1, p. 1-33, 1988.
- STANLEY-SAMUELSON, David W.; LOHER, Werner. Prostaglandins in insect reproduction. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 6, p. 841-853, 1986.SHEN, Li Rong et al. *Drosophila lacks* C20 and C22 PUFAs. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 10, p. 2985-2992, 2010.
- STORECK, A. et al. The role of plant chemical cues in determining host preference in the generalist aphid parasitoid *Aphidius colemani*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 97, n. 1, p. 41-46, 2000.
- STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasp in biological control. **Entomophaga**, Paris, v.38,n. 1,p. 3-6, Mar.1993.
- STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J.A.; HURST, G.D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulatior of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology**, v.53, p.71-102, 1999.
- STRONG, F. et al. Studies on lipids in some homopterous insects. **California Agriculture**, v. 34, n. 2, p. 43-61, 1963.
- SUBANDIYAH, Siti et al. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). **Zoological Science**, v. 17, n. 7, p. 983-989, 2000.
- TANAKA, Y.; KAYA, H.K. Insect pathology. New York: Academy Press, 666p,1993.
- TEIXEIRA, Luís; FERREIRA, Álvaro; ASHBURNER, Michael. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Biol**, v. 6, n. 12, p. e1000002, 2008.
- TER KUILE, Benno et al. Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. **FEBS letters**, v. 500, n. 3, p. 169-171, 2001.
- THAO, MyLo L. et al. Secondary endosymbionts of psyllids have been acquired multiple times. **Current microbiology**, v. 41, n. 4, p. 300-304, 2000.
- THAO, MyLo Ly; BAUMANN, Paul. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). **Current microbiology**, v. 48, n. 2, p. 140-144, 2004.

- THOMPSON, S. N. A review and comparative characterization of the fatty acid compositions of seven insect orders. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, v. 45, n. 2, p. 467-482, 1973.
- TÓTH, László. Entwicklungszyklus und symbiose von *Pemphigus spirothecae* Pass.(Aphidina). **Zoomorphology**, v. 33, n. 3, p. 412-437, 1937.
- TRIJBELS, F.; VOGELS, G. D. Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation**, v. 113, n. 2, p. 292-301, 1966.
- TSUCHIDA, Tsutomu et al. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 10, p. 2123-2135, 2002.
- UNTERMAN, B et al. Pea aphid symbiont relationships established by analysis of 16S rRNAs. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 6, p. 2970-2974, 1989.
- VORBURGER, Christoph et al. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. **Biology letters**, v. 6, n. 1, p. 109-111, 2010.
- WANG, Yulan et al. Integrated Metabonomic—Proteomic Analysis of an Insect—Bacterial Symbiotic System. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 3, p. 1257-1267, 2010.
- WATANABE, K. et al. Intrasperm vertical symbiont transmission. **PNAS**, v.111, n. 20, p. 7433-7437, 2014.
- WECKWERTH, Wolfram. Metabolomics in systems biology. **Annual review of plant biology**, v. 54, n. 1, p. 669-689, 2003.
- WEEKS, Andrew R.; BREEUWER, Johannes AJ. A new bacterium from the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum that causes sex-ratio distortion. **Insect symbiosis**, p. 165-176, 2003.
- WHITCOMB, Robert F.; TULLY, Joseph G. Taxonomy and identification of *spiroplasmas*. **Reviews of infectious diseases**, v. 4, n. Supplement\_1, p. S148-S153, 1982.
- WILLIAMSON, David et al. *Spiroplasma poulsonii* sp. nov., a new species associated with male-lethality in *Drosophila willistoni*, a neotropical species of fruit fly. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 611-618, 1999.
- WILLIAMSON, David et al. Revised group classification of the genus *Spiroplasma*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 1998.
- WILSON, Alex et al. Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. **Insect molecular biology**, v. 19, n. s2, p. 249-258, 2010.
- WISHART, David S. Applications of metabolomics in drug discovery and development. **Drugs in R & D**, v. 9, n. 5, p. 307-322, 2008a.
- WISHART, David S. et al. HMDB: the human metabolome database. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl\_1, p. D521-D526, 2007.
- WISHART, David S. Quantitative metabolomics using NMR. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 228-237, 2008b.
- XIA, Jianguo et al. MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. **Nucleic acids research**, v. 40, n. W1, p. W127-W133, 2012.
- XIE, Jialei et al. Effect of the *Drosophila* endosymbiont *Spiroplasma* on parasitoid wasp development and on the reproductive fitness of wasp-attacked fly survivors. **Evolutionary ecology**, v. 25, n. 5, p. 1065-1079, 2011.
- XIE, Jialei et al. Male killing *Spiroplasma* protects *Drosophila melanogaster* against two parasitoid wasps. **Heredity**, v. 112, n. 4, p. 399-408, 2014

- XIE, Jialei et al. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. **Plos one**, v. 5, n. 8, p. e12149, 2010.
- XU, Yong-Jiang et al. Metabolomics reveals insect metabolic responses associated with fungal infection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 16, p. 4815-4821, 2015.
- YEW, Joanne Y. et al. Male-specific transfer and fine scale spatial differences of newly identified cuticular hydrocarbons and triacylglycerides in a *Drosophila species* pair. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16898, 2011.
- ZCHORI-FEIN, Einat et al. Characterization of a 'Bacteroidetes' symbiont in *Encarsia wasps* (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of 'Candidatus Cardinium hertigii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 961-968, 2004.
- ZCHORI-FEIN, Einat; BROWN, J. K. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, n. 6, p. 711-718, 2002.
- ZHANG, Qi et al. Proteomic and metabolomic profiles of larval hemolymph associated with diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 751, 2013.
- ZHOU, Lihong et al. Developmental changes for the hemolymph metabolome of silkworm (*Bombyx mori* L.). **Journal of proteome research**, v. 14, n. 5, p. 2331-2347, 2015.