

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**ESTUDO DOS MECANISMOS DE ALCALINIZAÇÃO INTESTINAL EM FÊMEAS
DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:PSYCHODIDAE)**

DENISE BARGUIL NEPOMUCENO

Belo Horizonte - MG
2019

DENISE BARGUIL NEPOMUCENO

**ESTUDO DOS MECANISMOS DE ALCALINIZAÇÃO INTESTINAL EM FÊMEAS
DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:PSYCHODIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Belo Horizonte – MG
2019

043 Nepomuceno, Denise Barguil.
Estudo dos mecanismos de alcalinização intestinal em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) [manuscrito] / Denise Barguil Nepomuceno. - 2019.
79 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. *Lutzomyia*. 2. Intestinos - Parasitos - Teses. 3. Alcalinização. I. Gontijo, Nelder de Figueiredo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



Universidade Federal de Minas Gerais



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

300/2019/14
entrada
2º/2015
2015747057

ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO

Denise Barguil Nepomuceno

Às quatorze horas do dia 31 de outubro do ano de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “Estudo dos mecanismos de alcalinização intestinal em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)”, área de concentração: Entomologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

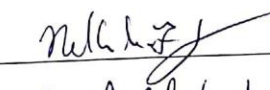
Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo	UFMG	APROVADA
Dr. Fernando Ariel Genta	IOC/FIOCRUZ - RJ	APROVADA
Dra. Alessandra Aparecida Guarneri	IRR/FIOCRUZ - BH	APROVADA
Dr. André Gustavo de Oliveira	UFMG	APROVADA
Dr. Theo Rolla Paula Mota	UFMG	APROVADA

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	correções entregues em mão

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 31 de outubro de 2019.

Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo 
(Orientador)


Dr. Fernando Ariel Genta 

Dra. Alessandra Aparecida Guarneri 

Dr. André Gustavo de Oliveira 

Dr. Theo Rolla Paula Mota 

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador


Profa. Daniella Castanheira Bartholomeu
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia
SIAPE: 1517341

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a meus pais, ao meu orientador, Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo, à família LFIH e a todos meus grandes amigos que me acompanharam nessa jornada. Agradeço também ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, especialmente às secretárias Sumara e Sibeles pelo suporte e apoio ao longo de todos os anos de pós-graduação, e à CAPES, pela bolsa concedida, bem como às demais agências de fomento que propiciaram a execução deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 - Esquema do intestino de um flebotomíneo	15
Figura 2 - Intestino de fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> dissecado logo após o repasto sanguíneo.....	16
Figura 3 – Intestino de fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentada com solução de sacarose 10% contendo azul de bromotimol 0,1% em pH 6.....	27
Figura 4 – Padrão de cores do corante azul de bromotimol em soluções tamponadas em diferentes pH.....	27
Figura 5 - Lâmina utilizada para captura simultânea de imagens de intestinos tratados com SFI ou com solução de aminoácidos MEM.....	29
Figura 6 - Efeito da aplicação da solução MEM de aminoácidos em diferentes concentrações no pH do intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	40
Figura 7 - Variação da fluorescência emitida por fluoresceína de acordo com o pH.....	41
Figura 8 – Percentual da intensidade da fluorescência emitida em intestinos abertos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em resposta ao tratamento com SFI ou solução de aminoácidos MEM.....	42
Figura 9 – Percentual da intensidade da fluorescência emitida em intestinos fechados de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em resposta ao tratamento com SFI ou solução de aminoácidos MEM.	44
Figura 10 – Variação na emissão de fluorescência em resposta a diferentes tratamentos.....	45
Figura 11- Análise do gene LULOPAT1.....	46
Figura 12 – Predição das assinaturas de AaePAT1, LULOPAT1 e alguns outros possíveis transportadores de aminoácidos em <i>Lutzomyia longipalpis</i>	47
Figura 13 – Análise do produto de PCR referente ao gene LULOPAT1.....	48
Figura 14 - Expressão (qPCR) de LULOPAT1 (LLOJ004373) no intestino de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em diferentes condições nutricionais.....	49
Figura 15 – Percentual da intensidade da emissão de fluorescência em intestinos abertos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após o tratamento com serina, leucina, arginina ou lisina	50
Figura 16 – Percentual da intensidade da emissão de fluorescência em intestinos fechados de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após o tratamento com serina, leucina, arginina ou lisina	51

Figura 17 – Percentual da intensidade da emissão de fluorescência em intestinos fechados de <i>Lutzomyia longipalpis</i> tratados com SFI ou arginina 10mM	52
Figura 18 - pH do intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após tratamento com hemolinfa de fêmeas em jejum ou com repasto sanguíneo.....	53
Figura 19 - Dendograma representando a análise evolutiva do gene 4E-BP.....	54
Figura 20 - Expressão (qPCR) de Lulo4E-BP (LLOJ007311-PA) no intestino de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em diferentes condições nutricionais.....	55
Figura 21 - Avaliação por <i>western blotting</i> da fosforilação de 4E-BP em intestinos de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	55
Figura 22 - Efeito da inibição do sistema TOR por rapamicina na alcalinização estimulada pela hemolinfa de fêmeas com repasto no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	56
Figura 23 - Efeito da inibição da via TOR por rapamicina na alcalinização induzida por aminoácidos no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	57
Figura 24 - Avaliação da atividade de ATPases no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	58
Figura 25 - Efeito do tratamento com d-cAMP ou cGMP no pH de intestinos ácidos ($\text{pH} \leq 6$) de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	59
Figura 26 - Efeito do tratamento com d-cAMP ou cGMP no pH de intestinos alcalinos ($\text{pH} \geq 7$) de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	59
Figura 27 - Esquema representativo de um intestino aberto corado com fluoresceína, tratado com solução MEM de aminoácidos.....	62
Figura 28 - Esquema representativo de um intestino fechado corado com fluoresceína, tratado com solução MEM de aminoácidos.....	63
Quadro 1 - Sequências de iniciadores utilizados nos experimentos de PCR e qPCR para avaliação do gene LLOJ004373.....	32
Quadro 2 – Sequências de iniciadores utilizadas na avaliação da expressão de 4EBP no intestino de <i>Lutzomyia longipalpis</i> por qPCR.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP – proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4E

AA - aminoácidos

ARS – Após Repasto Sanguíneo

ATP – trifosfato de adenosina

cAMP – monofosfato cíclico de adenosina

CAT - *Cationic Amino acid Transporter*

cDNA – DNA complementar

cGMP – monofosfato cíclico de guanosina

d-cAMP - dibutyryl-cAMP

eIF4E - fator de iniciação de tradução eucariótico 4E

GAPDH- Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

h – horas

HAT - *Heterodimeric Amino acid Transporter*

HEPES – *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromolar

mg - miligrama

mL - mililitro

mM - milimolar

MEM – *Minimum Essential Medium*

MES – *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*

mRNA – RNA mensageiro

NAT – *Nutrient Amino acid Transporters*

nm – nanometro

PAT – *Proton Amino acid Transporter*

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

Pb – pares de base

Pd – padrão de peso molecular

pH - potencial hidrogeniônico

PIKK - *Phosphatidylinositol kinase-related kinase*

qPCR - PCR quantitativo (= PCR em tempo real)

S6K - S6-kinase

SFI – Solução Fisiológica de Insetos

SLC – *Solute Carrier Family*

SNAT – *Sodium-coupled Amino acid Transporter*

Taq - *Thermophilus aquaticus*

TBS – *Tris Buffered Saline*

Thr - treonina

TOR – *Target of Rapamycin*

RESUMO

Lutzomyia longipalpis é um díptero hematófago que atua como principal vetor de protozoários do gênero *Leishmania* nas Américas. Considerando que, no inseto vetor, o desenvolvimento de *Leishmania* é exclusivamente no tubo digestivo, estudos sobre a fisiologia intestinal destes insetos, especialmente do controle do pH intestinal, tornam-se indispensáveis. Os mecanismos que ativam a alcalinização do intestino médio, quando as fêmeas deixam de se alimentar de açúcares e fazem repasto sanguíneo, ainda não foram plenamente elucidados. Sabe-se que o transporte diferencial de íons, evento comum às células do tubo digestivo e associado à energização das membranas, com o transporte de nutrientes e com o controle do pH no meio, pode ser ativado a partir da sinalização conduzida por segundos mensageiros intracelulares. Sistemas de transporte de aminoácidos são cruciais na fisiologia de dípteros hematófagos, e alguns transportadores funcionam fazendo simporte de íons H^+ com aminoácidos. Propõe-se, então, que estes transportadores podem estar envolvidos na regulação do pH intestinal. Além disso, o sistema TOR, uma via de sinalização intracelular altamente conservada entre os organismos eucariotos, é especialmente ativado pela presença de aminoácidos; uma vez que a digestão do sangue é um processo essencialmente enzimático e gera aumento da concentração de aminoácidos, é possível que esse sistema seja ativado mediante o repasto sanguíneo e participe da alcalinização intestinal. Contudo, não há estudos abordando tais aspectos em *L. longipalpis*. Desta forma, este trabalho objetivou estudar os mecanismos que atuam no controle da alcalinização intestinal em fêmeas de *L. longipalpis*. A partir de preparações *ex-vivo*, intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* corados com azul de bromotimol, e, sabidamente em $pH \leq 6$, foram tratados com diferentes concentrações de uma solução de aminoácidos. Verificou-se que a presença de aminoácidos estimulava a alcalinização, mas a intensidade do processo variava com a concentração utilizada. Mediante a elaboração de uma metodologia mais sensível para avaliar alterações de pH intestinal a partir da presença de aminoácidos, passou-se a utilizar o corante fluoresceína, cuja emissão de fluorescência varia com o pH do meio. Em intestinos abertos, onde o corante estava presente apenas no citoplasma dos enterócitos, a adição da solução de aminoácidos provocou significativa redução da fluorescência emitida, evidenciando precisamente que íons H^+ foram transportados do lúmen intestinal para o citoplasma dos enterócitos, culminando na acidificação desse compartimento. Em intestinos fechados a aplicação da solução de aminoácidos induziu o aumento da emissão de fluorescência, o que está em acordo com o fato que a acidificação do citoplasma dos enterócitos necessariamente implica na alcalinização do lúmen intestinal. A investigação da participação de transportadores de aminoácidos levou à identificação de LULOPAT1, um transportador especializado no simporte aminoácidos/ H^+ , expresso apenas no intestino e modulado pelo estado nutricional de *L. longipalpis*, havendo aumento significativo de expressão logo após o repasto sanguíneo. LULOPAT1 é localizado na superfície apical do intestino, o que está em acordo com o fato de que apenas em intestinos abertos a entrada de aminoácidos pelo lúmen intestinal era possível, resultando na acidificação do citoplasma dos enterócitos. Outros transportadores estão envolvidos na entrada de aminoácidos através da membrana basolateral dos intestinos, e serão investigados em estudos futuros. A avaliação do papel de ATPases na geração de um gradiente eletroquímico através de membranas em fêmeas com repasto sanguíneo evidenciou que a principal bomba eletrogênica envolvida nesse processo seria a Na^+/K^+ -ATPase. Na presença de ouabaína, inibidor específico de Na^+/K^+ -ATPase, a atividade enzimática total reduziu significativamente de $1,186 \pm 0,340 \mu mol PO_4^{3-} h^{-1}$ à $0,416 \pm 0,0596 \mu mol PO_4^{3-} h^{-1}$ ($p < 0,05$), indicando que ela seria responsável por mais de 60% da atividade total medida. Ao avaliarmos o efeito da hemolinfa de fêmeas com repasto sob o pH intestinal, verificou-se que a hemolinfa coletada no intervalo de 0-3 horas após repasto sanguíneo promoveu intenso estímulo à alcalinização em relação ao intervalo 30-33 horas. Em

fases mais avançadas da digestão a concentração de moléculas alcalinizantes decresceria, mas a atividade de enzimas proteolíticas seria máxima, com maior quantidade de aminoácidos sendo absorvidos pelos enterócitos, o que contribuiria para a manutenção do pH alcalino. Ao avaliarmos a participação do sistema TOR no controle de pH intestinal, inicialmente identificou-se a sequência do gene 4E-BP, um dos principais alvos *downstream* de TOR. A ativação de TOR necessariamente implica na fosforilação de 4E-BP, e os experimentos de *western blotting* com o anticorpo Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) permitiram evidenciar que a proteína era intensamente fosforilada nas primeiras horas após repasto sanguíneo. Ao avaliarmos uma possível associação entre ativação de TOR e alcalinização induzida pela presença de aminoácidos e pela hemolinfa de fêmeas com repasto, utilizou-se intestinos ácidos ($\text{pH} \leq 6$), corados com azul de bromotimol, previamente tratados com rapamicina (inibidor específico de TOR). A inibição do sistema TOR não afetou a alcalinização intestinal estimulada por aminoácidos, mas afetou intensamente o efeito da hemolinfa de fêmeas com repasto, sugerindo que o estímulo à elevação do pH intestinal na presença de aminoácidos ocorre também por outros sistemas que não TOR. Ao estudarmos a possível participação de cAMP e cGMP no controle de pH intestinal, utilizando preparações *ex-vivo* de intestinos ácidos ($\text{pH} \leq 6$), contendo azul de bromotimol, verificou-se que a presença de cAMP induziu a alcalinização intestinal, enquanto cGMP não produziu quaisquer alterações. Por outro lado, em intestinos previamente alcalinizados por ingestão de soro inativado, cAMP não interferiu no pH intestinal, mas o tratamento com cGMP acidificou o lúmen intestinal. O estudo realizado desvendou mecanismos que participam ativamente na regulação do pH intestinal, além de propor novas vias que podem ter influência nesse processo, expandindo sobremaneira os conhecimentos existentes da fisiologia digestiva de *L. longipalpis*. Espera-se em breve ser possível elaborar um modelo de funcionamento que contemple todos os mecanismos envolvidos no controle do pH intestinal em *L. longipalpis*.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*, pH, intestino médio, LULOPAT1, sistema TOR.

ABSTRACT

Lutzomyia longipalpis is a well-known Diptera for its role as the main vector of *Leishmania* parasites in America. Considering the development of *Leishmania* is restricted to the sand flies' gut, studies regarding the digestive physiology of these insects, specially pH regulation, become essential. The mechanisms involved in the process of midgut's alkalization, which is triggered when females take a blood meal, are not completely elucidated. It is known that ionic transport, a common event in intestinal cells, also associated to membranes energization, nutrients transport and with pH control, may be activated through signaling by second messengers. Amino acids transporters are essential for the digestive physiology of hematophagous diptera and, considering that. Besides, the TOR pathway, an intracellular signaling system highly conserved among eukaryotes, is especially activated in the presence of amino acids; considering blood digestion is, basically, an enzymatic process and provides a great increase in amino acids concentration, it may be activated a consequence of hematophagy and have a potential role in the alkalization of abdominal midgut. Thus, this work aimed to study the mechanisms involved in the control of intestinal alkalization in *L. longipalpis* females. From *ex-vivo* preparations of acidic midguts ($\text{pH} \leq 6$), previously stained with Bromothymol blue, we found that the treatment with an amino acids solution stimulated the alkalization of the midguts, but the intensity of the process varied in accordance with the concentration of the solution. When developing a method more accurate to evaluate intestinal pH changes in the presence of amino acids, we decided to use fluorescein dye, whose emission of fluorescence varies with the pH of the medium. In opened midguts, where the dye was present only in the cytoplasm of enterocytes, the presence of amino acids stimulated a significant reduction in fluorescence emission, showing precisely that H^+ ions were transported from intestinal lumen to enterocyte's cytoplasm, leading to the acidification of this compartment. In unopened midguts, the presence of amino acids led to an increase in fluorescence emission, which is in agreement with the fact that intracellular acidification necessarily implies in the alkalization of intestinal lumen. The investigation of the involvement of amino acids transporters allowed the identification of LULOPAT1, a transporter specialized in the symport of amino acids and H^+ ions, which is present only in the midgut and has its expression modulated by the nutritional status of the insect: it increases significantly in the first hours after a blood meal. LULOPAT1 is located in the apical side of the midgut, which agrees with our observation that, only in opened midguts, the presence of amino acids in the intestinal lumen was possible, resulting in the acidification of enterocyte's cytoplasm. Other types of transporters are involved in the entrance of the amino acids by the basolateral membrane, and will be investigated further. The evaluation of ATPases role in energizing membranes in blood fed females showed that the main eletrogenic pump related would be Na^+/K^+ -ATP. In the presence of ouabain, a specific inhibitor of Na^+/K^+ -ATPase, total enzymatic activity reduced from $1,186 \pm 0,340 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ h}^{-1}$ to $0,416 \pm 0,0596 \mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ h}^{-1}$ ($p < 0,05$), indicating that this pump was responsible for more than 60% of the total anzymatic activity assayed. Through the evaluation of the effect of the hemolymph from blood fed females in intestinal pH, we verified that hemolymph collected 0-3 hours after blood feeding was an intense stimulus to alkalization when compared to that collect 30-33 hours after blood feeding. In later stages of blood digestion, the concentration of alkalizing hormones would decrease, but the activity of proteolytic enzymes would at its maximum, with a higher proportion of amino acids being absorbed by the enterocytes, which, then, would be responsible for maintaining an alkaline pH until the end of digestion. Analyzing the involvement of TOR pathway in the control of intestinal pH, we first identified the sequence of 4E-BP gene, one of the main downstream targets of TOR, in the midguts of *L. longipalpis*. TOR activation necessarily implies in 4E-BP phosphorylation, and western blotting experiments with the antibody Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) showed the protein was highly

phosphorylated in the first hours after a blood meal. The possible relation between TOR activation and the alkalization induced in the presence of amino acids and in the presence of hemolymph was investigated using acidic intestines ($\text{pH} \leq 6$), stained with Bromothymol blue, previously treated with rapamycin, an specific inhibitor of TOR pathway. Inhibition of TOR did not affected the efficacy of amino acids inducing alkalization, but strongly interfered in the action of hemolymph on pH, suggesting that pH increase mediated by amino acids occurs through systems others than TOR. When investigating the possible participation of cAMP and cGMP in the regulation of intestinal pH, using *ex-vivo* preparations of acid intestines ($\text{pH} \leq 6$), stained with Bromotimol blue we found that the presence of cAMP induced intestinal alkalization, while cGMP did not produce any changes. On the other hand, in alkalized intestines, by prior treatment with inactivated serum, cAMP did not changed intestinal pH, which, in the presence of cGMP, became prominently acidic. This study unveiled mechanisms that actively participate in the regulation of intestinal pH, and proposed new pathways that may influence in this process, greatly expanding the existing knowledge regarding the digestive physiology of *L. longipalpis*. We expect in a near future to develop a working model that addresses all the mechanisms involved in intestinal pH control in *L. longipalpis*.

.
Key words: *Lutzomyia longipalpis*, pH, midgut, LULOPAT1, TOR pathway

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. ESTUDOS DO pH INTESTINAL EM <i>Lutzomyia longipalpis</i>	14
1.2. SISTEMAS TRANSPORTADORES INTESTINAIS.....	17
1.2.1. Sistemas Transportadores de Aminoácidos.....	17
1.2.2. Sistemas Transportadores de Íons.....	18
1.2.3. Sistema TOR.....	20
1.3 PARTICIPAÇÃO DE SEGUNDOS MENSAGEIROS NA REGULAÇÃO DO pH INTESTINAL.....	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1.OBJETIVO GERAL.....	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1.COMITÊ DE ÉTICA.....	26
4.2.MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE <i>Lutzomyia longipalpis</i>	26
4.3.VERIFICAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO pH INTESTINAL DE <i>Lutzomyia longipalpis</i> EM PREPARAÇÕES <i>ex-vivo</i>	26
4.4.CURVA pH X EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA POR FLUORESCEÍNA.....	27
4.5.VERIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO pH INTESTINAL A PARTIR DO USO DE FLUORESCEÍNA.....	28
4.6.ESTUDO DA EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR QUE FAZ SIMPORTE AMINOÁCIDOS/H ⁺ EM INTESTINOS DE FÊMEAS DE <i>Lutzomyia longipalpis</i>	30
4.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA de intestinos.....	30
4.6.2. Identificação do gene LLOJ004373 (PAT1) e seus ortólogos.....	31
4.6.3. PCR.....	31
4.6.4. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	32
4.7.EFEITO DA HEMOLINFA DE FÊMEAS EM DIFERENTES INTERVALOS APÓS REPASTO SANGUÍNEO NO pH INTESTINAL EM PREPARAÇÕES <i>ex- vivo</i>	32
4.8.ESTUDO DO SISTEMA TOR NO INTESTINO MÉDIO DE <i>L. longipalpis</i>	33

4.8.1. Identificação do gene codificante para 4E-BP em <i>L. longipalpis</i>	33
4.8.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	33
4.8.3. Análise da fosforilação de 4E-BP por <i>Western Blotting</i>	34
4.9. INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA TOR NO CONTROLE DO pH INTESTINAL.....	35
4.9.1. Investigação do sistema TOR na alcalinização intestinal estimulada por aminoácidos.....	35
4.9.2. Investigação do sistema TOR na alcalinização intestinal estimulada por hemolinfa de fêmeas alimentadas com sangue.....	35
4.10. MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DE Na ⁺ /K ⁺ -ATPase NO INTESTINO MÉDIO DE <i>L.</i> <i>longipalpis</i> APÓS REPASTO SANGUÍNEO.....	36
4.11. INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE SEGUNDOS MENSAGEIROS NA REGULAÇÃO DO pH INTESTINAL.....	37
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO pH INTESTINAL DE <i>Lutzomyia longipalpis</i> EM PREPARAÇÕES <i>ex-</i> <i>vivo</i>	39
5.2. USO DE FLUORESCÉINA NA AVALIAÇÃO DO CONTROLE DO pH INTESTINAL EM <i>Lutzomyia longipalpis</i>	41
5.2.1. Emissão de fluorescência por fluoresceína <i>versus</i> pH.....	41
5.2.2. Alterações no pH de intestinos corados com fluoresceína a partir da adição de solução MEM de aminoácidos, em preparações <i>ex-vivo</i>	42
5.2.2.1. Intestinos Abertos.....	42
5.2.2.2. Intestinos Fechados.....	43
5.3. ESTUDO DA EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS LULOPAT1 EM INTESTINOS DE FÊMEAS DE <i>Lutzomyia longipalpis</i>	45
5.3.1. Identificação do transportador de aminoácidos em intestino de <i>L. longipalpis</i>	45
5.3.2. Análise quantitativa da expressão gênica de LULOPAT1 em intestinos de <i>Lutzomyia</i> <i>longipalpis</i>	48
5.4. ALTERAÇÕES NO pH DE INTESTINOS CORADOS COM FLUORESCÉINA A PARTIR DA ADIÇÃO INDIVIDUAL DOS AMINOÁCIDOS ARGININA, LISINA, LEUCINA OU SERINA.....	49

5.4.1. Intestinos Abertos.....	49
5.4.2. Intestinos Fechados.....	50
5.5.EFEITO DA HEMOLINFA DE FÊMEAS, COLETADA EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS, NO pH INTESTINAL EM PREPARAÇÕES <i>ex- vivo</i>	52
5.6. ESTUDO DA SINALIZAÇÃO DO SISTEMA TOR EM INTESTINOS DE <i>Lutzomyia longipalpis</i>	54
5.6.1. Identificação de Lulo4E-BP.....	54
5.6.2. Análise da expressão gênica e da fosforilação de Lulo4E-BP em intestinos de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	55
5.7.ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA TOR NO CONTROLE DO pH INTESTINAL EM <i>Lutzomyia longipalpis</i>	56
5.7.1. Efeito da inibição do sistema TOR por rapamicina na alcalinização estimulada por hemolinfa de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com repasto.....	56
5.7.2. Efeito da inibição da via TOR por rapamicina na alcalinização estimulada por aminoácidos.....	56
5.8.ATIVIDADE DA BOMBA Na ⁺ /K ⁺ -ATPase NO INTESTINO MÉDIO DE <i>Lutzomyia longipalpis</i>	58
5.9.PAPEL DE SEGUNDOS MENSAGEIROS NO CONTROLE DO pH INTESTINAL.....	59
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTUDOS SOBRE O pH INTESTINAL EM *Lutzomyia longipalpis*

Flebotomíneos são dípteros nematóceros de tamanho diminuto (atingindo no máximo 3mm de comprimento), com o corpo recoberto por cerdas, e que durante seu ciclo biológico passam pelas fases de ovo, 4 estádios larvais, pupa e adultos, sendo, portanto, holometábolos (Killick-Kendric, 1999). Os espécimes adultos alimentam-se de açúcares disponíveis na natureza e que podem ser obtidos a partir da seiva de plantas, néctar e secreções de afídeos, mas as fêmeas necessitam também alimentar-se de sangue, essencial para a maturação do ovário e desenvolvimento dos ovócitos (Killick-Kendrick e Killick-Kendrick, 1987; Molyneaux et al., 1991; Cameron et al., 1995; Soares e Turco, 2003).

Dentre as inúmeras espécies de flebotomíneos, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva 1912) destaca-se por ser a principal vetora do protozoário *Leishmania infantum* nas Américas (Young e Duncan, 1994), agente etiológico da leishmaniose visceral. Essa doença, também conhecida como calazar, é uma zoonose que ocorre em 12 países, com cerca de 96% dos casos concentrados no Brasil, onde são registrados entre 4200 e 6300 novos casos por ano (Alvar et al., 2012; WHO, 2017; Bezerra et al., 2018).

O desenvolvimento de *Leishmania*, em flebotomíneos, é restrito ao ambiente intestinal. Assim, vários estudos já investigaram aspectos histológicos, bioquímicos e fisiológicos do tubo digestivo desses insetos. Sabe-se que o intestino médio é constituído por uma monocamada epitelial com células cilíndricas altamente polarizadas, as quais, no sentido do lúmen intestinal, apresentam microvilosidades densamente compactadas (Gemetchu, 1974; Rudin e Hecker, 1982). Quando as fêmeas ingerem sangue ocorrem mudanças não só na arquitetura do epitélio intestinal, mas também em vários parâmetros fisiológicos que tornarão o intestino médio abdominal um local adequado para digestão do sangue ingerido. Nesse sentido, um dos principais fatores seria o pH intestinal, o qual pode também influenciar no desenvolvimento de *L. infantum* na luz do tubo digestivo de *L. longipalpis* (Bates e Tetley, 1993; Gontijo et al. 1998; Santos et al. 2014).

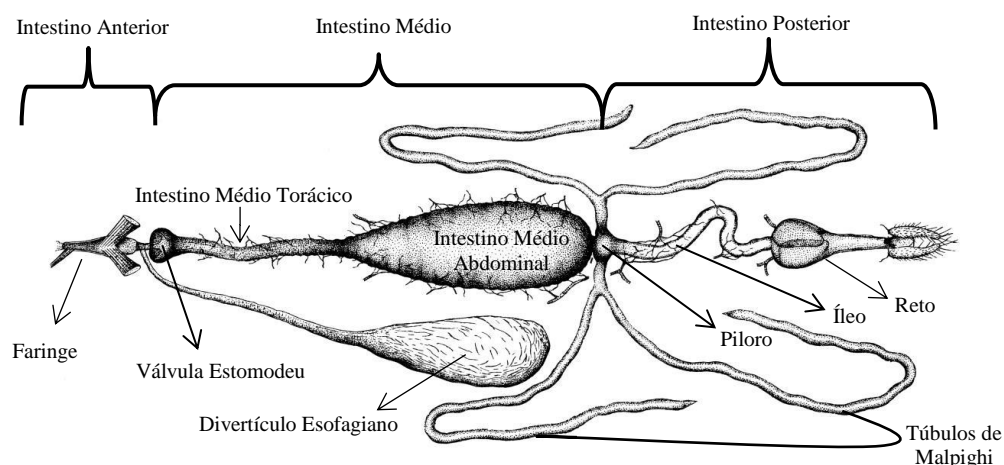


Figura 1 - Esquema do intestino de um flebotômio (Adaptado de Jobling, 1987).

Até o momento, os estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que o pH do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue é ativamente mantido em pH 6,0, mesmo após a ingestão de soluções altamente tamponadas em pH 7,5 (HEPES 160mM) ou pH 5 (MES 160mM) (Santos et al., 2008). Esse estado seria, em parte, mantido por V-ATPases, proteínas previamente descritas nos enterócitos de *L. longipalpis* que bombeiam prótons H^+ para o lúmen intestinal de modo a reacidificar o lúmen até o pH 6 usando a energia resultante da hidrólise de ATP (Ramalho-Ortigão et al. 2007). Esta condição é ideal para que ocorra a digestão dos açúcares ingeridos pelos insetos, os quais são inicialmente armazenados no divertículo, e então são vagarosamente enviados ao intestino médio para digestão e absorção dos monossacarídeos constituintes (Gontijo et al. 1998, Santos et al. 2008).

O principal dissacarídeo encontrado nestes alimentos é a sacarose, processada por uma enzima denominada alfa-glicosidase. A enzima é produzida pelo intestino médio e fica aderida às microvilosidades dos enterócitos, de forma que a maior parte de sua atividade se concentra no intestino médio torácico (Santos et al. 2008). Existem, também, outros tipos distintos de alfa-glicosidases, cuja produção pode ser constitutiva ou induzida pela alimentação e que parecem atuar em diferentes processos, incluindo a digestão de glicoproteínas e/ou glicolípídios presentes no sangue e também na mobilização de reservas energéticas em períodos de escassez de alimentos (da Costa et al. 2019)

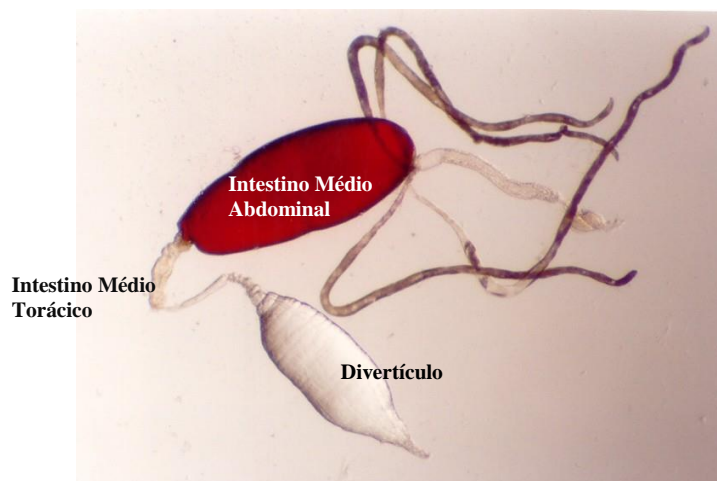


Figura 2 - Intestino de fêmea de *Lutzomyia longipalpis* dissecado logo após o repasto sanguíneo.

Em fêmeas de *L. longipalpis*, e provavelmente em todos os outros dípteros hematófagos da subordem Nematocera (outros flebotomíneos, mosquitos, simulídeos e ceratopogonídeos e membros da família Corethrelidae), os parâmetros fisiológicos do intestino médio precisam ser modificados subitamente de uma condição adequada ao processamento de açúcar, para uma condição fisiológica completamente diferente que permita a digestão do sangue ingerido (Gontijo et al. 1998; Santos et al. 2008, Santos et al. 2011). O sangue ingerido durante o repasto sanguíneo vai diretamente para a porção abdominal do intestino médio (Figura 2). Nesta região, o mecanismo de manutenção do pH 6 precisa ser desligado de modo que o ambiente possa sofrer alcalinização e permitir o funcionamento das enzimas responsáveis pela digestão do sangue. Durante esse período, a digestão dos açúcares acontece normalmente na porção torácica do intestino médio, onde o pH 6 permanece inalterado e onde a atividade da alfa-glicosidase ligada às microvilosidades é maior.

A alcalinização do intestino médio é induzida por diferentes mecanismos, e dois deles foram previamente elucidados, os quais atuam em conjunto ao nível do intestino médio abdominal após o desligamento do mecanismo de manutenção do pH 6: a volatilização de CO₂ do sangue ingerido, semelhante ao processo de alcalose respiratória que experimentamos quando há hiperventilação pulmonar, e um outro mecanismo dependente do funcionamento das células intestinais (Santos et al. 2008; Santos et al. 2011). Provavelmente, esse segundo mecanismo envolve o transporte de diferentes íons pelos sistemas de transporte de membrana dos enterócitos incluindo provavelmente o transporte de íons bicarbonato (Santos et al. 2011). Juntos, esses dois mecanismos elevam o pH no intestino médio abdominal até pH 8,15 imediatamente após a ingestão de sangue; à medida que a digestão avança, o pH intestinal torna-

se progressivamente menos alcalino. Ao final do processo digestivo, que dura aproximadamente 72h, o intestino médio abdominal retorna ao pH 6.

O desligamento do mecanismo de manutenção do pH 6 e a ativação dos mecanismos de alcalinização no intestino médio abdominal é dependente de proteínas provenientes do repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas. Curiosamente, qualquer proteína ingerida parece ser capaz de provocar essa mudança fisiológica, mesmo proteínas inexistentes no sangue. Em experimentos realizados por Santos et al. (2011), o intestino de fêmeas de *L. longipalpis* sofreu alcalinização após a ingestão de soro, soro albumina, lisozima de ovo e até de caseína do leite. Tal evento mostrou-se regulado, pelo menos em parte, por moléculas que são lançadas na hemolinfa do inseto, os quais são produzidos por células endócrinas do intestino médio e possivelmente por outros centros endócrinos. A ingestão de aminoácidos, na concentração em que eles se encontram no sangue (5mM) não promoveu alterações de pH; apenas quando em alta concentração os aminoácidos estimularam a alcalinização.

1.2.SISTEMAS TRANSPORTADORES INTESTINAIS

1.2.1. Sistemas Transportadores de Aminoácidos

Em dípteros hematófagos, as proteínas presentes no sangue ingerido são processadas a partir da ação de proteases no intestino médio, o que resulta na elevada disponibilidade de aminoácidos e/ou pequenos peptídeos para transporte nas células intestinais (Clements, 1992).

Em fêmeas de *Culex pipiens pallens*, o aumento da concentração de aminoácidos na hemolinfa já é perceptível 4h após o repasto sanguíneo e atinge o máximo num intervalo de 12-24h, retornando aos níveis pré-alimentação em torno do quinto dia após o repasto (Uchida et al. 1990). Para *Aedes aegypti*, a máxima concentração de aminoácidos na hemolinfa ocorre no intervalo de 24-30h após o repasto sanguíneo (Boudko et al. 2015). A partir da ação de enzimas digestivas, os aminoácidos tornam-se disponíveis e são utilizados para a nutrição dos insetos e para o desenvolvimento dos ovários.

Transportadores de aminoácidos são proteínas transmembrana que promovem o movimento de aminoácidos em células ou organelas celulares. Suas funções são diversas e agem na regulação do equilíbrio ácido-básico, metabolismo energético intracelular, bem como em reações anabólicas e catabólicas (Kandasamy et al. 2018). Assim, a presença de transportadores eficientes nas células intestinais é essencial para a absorção e distribuição de aminoácidos entre os órgãos do inseto.

Não há registro de dados na literatura sobre mecanismos de transporte de aminoácidos em *Lutzomyia longipalpis*. Para outros dípteros hematófagos, principalmente mosquitos, apenas um número limitado de transportadores de aminoácidos já foi caracterizado, mas ainda existem lacunas quanto a seu papel na fisiologia do inseto. Alguns exemplos são os transportadores das famílias SLC7, SLC6 e SLC36.

Os membros da família SLC7 (*Solute Carrier Family*) são agrupados em duas subfamílias: HAT (*Heterodimeric Amino acid Transporter*), que representa parte do sistema de transporte de aminoácidos com cadeia ramificada e transporta a maioria dos aminoácidos essenciais; e CAT (*Cationic Amino acid Transporter*), os quais tem elevada especificidade por aminoácidos de carga positiva, como histidina, lisina e arginina (Boudko et al. 2012; Carpenter et al. 2012). *AaCAT1* é um transportador pH dependente expresso no corpo gorduroso de fêmeas de *Aedes aegypti* com elevada especificidade para L-histidina. *AaSlif* transporta aminoácidos neutros e catiônicos, com preferência para arginina, sendo expresso em vários tecidos de *A. aegypti*. Além destes, seis transportadores da subfamília HAT também foram caracterizados em *A. aegypti*. (Hansen et al. 2011; Carpenter et al. 2012; Boudko et al. 2015).

A família SLC6 inclui transportadores envolvidos na condução de aminoácidos essenciais e seus produtos metabólicos. *AaAAT1* foi identificado em intestinos de larvas de *A. aegypti*. Em *Anopheles gambiae*, foram identificados *AgNAT6* e *AgNAT8*, com expressiva afinidade para metionina e triptofano, respectivamente (Meleshkevitch et al. 2009; Boudko, 2012).

A família SLC36 é composta por transportadores pH dependentes que atuam no simporte de aminoácidos e prótons (PAT – *proton amino acid transporter*). No intestino de *A. aegypti* eles são apicais e, portanto, funcionam retirando aminoácidos e íons H⁺ do lúmen intestinal para o meio intracelular. *AaePAT1*, por exemplo, é um transportador cuja expressão é modulada pelo repasto sanguíneo, sendo encontrado na membrana apical do intestino médio de *A. aegypti*, e com baixa especificidade para seus substratos, atuando, portanto, no transporte de vários aminoácidos (Boll et al. 2004; Evans et al. 2009).

1.2.2. Sistemas Transportadores de Íons

Sistemas de transporte são, usualmente, classificados como ativos ou passivos. Sistemas de transporte ativos podem ser primários, quando o movimento de uma molécula contra seu gradiente eletroquímico é acoplado a um processo que fornece a energia necessária; ou secundários, quando o gradiente eletroquímico de um íon é utilizado para o transporte de uma

molécula diferente. Quanto ao transporte passivo, as classes mais comuns são: uniporte, relacionado ao transporte de uma única molécula através da membrana; simporte, relacionado ao transporte de duas moléculas diferentes, através de uma membrana, na mesma direção; e antiporte, quando há o transporte de duas moléculas diferentes, em sentidos opostos, através da membrana (Pradhan et al. 2013).

Na^+/K^+ -ATPases e V-ATPases são bombas iônicas eletrogênicas que utilizam ATP como fonte de energia e estão implicadas na geração e manutenção do potencial de membrana das células intestinais de insetos, de forma que sua atividade torna o interior das células mais negativo em relação ao meio externo (Wieczorek, et al. 2009; Harvey, 2009a). Além disso, o transporte diferencial de íons é um evento comum às células do tubo digestivo e normalmente está associado à polarização das membranas, com o transporte de nutrientes e com o controle do pH no meio (Wieczorek et al. 1991; Okech et al. 2008; Onken e Moffett, 2009).

Em larvas:

Em larvas de lepidópteros e de mosquitos, o pH da luz intestinal depende diretamente da movimentação diferencial de íons por meio de proteínas transportadoras através da membrana plasmática dos enterócitos. Por sua vez, a movimentação de íons através de qualquer proteína transportadora depende da diferença de potencial de membrana (diferença de potencial entre o lado interno e externo da membrana plasmática) e da diferença de concentração do íon a ser transportado, entre o meio exterior e o meio intracelular (Okech et al. 2008; Onken et al. 2009). De acordo com Harvey et al. (2009b), em intestinos de larvas de mosquitos as V-ATPases translocam H^+ para o lúmen (positivo) e geram uma diferença de potencial transmembrana, a qual é utilizada por transportadores de aminoácidos nutrientes (NAT – nutrient amino acid transporters) para levar aminoácidos acoplados a íons (Na^+ ou K^+) para o interior das células.

Assim, ao polarizarem membranas, esses sistemas fornecem a energia necessária para o funcionamento de outros sistemas de transporte, como por exemplo o sistema antiporte NHA, no qual para cada Na^+ transportado para o meio extracelular, 2H^+ são levados para o meio intracelular (Rheault et al. 2007). Essa diferença de potencial também pode energizar o transporte de aminoácidos pelo sistema PAT1 (simporte aminoácidos/ H^+) no qual os íons H^+ são atraídos para o interior dos enterócitos e, ao entrarem, levam obrigatoriamente consigo moléculas de aminoácidos.

Em adultos:

Em mosquitos adultos, e provavelmente nos outros insetos hematófagos adultos da subordem Nematocera, as Na^+/K^+ -ATPases é que seriam as principais responsáveis pela polarização de membranas, favorecendo o transporte iônico através delas (Patrick et al. 2006). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que da atividade total de ATPases em intestinos de fêmeas de *A. aegypti*, mais de 70% era devido à bomba Na^+/K^+ -ATPase (Nepomuceno et al. 2017), resultado similar ao previamente obtido por MacVicker et al. (1993), em intestinos de fêmeas de *Anopheles stephensi*. Acreditamos que, de modo similar, esses sistemas atuem ativamente no intestino de *L. longipalpis* e assim possam favorecer o funcionamento de alguns dos transportadores envolvidos no controle do pH da luz intestinal.

Além de sistemas de transporte de cátions, transportadores de ânions podem estar envolvidos nos mecanismos de controle do pH da luz intestinal, a exemplo do sistema $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (Boudko et al. 2001). Quando a acetazolamida, um inibidor da anidrase carbônica, foi testada em *L. longipalpis* o processo de alcalinização ficou prejudicado indicando que o transporte de íons bicarbonato deve participar desse mecanismo (Santos et al. 2011). Hirata et al. (2012) reportam a presença de transportadores de ânions da família SLC26 em *Drosophila melanogaster* e em *Anopheles gambiae*, os quais teriam papel central no metabolismo dos ânions HCO_3^- , SO_4^{3-} , e oxalato, bem como na geração e manutenção do pH intestinal adequado nesses insetos.

1.2.3. Sistema TOR

TOR (*Target of Rapamycin*), serina/treonina quinase pertencente à família de proteínas quinase denominada quinases relacionadas à fosfatidilinositol quinase (PIKK - *phosphatidylinositol kinase-related kinase*), responde por um complexo sistema de sinalização intracelular. Assim, abrange várias proteínas efetoras, sendo evolutivamente conservado em todos os organismos eucariotos, tanto em relação à sua estrutura quanto à sua função (Wullschleger et al. 2006). Atua na regulação do crescimento e da progressão do ciclo celular, com papel crucial no processo de autofagia, ao integrar sinais como presença de fatores de crescimento e disponibilidade de nutrientes (Loewith et al. 2002; Fingar e Blenis, 2004; De Virgilio e Loewith, 2006).

O sistema TOR ocorre em dois complexos. O complexo TORC1 responde à disponibilidade de nutrientes, especialmente aminoácidos, e controla processos como biogênese de ribossomos, tradução de proteínas e autofagia. O complexo TORC2 está envolvido na

remodelagem do citoesqueleto de actina durante as fases de crescimento celular (Loewith et al. 2002; Wullschleger et al. 2006; Duszenko et al. 2011).

Apenas TORC1 é sensível à rapamicina, uma lactona macrocíclica inicialmente isolada de extratos da bactéria *Streptomyces higroscopicus*. Na presença dessa droga é desencadeado um estímulo que mimetiza a privação de nutrientes, o que resulta em redução da taxa de crescimento e proliferação celular, impactando a progressão do ciclo celular (Abraham e Wiederrecht, 1996; Schmelzle e Hall, 2000; Li et al. 2014).

TOR responde a estímulos nutricionais e hormonais. Em vertebrados, foi mostrado que é ativado por hormônios através da via de sinalização da insulina e por proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Arsham e Neufeld, 2006); bem como pelo aumento da concentração de aminoácidos (Nobukuni et al. 2005; Backer, 2008). Em *Drosophila melanogaster* a via TOR é controlada por estímulos similares (Zhang et al. 2000; Miron et al. 2003).

Os principais alvos *downstream* de TOR são proteínas envolvidas nos eventos de tradução: proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (4E-BP), S6-kinase (S6K), e o fator de iniciação de tradução eucariótico 4E (eIF4E) (Hay e Sonenberg, 2004). 4E-BP e a quinase S6K são duas proteínas envolvidas no controle dos níveis de síntese proteica e ambas têm sua atividade regulada via fosforilação.

4E-BP funciona como repressor dos eventos traducionais e sua atividade é dependente das condições nutricionais, de estresse e ambientais (Roy e Raikhel, 2012). Sob um estado nutricional favorável a ativação de TORC1 leva à fosforilação e inativação de 4E-BP, provocando a sua dissociação do fator eIF4E e favorecendo a formação do complexo eucariótico de iniciação da tradução 4F (eIF4F), um complexo proteico necessário à iniciação da tradução proteica dependente de *cap* (Kim e Guan, 2011). Em relação às quinases S6K, a fosforilação dessas proteínas mediante a ativação de TORC1 as tornam aptas a interagir e fosforilar as proteínas ribossomais S6, elevando a taxa de síntese proteica celular (Taylor, 2014)

Em mamíferos, a subunidade mTORC1 de mTOR é rapidamente inibida quando o pH do meio extracelular se torna ácido, o que leva à restrição da sinalização por TOR (Balgı et al. 2011). Considerando que homólogos de TOR são altamente conservados e encontrados em todos os organismos eucarióticos, pode ser que tal susceptibilidade a variações de pH ocorra em outros organismos.

Em dípteros hematófagos, os aminoácidos provenientes de um repasto sanguíneo são cruciais para a vitelogênese. Em *A. aegypti*, alguns estudos mostram que o aumento da concentração de aminoácidos na hemolinfa após repasto sanguíneo ativa a cascata de

sinalização do sistema TOR no corpo gorduroso e ativa a expressão de genes envolvidos na vitelogenese. Além disso, quando TOR é inibido por rapamicina há o comprometimento da sinalização ao corpo gorduroso da presença de aminoácidos, interferindo na fertilidade de fêmeas de *A. aegypti*. (Hansen et al. 2004; Hansen et al. 2005; Carpenter et al. 2012).

O mecanismo pelo qual as células “identificam” o aumento da concentração de aminoácidos e respondem a esse estímulo não é plenamente conhecido. Foi demonstrado que a presença de aminoácidos induz o aumento da concentração de cálcio intracelular, o que funciona como gatilho para a sinalização mediada por mTORC1 (Gulati et al. 2008) e sabe-se que a atividade de transportadores de aminoácidos é ponto chave na regulação da via TOR, uma vez que podem afetar a concentração intracelular de aminoácidos ou atuar como receptores (nesse sentido, como transceptores) e iniciar vias de sinalização intracelular (Taylor, 2014).

Em *Drosophila*, o transportador PATH (família SLC36) interage com TOR para regulação de crescimento (Goberdhan et al. 2005), e os transportadores *slimfast* e *minidiscs*, atuantes no corpo gorduroso, funcionam como sensores da disponibilidade de nutrientes e também controlam o crescimento do inseto através da via TOR (Kim e Guan, 2011). Em *A. aegypti*, o *knockdown* de transportadores da família SLC7 levou ao comprometimento da sinalização por TOR, provocando redução de fertilidade nos mosquitos (Carpenter et al. 2012).

1.3.PARTICIPAÇÃO DE SEGUNDOS MENSAGEIROS NA REGULAÇÃO DO pH INTESTINAL

Segundos mensageiros são pequenas moléculas que fazem a sinalização inicial quando um receptor é ativado por seu ligante específico. Essa ligação altera a conformação do receptor e estimula a produção e a liberação de segundos mensageiros. Esses difundem-se rapidamente para alvos intracelulares, passando a atuar sob enzimas, transportadores e canais iônicos. Dentre os principais sistemas de segundos mensageiros está o dos nucleotídeos cíclicos, cujos principais representantes são monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (Newton et al. 2016; Waller e Sampson, 2018)

Na glândula salivar da mosca *Calliphora vicina* (Diptera), o estímulo para a produção e liberação de saliva depende de uma cascata que envolve o aumento do cAMP intracelular induzido pela presença do hormônio serotonina que é lançado na hemolinfa (Zimmermann et al. 2003; Dames et al. 2006). Este aumento de cAMP, por sua vez, culmina com a ativação de V-ATPases responsáveis pelo bombeamento de H⁺ para o lúmen da glândula, resultando na

produção de uma saliva ácida (Schewe et al. 2008). cGMP, por sua vez, já foi associado à regulação de vários processos fisiológicos em insetos, particularmente em *Drosophila*, sendo possível verificar sua participação nos eventos de ecdise, na modulação de mecanismos olfatórios e na regulação da secreção de fluidos pelos túbulo de de Malpighi (Morton e Hudson, 2002); entretanto, não há maiores informações sobre a participação de cGMP em processos de regulação de pH em dípteros.

Os processos intracelulares envolvidos na regulação do pH intestinal, seja durante a manutenção do pH 6 ou no processo de alcalinização após o repasto sanguíneo, são completamente desconhecidos em *L. longipalpis* ou em qualquer outro inseto hematófago adulto. Uma vez que a participação de hormônios intestinais está envolvida na regulação do processo, é de se esperar que eles ajam através de receptores localizados na superfície basolateral dos enterócitos envolvendo, a partir deste ponto, segundos mensageiros intracelulares. cAMP, cGMP, Ca^{2+} , inositol-fosfato, diacilglicerol são alguns dos potenciais segundos mensageiros que poderiam estar envolvidos no mecanismo de controle do pH em *L. longipalpis* a partir do estímulo de moléculas lançados na hemolinfa por ocasião do repasto sanguíneo.

2. JUSTIFICATIVA

De modo geral, a digestão é um processo essencialmente enzimático e muitas enzimas envolvidas atuam apenas em intervalo bem definido de pH. Em relação à fisiologia digestiva dos dípteros nematóceros hematófagos, as fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* são o modelo melhor estudado no que diz respeito às alterações de pH intestinal de acordo com o estado nutricional do inseto e quanto aos mecanismos que o regulam (Gontijo et al. 1998; Santos et al. 2008; Santos et al. 2011).

Além de necessário para aprofundar o conhecimento da biologia de *L. longipalpis*, a investigação de como o pH intestinal é regulado pode auxiliar no esclarecimento das condições que estimulam o processo de metaciclogênese de *Leishmania* no hospedeiro invertebrado. De fato, experimentos *in vitro* mostraram que o pH ácido do meio atuou como estímulo à metaciclogênese em culturas de *Leishmania*, e considerando que vários aspectos da relação parasito-hospedeiro permanecem inexplorados, é possível que algo similar ocorra *in vivo* (Bates e Tetley, 1993).

Apesar da importância da regulação do pH intestinal para a digestão dos insetos e de sua influência no desenvolvimento de patógenos nos insetos vetores, ainda não existe um modelo que mostre quais mecanismos coordenam diretamente as alterações de pH intestinal essenciais aos dípteros nematóceros hematófagos. Além disso, não há estudos que abordem os sistemas transportadores de aminoácidos e seus mecanismos de funcionamento, nem os efeitos da sinalização via TOR na regulação do pH do intestino médio, nem que reportem o papel da sinalização por segundo-mensageiros e transporte de íons, em *L. longipalpis*.

Deste modo, este trabalho mostra sua relevância ao iniciar a caracterização do papel de diferentes sistemas de transporte e vias de sinalização envolvidos no controle do pH intestinal em fêmeas de *L. longipalpis*, o que poderá possibilitar aprofundar os conhecimentos sobre fisiologia intestinal de flebotomíneos e de outros insetos, especialmente dípteros hematófagos da subordem Nematocera.

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

- Determinar os mecanismos que estimulam a alcalinização do pH do intestino médio em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em resposta a um repasto sanguíneo.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito de diferentes concentrações de aminoácidos no pH intestinal, em preparações *ex-vivo*;
- Padronizar o uso de fluoresceína na observação de alterações de pH intestinal em *L. longipalpis*;
- Identificar e caracterizar os genes que codificam os transportadores envolvidos no simporte de aminoácidos/H⁺ no intestino de *L. longipalpis*;
- Verificar a participação da Na⁺/K⁺-ATPase na manutenção do potencial de membrana no intestino de *L. longipalpis* com repasto sanguíneo;
- Investigar a ação alcalinizante de moléculas na hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* em diferentes momentos após repasto sanguíneo, em preparações *ex vivo*;
- Estudar a participação do sistema TOR no controle do pH intestinal em fêmeas de *L. longipalpis*;
- Verificar a participação dos segundos mensageiros cAMP e cGMP na regulação do pH intestinal, em preparações *ex-vivo*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COMITÊ DE ÉTICA

Os experimentos desenvolvidos neste estudo foram conduzidos de acordo com os manuais de experimentação animal e com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/ICB-UFG), número de protocolo 141/2018.

4.2. MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE *Lutzomyia longipalpis*

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se apenas fêmeas de *L. longipalpis*, mantidas no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFG), em condições controladas de temperatura de 25°C, umidade relativa de $\pm 70\%$ e foto período de 12h:12h.

Os flebotomíneos foram criados de acordo com a metodologia de Modi e Tesh (1983), com modificações. Os adultos, machos e fêmeas, foram mantidos em gaiolas de náilon, e alimentados com sacarose a 30%. Quando necessário, as fêmeas fizeram repasto sanguíneo em *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) anestesiados com Thiopental® (0,2ml/100g).

Em todos os protocolos desenvolvidos as fêmeas tinham entre 3 e 6 dias pós emergência, e foram alimentadas, ou permaneceram em jejum, de acordo com os requisitos de cada experimento.

4.3. VERIFICAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO pH INTESTINAL DE *Lutzomyia longipalpis* EM PREPARAÇÕES *ex-vivo*

Fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas com solução de sacarose 10% e corante indicador vital azul de bromotimol 0,1%, 24 horas antes do experimento. Apenas intestinos que apresentavam $\text{pH} \leq 6$ foram utilizados nos ensaios (Figura 4). Após dissecação das fêmeas, os intestinos removidos foram transferidos para pequenos blocos de gel de agarose embebidos com SFI, a fim de evitar ressecamento. O tratamento consistiu em aplicar diretamente sobre o intestino 1,5 μL de solução MEM de aminoácidos em diferentes concentrações, preparadas a partir da diluição da solução estoque em SFI: 172mM, 86mM, 43mM, 21,5mM ou 10,25mM

(concentração final no experimento). Para cada concentração testada, foi utilizado $n = 20$ intestinos.



Figura 3 - Intestino de fêmea de *Lutzomyia longipalpis* alimentada com solução de sacarose 10% contendo azul de bromotimol 0,1% em pH 6.

Após o tratamento, os intestinos foram observados por 1 minuto, e ao final a cor observada no intestino médio foi comparada com uma tabela de padrão de cores de azul de bromotimol em diferentes pHs (Figura 5). Todo o procedimento foi realizado com auxílio de lupa estereoscópica (Olympus SZ61).

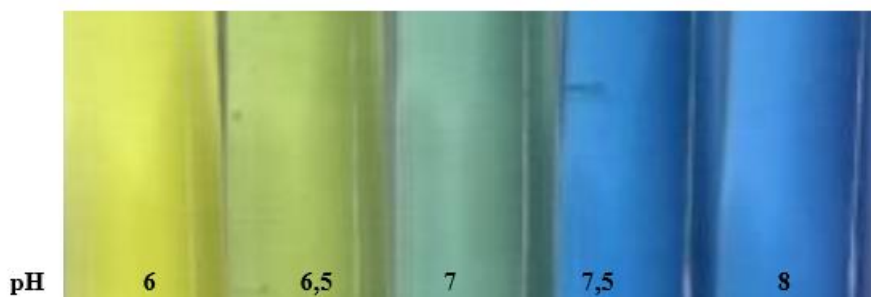


Figura 4 - Padrão de cores do corante azul de bromotimol em soluções tamponadas em diferentes pH.

4.4. CURVA pH X EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA POR FLUORESCÉINA

A fluoresceína é um corante cuja emissão de fluorescência varia de acordo com o pH do meio, e que conta com a vantagem de não ser fotossensível (Martin e Lindqvist, 1975). Antes de introduzir a fluoresceína nos testes para avaliação de alterações no pH intestinal, nós verificamos se, de fato, as diferenças de emissão de fluorescência em função do pH seriam significativas.

Inicialmente, foram preparadas soluções tamponadas em diferentes pH: para os pH 5, 5,5, 6 e 6,5 foi utilizado tampão MES 10mM ($pK_a = 6,1$) e para os pH 7, 7,5 e 8 foi utilizado

tampão HEPES 10mM (pKa=7,48); para cada uma dessas soluções tampão foram então preparadas soluções de fluoresceína (Sigma-F3677) 200µM. De cada solução de fluoresceína tamponada, foram retirados 200µL e transferidos para uma placa de ELISA, que foi então levada para microscópio de epifluorescência Leica DM500, acoplado a uma câmera Cannon® EOS 600D. Utilizando filtro de luz verde [excitação: 450-480nm; emissão (verde): 520nm], foi feita a captura de imagens, de forma que este procedimento foi realizado em triplicata para cada uma das soluções tamponadas utilizadas.

As imagens foram analisadas através do software Image J (rsb.info.nih.gov/ij/), para o cálculo da fluorescência relativa em cada pH. Os valores obtidos foram plotados no Microsoft Excel, e os valores correspondentes às médias das triplicatas foram utilizados para gerar um gráfico relacionando emissão média de fluorescência em cada pH.

4.5. VERIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO pH INTESTINAL A PARTIR DO USO DE FLUORESCÉINA

Fêmeas de *Aedes aegypti* tem um transportador responsável pelo simporte de aminoácidos (AA)/H⁺ (AaePAT1) que é expresso na membrana apical do intestino médio e cuja atividade é modulada pelo repasto sanguíneo (Evans et al. 2009). Considerando a grande similaridade entre os mecanismos de regulação de pH intestinal entre fêmeas de *L. longipalpis* e *A. aegypti* (Gontijo et al. 1998, Santos et al. 2008, Santos et al. 2011, Nepomuceno et al. 2017) nós hipotetizamos que a captação de aminoácidos, por meio deste transportador, levaria à acidificação do citoplasma dos enterócitos.

Assim, delineamos um experimento onde intestinos dissecados de fêmeas de *L. longipalpis* foram abertos com um estilete e corados com fluoresceína. Após serem lavados, para retirar toda fluoresceína que não havia sido absorvida pelos enterócitos, os intestinos foram então observados em microscópio de epifluorescência para avaliação da fluorescência inicial da fluoresceína na presença e ausência de aminoácidos. Na medida em que o transporte de aminoácidos e íons H⁺ ocorresse, esperava-se que houvesse a acidificação do citoplasma dos enterócitos, resultando em alterações no nível de fluorescência emitida.

Os testes foram realizados sempre com intestinos aos pares, para observação e registro simultâneo das variações de emissão de fluorescência entre o grupo tratado apenas com solução fisiológica de insetos (SFI; grupo controle), e o grupo tratado com solução de aminoácidos.

A concentração média de aminoácidos no sangue é aproximadamente 5mM (Adibi e Mercer, 1973; Baertl et al. 1974; Delaporte et al. 1978; Maclean et al. 1983). Para cada uma das condições avaliadas foi testado o efeito no pH intracelular de três concentrações (5mM, 7,5mM e 10mM) de uma solução de aminoácidos. Essas soluções foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque contendo 12 diferentes aminoácidos (Solução de aminoácidos MEM; Sigma-M5550: Arginina 29,928 mM, Cisteína 5,16 mM, Histidina 9,632 mM, Isoleucina 19,952 mM, Leucina 19,952 mM, Lisina 19,952 mM, Metionina 5,16 mM, Fenilalanina 9,976 mM, Treonina 19,952 mM, Triptofano 2,408 mM, Tirosina 9,976 mM, Valina 19,952 mM). A concentração total de aminoácidos na mistura da Sigma é de 172 mM.

As fêmeas foram dissecadas em SFI (NaCl 119,7mM, KCl 2,68mM, CaCl₂ 1,36mM, glicose 0,56mM, HEPES 10mM, pH 7,0), com auxílio de lupa estereoscópica (Olympus SZ61) e estiletos entomológicos. Após remoção, os intestinos foram abertos, mediante um pequeno corte longitudinal, e imersos em solução de fluoresceína 200µM (tamponada com HEPES 10mM, pH 7,0) por 10 minutos, e em seguida foram lavados em SFI para remoção do excesso de corante, sendo então transferidos para diferentes poços, previamente preenchidos com 15 µL de gel de agarose 2%, de uma lâmina escavada modificada (Figura 3). Para cada situação avaliada utilizou-se n = 10.



Figura 5 – Lâmina utilizada para captura simultânea de imagens de intestinos tratados com SFI ou com solução de aminoácidos MEM.

Após posicionar a lâmina adequadamente no microscópio de epifluorescência [sob filtro de luz verde [excitação: 450-480nm; emissão (verde): 520nm] acoplado a uma câmera Cannon[®] EOS 600D, a filmagem foi iniciada. Então, foi aplicado 1,5µL de SFI diretamente sobre um intestino e 1,5µL de solução de aminoácidos no outro. O tempo total para as filmagens foi padronizado em 2 minutos.

Para análise, as imagens dos vídeos foram desfragmentadas em quadros/segundo, e convertidas para 8 bits. A área de cada intestino foi selecionada e pelo programa Image J

(rsb.info.nih.gov/ij/), as variações de fluorescência no decorrer do tempo foram calculadas e os valores plotados no Microsoft Excel. Os valores resultantes da diferença entre a emissão de fluorescência antes (início da filmagem) e 2 minutos após o tratamento foram calculados e submetidos à análise estatística (item 4.12).

Aplicando-se o mesmo procedimento foram também avaliados intestinos fechados, nos quais o corante estava presente tanto no citoplasma dos enterócitos quanto na luz intestinal. Essa abordagem permitiria observar, quando presente, a alcalinização do lúmen intestinal.

Investigou-se também os efeitos da aplicação individual de aminoácidos, tanto em intestinos abertos quanto em intestinos fechados. Para tal, foram preparadas, em SFI tamponada em pH 7,0, soluções a 10mM dos aminoácidos arginina (Sigma-A5006), lisina (Sigma-L5501), leucina (Sigma-L8000) e serina (Sigma-S4311). Além disso, em vista a avaliar a possível existência de lesões nos intestinos fechados – a presença de danos nos intestinos permitiria que uma solução ácida penetrasse e acidificasse o lúmen intestinal - o experimento foi repetido utilizando solução de arginina 10mM preparada em SFI, pH 6,0 (tamponada com MES 10mM). Os testes foram conduzidos em acordo com a metodologia previamente descrita.

4.6. ESTUDO DA EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR QUE FAZ SIMPORTE AMINOÁCIDOS/H⁺ EM INTESTINOS DE FÊMEAS DE *Lutzomyia longipalpis*

4.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA de intestinos

Foram utilizados 3 pools (20 intestinos/pool) de intestinos de fêmeas em diferentes estados nutricionais: jejum, 0-3h após repasto sanguíneo, e 20-24h após repasto sanguíneo. Os intestinos foram dissecados com auxílio de microscópio estereoscópico (OLYMPUS SZ61) e estiletes, e as extrações de RNA foram feitas com o kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel[®]), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 20 µL de água Milli-Q livre de nucleases e quantificado a 260nm no Nanodrop Lite[®] (Thermo Scientific); 0,5 µg do RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando 0,5 µL de hexâmeros randômicos (Promega[®]) e o sistema da transcriptase reversa M-MLV (Promega[®]) em volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Veriti[®] (Thermo Fisher), a 25°C por 10 min, 37°C por 60 min e 70°C por 15 min e armazenada a - 20°C. O cDNA sintetizado foi utilizado como molde para as reações de PCR convencional e qPCR.

4.6.2. Identificação do gene LLOJ004373 (PAT1) e seus ortólogos

Com base na sequência do transportador *AaePAT1* de *Aedes aegypti* (Evans et al. 2009; GenBank nº de acesso: ACS96436.1), foi utilizada a ferramenta *Blast* do programa *Vector Base* (<https://www.vectorbase.org/blast>) para buscar uma sequência em *L. longipalpis* que codificasse para um transportador de aminoácidos semelhante.

As sequências obtidas foram analisadas utilizando as ferramentas Clustal Omega (Expasy Bioinformatics Resource; www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), Translate (Expasy Bioinformatics Resource Portal; <https://web.expasy.org/translate/>), Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), e Transporter Classification Database (TCDB; www.tcdb.org) a partir do que desenhamos os iniciadores utilizados nesse trabalho, através do programa Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>).

Através do método Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), realizou-se uma análise evolutiva entre a sequência de *AaePAT1* e as sequências codificantes para transportadores de aminoácidos pertencentes à família SLC36 em *L. longipalpis*. O método de Zuckerkandl e Pauling (Zuckerkandl e Pauling, 1965) foi utilizado para avaliar as distâncias evolucionárias entre as sequências. Todas as análises foram conduzidas com o *software* MEGA X (Kumar et al. 2018).

4.6.3. PCR

As reações de PCR convencional foram feitas no termociclador Veriti® (ThermoFisher), sendo realizadas em 35 ciclos (94°C por 45 seg, 60°C por 45 seg, 72°C por 1 min com 1 µL de cDNA, 200 nM de cada iniciador, 200 µM de dNTPs e 1 U de Taq DNA polimerase em volume final de 20 µL). Para cada par de iniciadores utilizados, foi feito controle negativo (branco), onde o cDNA foi substituído por água Milli-Q, a fim de descartar a presença de contaminação por DNA nos iniciadores ou em qualquer outro reagente da PCR. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 2%, corados com GelRed™ (Biotium), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado. Nos géis, foram aplicados, além do padrão de peso molecular de 100 pb, mix contendo 4 µL o produto da PCR, 0,8 µL tampão de amostra 6x e 1 µL de GelRed™ diluído 1:400 em água. Os iniciadores utilizados nas reações de PCR foram desenhados com o *software* Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>), e suas sequências constam no Quadro 1.

4.6.4. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Nos ensaios de qPCR, foi utilizado o Power SYBR Green PCR Master Mix 2X Kit (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante e os resultados foram obtidos a partir do StepOne Plus (Applied Biosystems®).

As reações foram feitas em triplicata, contendo 1 µL de cDNA e 300 nM de cada iniciador (Quadro 1), em volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Um controle negativo da transcrição reversa (sem a enzima transcriptase reversa) e um controle negativo sem cDNA (substituído por água Milli-Q) foram incluídos em cada poço para cada conjunto de iniciadores com a finalidade de confirmar a ausência de amplificação de DNA genômico e avaliar a presença de dímeros de primers ou contaminação dos reagentes, respectivamente. A quantidade relativa de transcritos alvo em cada amostra foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001) utilizando GAPDH como gene de referência para controle interno das reações (GenBank, nº de acesso: ABV60323.1) (Quadro 1). A eficiência das reações de qPCR foi determinada utilizando o valor da inclinação da curva obtida pela diluição seriada do cDNA (100, 10, 1, 0,1 e 0,01 ng de cDNA) em um modelo de regressão linear, de acordo com Radonic et al. (2004). Foram consideradas aceitáveis as eficiências entre 90% e 110%.

Quadro 1 - Sequências de iniciadores utilizados nos experimentos de PCR e qPCR para avaliação do gene LLOJ004373

Gene Alvo	Iniciador F: 5' → 3'	Iniciador R: 5' → 3'	Amplicon (Pares de base – bp)
GAPDH	TTCGCAGAAGACAGTGATGG	CCCTTCATCGGTCTGGACTA	150 bp
LLOJ004373	CGGCATTTGTGATTGAATTG	TTTCATTTGTTCGTGGTTGGA	120 bp

4.7.EFEITO DA HEMOLINFA DE FÊMEAS EM DIFERENTES INTERVALOS APÓS REPASTO SANGUÍNEO NO pH INTESTINAL EM PREPARAÇÕES *ex-vivo*

Tendo como base a metodologia previamente descrita por Santos et al. (2011), foi utilizada hemolinfa coletada em diferentes momentos após repasto sanguíneo: 0-3h e 30-33h

após repasto. As fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas em *hamsters* anestesiados, por 30 minutos. Após o tempo adequado para o experimento, o tegumento de três fêmeas foi rompido (evitando o rompimento do intestino) em 1µL de SFI contendo EDTA 2 mM para possibilitar o extravasamento da hemolinfa e sua mistura com essa solução. Imediatamente, a solução contendo hemolinfa foi coletada e aplicada em intestino dissecado proveniente de fêmea previamente alimentada com solução de sacarose 10% contendo corante azul de bromotimol 0,1%. Apenas intestinos que apresentavam $\text{pH} \leq 6$ foram utilizados. Para evitar o ressecamento dos intestinos, estes foram colocados em blocos de gel de agarose preparados com SFI.

Após o tratamento com hemolinfa, os intestinos foram observados por 1 minuto, e ao final a cor observada no intestino foi comparada com soluções-padrão de azul de bromotimol tamponadas em diferentes pH (Figura 4). Todo o procedimento foi realizado com auxílio de lupa estereoscópica (Olympus SZ61). Como controle, foi utilizada hemolinfa de fêmeas mantidas só com sacarose. Para cada tratamento foram realizadas 20 observações.

4.8. ESTUDO DO SISTEMA TOR NO INTESTINO MÉDIO DE *L. longipalpis*

A avaliação da sinalização por TOR no intestino médio de *L. longipalpis* foi realizada mediante o estudo da regulação da proteína 4E-BP, um dos principais alvos *downstream* da via TOR.

4.8.1. Identificação do gene codificante para 4E-BP em *L. longipalpis*

Com base na sequência de *Aa4E-BP* (Roy e Raikhel, 2012; GenBank: ACJ15315.1), utilizou-se a ferramenta *Blast* do programa *Vector Base*, para buscar em *L. longipalpis* uma sequência referente à proteína 4E-BP. As sequências obtidas foram avaliadas de modo similar ao previamente descrito no subitem 4.6.2.

4.8.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os experimentos de qPCR, para avaliação da expressão da proteína 4EBP no intestino de *L. longipalpis* foram realizados como previamente descrito no subitem 4.6.4 Os níveis de expressão proteica foram avaliados no intestino de fêmeas em jejum, fêmeas alimentadas apenas com açúcar, e fêmeas com repasto sanguíneo, sendo que os insetos utilizados nesse experimento tinham a mesma idade. Foram utilizadas as sequências de iniciadores apresentadas no Quadro 2; GAPDH foi utilizado como gene de referência para controle interno das reações.

Quadro 2 – Sequências de iniciadores utilizadas na avaliação da expressão de 4EBP no intestino de *Lutzomyia longipalpis* por qPCR

Gene Alvo	Iniciador F: 5' → 3'	Iniciador R: 5' → 3'	Amplicon (Pares de base – bp)
GAPDH	TTCGCAGAAGACAGTGATGG	CCCTTCATCGGTCTGGACTA	150 bp
LL4EBP	GTGTCCTCGTTACGGATGCT	ATTTTTCGGTGGGGTACGAC	121 bp

4.8.3. Análise da fosforilação de 4E-BP por *Western Blotting*

A avaliação da fosforilação de 4E-BP foi realizada em intestinos de *L. longipalpis* em três diferentes condições: jejum, alimentadas com açúcar, e 0-3h após repasto sanguíneo. Para cada 4100*um dos grupos, 10 fêmeas com idade entre 3 e 4 dias tiveram os intestinos dissecados em salina 0,9%, os quais foram transferidos para microtubos contendo 15µL de coquetel de inibidores de fosfatases (imidazol 200mM –Sigma I2389; fluoreto de sódio 100mM, molibdato de sódio 115mM, tartarato de sódio 400mM – Sigma S4797; e ortovanadato de sódio 100mM - 450243), 1µL de ácido okadaico (1µg/µL; Sigma-O4511) e 8µL de tampão da amostra redutor contendo β-mercaptoetanol.

As amostras foram fervidas durante 5 minutos, submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5% e transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi posteriormente incubada, sob agitação, com solução bloqueadora (tampão TBS 1x, Tween-20 0,1%, BSA 10%), durante 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes, durante 5 minutos, com TBS 1x e Tween-20 0,1%, e, então incubada com o anticorpo Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (Cell Signaling Technology #2855, Danvers, MA) na diluição 1:1000 – o anticorpo foi diluído em solução de TBS 1x, Tween-20 0,1% e BSA 5%. A incubação foi realizada *overnight*, a 4°C e sob agitação constante. Ao fim, a membrana foi lavada três vezes, durante 5 minutos, com TBS 1x e Tween-20 0,1%, e posteriormente incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-IgG de cabra produzido em coelho, diluído a 1:1000 em TBS 1x e Tween-20 0,1%, durante duas horas e sob agitação constante em temperatura ambiente. A revelação das bandas foi realizada utilizando o kit de substrato DAB peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, USA), e as imagens foram obtidas através do programa Alpha DigiDoc™ (Alpha Innotech).

Além disso, as bandas obtidas por *Western blotting* foram digitalizadas e avaliadas semi-quantitativamente através da medição do número de pixels por área, utilizando o *software* Alpha DigiDoc™.

4.9. INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA TOR NO CONTROLE DO pH INTESTINAL

Fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas com solução de sacarose 10% e corante azul de bromotimol 0,1%, 24 h antes dos experimentos. Apenas intestinos com $\text{pH} \leq 6$ foram utilizados nos testes. Após dissecação para retirada dos intestinos, estes foram colocados em pequenos blocos de gel de agarose preparados com SFI. O tratamento inicial consistiu em aplicar diretamente sobre o intestino 1,5 μL de rapamicina 20 μM (Sigma-R8781) diluída em SFI, uma droga específica para inibição do sistema TOR. Após aguardar por 1 minuto, foram iniciados diferentes tratamentos a fim de verificar se a inibição do sistema TOR pelo uso de rapamicina interferiria na alcalinização do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*.

4.9.1. Investigação do sistema TOR na alcalinização intestinal estimulada por aminoácidos

Para avaliar o efeito da inibição do sistema TOR a partir do uso de rapamicina na alcalinização estimulada por aminoácidos, foram aplicados 1,5 μl de solução de aminoácidos MEM 43mM (diluída em SFI e água deionizada) diretamente sobre intestinos previamente tratados com rapamicina. Durante 1 minuto, eventuais alterações no pH intestinal foram observadas, e ao final desse intervalo a cor do intestino foi comparada às cores padrão do corante apresentadas na figura 4. Para o grupo controle foi realizado um procedimento similar, apenas substituindo a rapamicina por SFI. Nesse experimento, foi utilizado $n = 20$ intestinos por tratamento avaliado.

4.9.2. Investigação do sistema TOR na alcalinização intestinal estimulada por hemolinfa de fêmeas alimentadas com sangue

Para avaliar o efeito da inibição do sistema TOR a partir do uso de rapamicina na alcalinização estimulada pela hemolinfa de fêmeas com repasto, intestinos previamente tratados com rapamicina foram tratados com hemolinfa de fêmeas que haviam realizado repasto sanguíneo, seguindo procedimento já descrito no item 4.7. Ao final do experimento, a cor do

intestino foi comparada às cores padrão do corante apresentadas na figura 4. Para o grupo controle o procedimento foi similar, apenas substituindo a rapamicina por SFI. Nesse experimento, foram realizadas 20 observações em cada grupo avaliado.

4.10. MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DE Na^+/K^+ -ATPase NO INTESTINO MÉDIO DE *L. longipalpis* APÓS REPASTO SANGUÍNEO

As medições da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase foram realizadas em acordo com o previamente descrito por Macvicker et al. (1993). Após repasto sanguíneo, os intestinos de 26 fêmeas de *L. longipalpis* foram dissecados em Tris 50mM (pH 7,8), de forma a lavar seu interior e retirar o sangue ingerido. Em seguida, os intestinos foram transferidos para um micro tubo contendo 260 μ L de Tris 50mM (pH 7,8), imerso em gelo, e, então, centrifugados a 3000g, por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e o intestinos foram ressuspensos em 260 μ L de solução contendo Tris 50mM e 0,1% de Tween 20. A amostra foi sonicada por 20 segundos e mantida em gelo enquanto necessário.

No ensaio foram avaliados seis grupos: Mg^{2+} , $\text{Mg}^{2+}+\text{Na}^+$, $\text{Mg}^{2+}+\text{K}^+$, $\text{Mg}^{2+}+\text{Na}^++\text{K}^+$, $(\text{Mg}^{2+}+\text{Na}^++\text{K}^+) + \text{ouabaína}$, e $(\text{Mg}^{2+}+\text{Na}^++\text{K}^+) + \text{ebulição}$. A cada tubo foram adicionados 20 μ L de amostra, o equivalente a dois intestinos. As soluções estoque foram adicionadas aos tubos de modo a se alcançar as seguintes concentrações finais: solução base – Tris 50mM (pH 7,3) e MgCl_2 3mM; NaCl 100mM; KCl 15mM; EGTA 2mM; ATP 3mM (Sigma-A2383), pH ajustado para 6,5 com Tris-base, e água destilada, obtendo-se volume final de 100 μ L. Quando presente, ouabaína (Fluka-75640), inibidor específico da bomba Na^+/K^+ -ATPase, foi utilizada na concentração final de 1mM. As preparações foram incubadas a 30°C, durante 1 hora e, após esse intervalo, adicionou-se 70 μ L de água destilada a cada tudo, e a liberação de fosfato inorgânico pelas ATPases foi avaliado mediante uso do kit comercial Fósforo (Labtest® Diagnóstica, Vista Alegre, Brasil). De acordo com as instruções do fabricante, inicialmente foram adicionados a cada tudo 20 μ L do reagente nº1 e 20 μ L do reagente nº2, deixando as preparações em repouso durante três minutos, à temperatura ambiente; e, em seguida, 40 μ L do reagente nº3, aguardando-se mais cinco minutos, obtendo-se volume final de reação de 250 μ L. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vórtex, e uma alíquota de 200 μ L de cada tubo foi retirada e

transferida para uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC, a 650nm.

Os grupos foram avaliados em duplicatas, e os dados foram plotados como a média das absorbâncias obtidas em cada grupo. O ensaio global foi executado, independentemente, seis vezes.

4.11. INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE SEGUNDOS MENSAGEIROS NA REGULAÇÃO DO pH INTESTINAL

Para avaliar a participação de segundos mensageiros nas mudanças de pH intestinal foram utilizados N⁶,2'-O-dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt 2,8mM (ou dibutyryl-cAMP, análogo permeável de cAMP; Sigma-D0627) e 8-(-4-chlorophenylthio) - guanosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt 2mM (análogo permeável de cGMP, Sigma-C5438). Fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas, 24 horas antes dos experimentos, com solução de sacarose contendo corante azul de bromotimol 0,1%; sendo utilizados apenas intestinos com pH ≤ 6. Inicialmente, para avaliar um possível papel na alcalinização intestinal, após dissecação das fêmeas, os intestinos removidos foram transferidos para pequenos blocos de gel de agarose embebidos com SFI, a fim de evitar ressecamento. O tratamento consistiu em aplicar diretamente sobre o intestino 1,5μL de solução de dibutyryl-cAMP (d-cAMP), ou de solução de cGMP, preparada em SFI. Durante dois minutos eventuais alterações no pH intestinal foram observadas e, ao final desse intervalo, a cor do intestino foi comparada às cores padrão do corante apresentadas na figura 4; o grupo controle foi tratado com SFI. Foram utilizados 20 intestinos para cada análise realizada.

Para avaliar se tais substâncias participariam da acidificação intestinal, utilizou-se intestinos alcalinos, mediante tratamento prévio com soro inativado, e os experimentos foram conduzidos apenas com intestinos em pH ≥ 7. Em seguida, os intestinos foram tratados com 1,5μL de d-cAMP, ou 1,5μL de cGMP. Durante dois minutos eventuais alterações no pH intestinal foram observadas e, ao final desse intervalo, a cor do intestino foi comparada às cores padrão do corante apresentadas na figura 4; o grupo controle foi tratado com SFI. Foram utilizados 30 intestinos para cada análise realizada.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados com o *software* GraphPad Prism 7.0. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram analisadas pelo teste t de Student (para amostras pareadas ou não pareadas, a depender do experimento) ou teste de Fisher. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

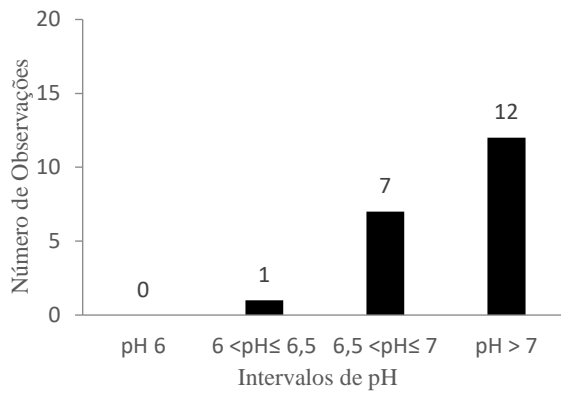
Em 2008, Santos et al. mostraram que quando fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* realizam repasto sanguíneo o intestino médio abdominal passa de um meio ácido a um meio alcalino, adequado à digestão do sangue. Além disso, verificou-se que o pH é estritamente regulado: à medida que a digestão prossegue o intestino médio é aos poucos re-acidificado, e, quando o processo é finalizado, retorna ao estado anterior ao repasto sanguíneo. Em estudos posteriores foi investigado se a presença, e conseqüente absorção, de aminoácidos livres pelos enterócitos seria o estímulo primário à essa alteração no pH intestinal (Santos et al. 2011). Através da técnica de alimentação forçada, os autores verificaram, *in vivo*, que os aminoácidos em concentração de 5mM, similar à encontrada no plasma, não estimularam a alcalinização do pH intestinal, fato observado apenas quando os autores utilizaram uma concentração bem maior de 172mM.

Com base nos dados previamente publicados, retomamos a investigação do possível papel de aminoácidos na alcalinização do intestino médio abdominal. Inicialmente, adaptamos a metodologia anteriormente utilizada por Santos et al. (2011) e avaliamos em preparações *ex-vivo*, o efeito de diferentes concentrações de uma solução de aminoácidos no pH intestinal de *L. longipalpis* (item 4.6).

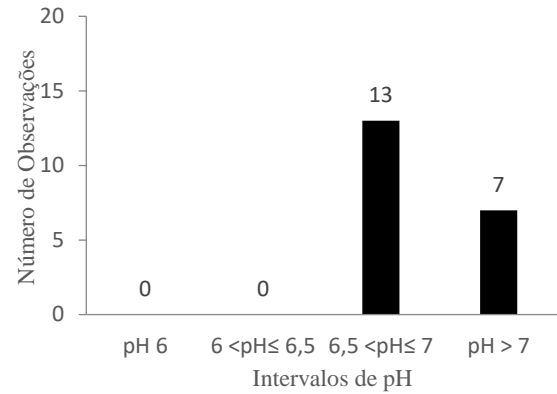
5.1.EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO pH INTESTINAL DE *Lutzomyia longipalpis* EM PREPARAÇÕES *ex-vivo*

Ao testarmos a solução MEM de aminoácidos em diferentes concentrações, observamos que ocorre alcalinização do pH do intestino médio abdominal e que a intensidade e velocidade desse evento se relaciona com a concentração da solução de aminoácidos (Figura 6 A, B, C, D, E).

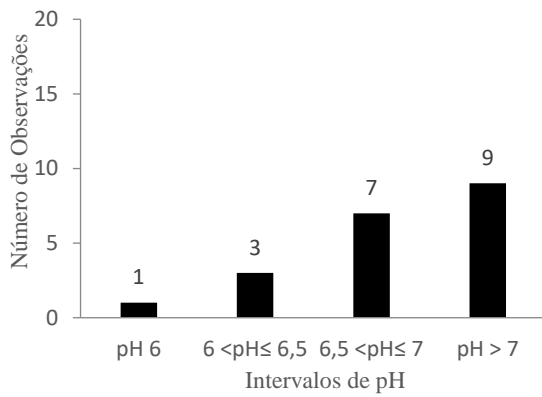
A) Solução MEM 72mM



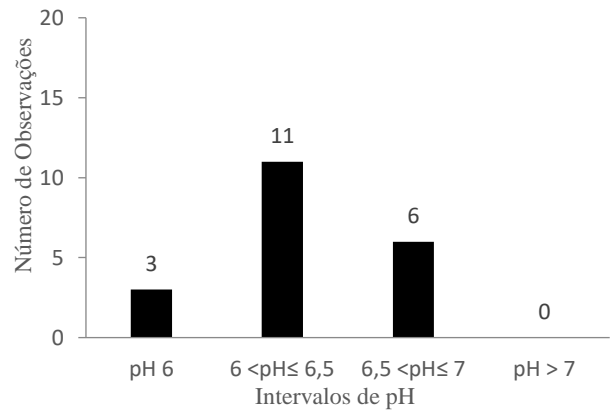
B) Solução MEM 86mM



C) Solução MEM 43mM



D) Solução MEM 21,5mM



A) Solução MEM 10,25mM

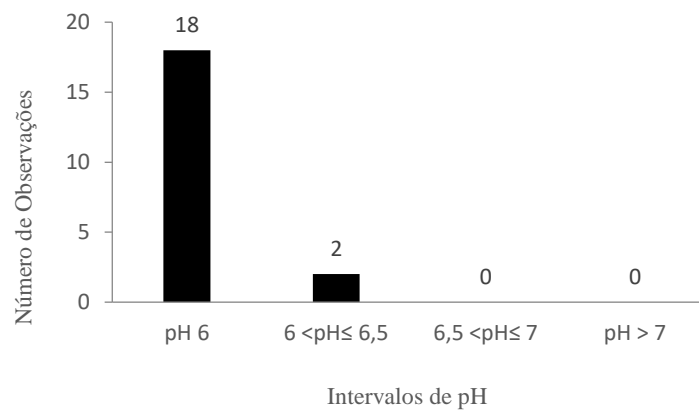


Figura 6 - Efeito da aplicação da solução MEM de aminoácidos, em diferentes concentrações, no pH do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em preparações *ex vivo* (n=20 intestinos/concentração testada). A)172mM; B) 86mM; C) 43mM; D) 21,5mM; E)10,25mM.

Quando testamos a solução de aminoácidos na concentração máxima de 172mM, observamos alcalinização intensa e imediata dos intestinos tratados (Figura 6A), com 60% deles atingindo $\text{pH} > 7$. À medida que reduzimos a concentração da solução de aminoácidos, a intensidade do processo diminuía, até que, ao testarmos a concentração de 10,25mM observamos que 90% dos intestinos tratados ainda permaneceram ácidos (Figura 6E).

A análise mais criteriosa dos dados nos levou a considerar que alterações mais sutis de pH poderiam não ser evidenciadas pelo corante azul de bromotimol. Isso poderia, em parte, justificar a menor proporção de intestinos alcalinizados quando testamos os aminoácidos na concentração de 10,25mM, e quando Santos et al. (2011) os avaliou na concentração de 5mM. Assim, buscando aumentar a sensibilidade da técnica para o estudo em preparações *ex-vivo* das alterações de pH frente ao tratamento dos intestinos com aminoácidos, iniciamos a padronização do uso do corante fluoresceína. Além disso, com essa técnica esperávamos poder observar mudanças no pH citoplasmático dos enterócitos na medida em que os intestinos eram submetidos a diferentes tratamentos.

5.2.USO DE FLUORESCÉINA NA AVALIAÇÃO DO CONTROLE DO pH INTESTINAL EM *Lutzomyia longipalpis*

5.2.1. Emissão de fluorescência por fluoresceína *versus* pH

Para nos certificarmos de que a fluoresceína seria um corante adequado para distinguir variações de pH nos intestinos, quantificamos a fluorescência emitida por fluoresceína em soluções tamponadas em diferentes pH.

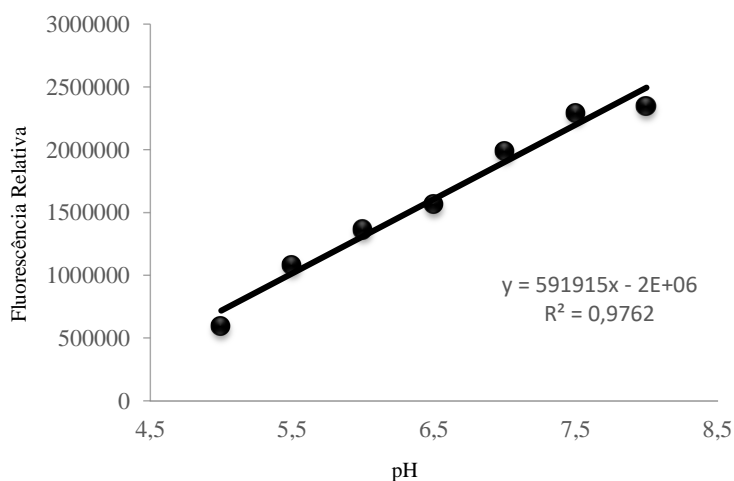


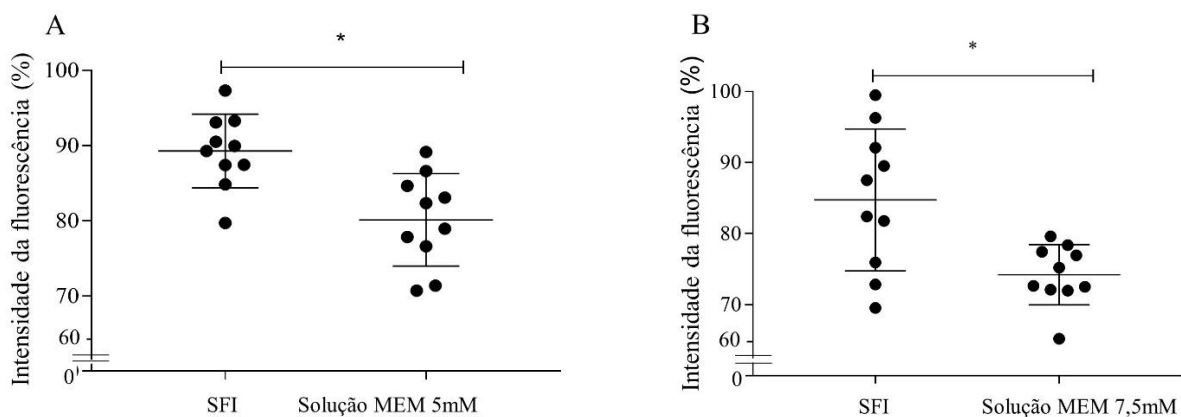
Figura 7 - Variação da fluorescência emitida por fluoresceína de acordo com o pH.

A Figura 7 mostra como a fluorescência emitida pelo corante varia linearmente de acordo com o pH do meio: quanto mais ácido, menor é a emissão de fluorescência; e, quanto mais alcalino maior a luminosidade emitida. Uma vez constatado que seria possível perceber com maior sensibilidade as alterações de pH a partir de variações na fluorescência, demos continuidade ao uso de fluoresceína.

5.2.2. Alterações no pH de intestinos corados com fluoresceína a partir da adição de solução MEM de aminoácidos, em preparações *ex-vivo*

5.2.2.1. Intestinos Abertos

Ao trabalharmos com intestinos abertos, as moléculas de fluoresceína eram lavadas e removidas do lúmen, mas permaneciam no citoplasma dos enterócitos. Ao compararmos os valores de emissão de fluorescência antes do tratamento e 2 minutos após o tratamento constatamos que a adição da solução MEM estimulou um fluxo de H^+ para os enterócitos juntamente com os aminoácidos, induzindo a acidificação do citoplasma e resultando em proeminente redução da fluorescência emitida, em relação aos intestinos tratados apenas com SFI.



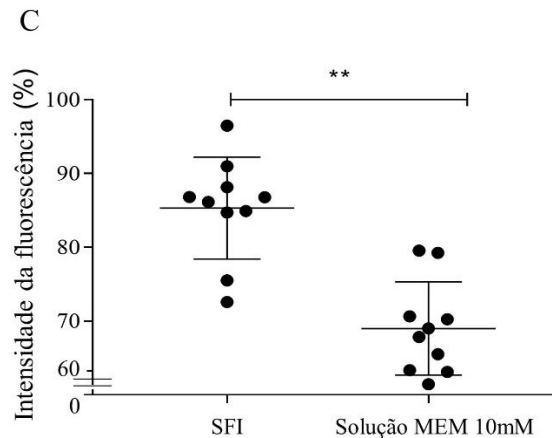


Figura 8 - Percentual da intensidade da fluorescência emitida em intestinos abertos de *Lutzomyia longipalpis* em resposta ao tratamento com SFI ou solução de aminoácidos MEM. Os dados foram obtidos comparando-se os valores de emissão de fluorescência antes do tratamento e 2 minutos após o tratamento (n = 10 para cada grupo). A) SFI/Solução MEM 5mM; B) SFI/Solução MEM 7,5mM; C) SFI/Solução MEM 10mM. Representação da média \pm desvio padrão. Teste t de Student para amostras não pareadas, $p < 0,05$.

Como mostrado na figura 8, a redução mais expressiva na emissão de fluorescência foi observada ao utilizarmos a solução MEM a 10mM (figura 8A), sendo aproximadamente 2,4 vezes maior que no grupo controle (teste t de Student, $p < 0,05$ **).

5.2.2.2. Intestinos Fechados

Nos testes conduzidos com intestinos fechados, o corante estava presente nos enterócitos e no interior do lúmen. Nos intestinos tratados com SFI verificamos o decréscimo da intensidade da emissão de fluorescência ao longo dos dois minutos de observação dos intestinos, após o tratamento.

Ao testarmos a solução de aminoácidos MEM em concentração 10mM verificamos expressivo aumento de fluorescência, o que interpretamos como a alcalinização do lúmen intestinal, uma vez que o citoplasma deve ter sofrido acidificação como no resultado anteriormente descrito. Ao final dos experimentos, o grupo tratado com solução MEM apresentou aumento médio de 1,4 vezes na emissão de fluorescência em comparação à emissão antes do tratamento. Contudo, o tratamento com solução MEM nas concentrações 7,5mM e 5mM não provocou diferenças significativas em relação aos respectivos grupos controle (Figura 9).

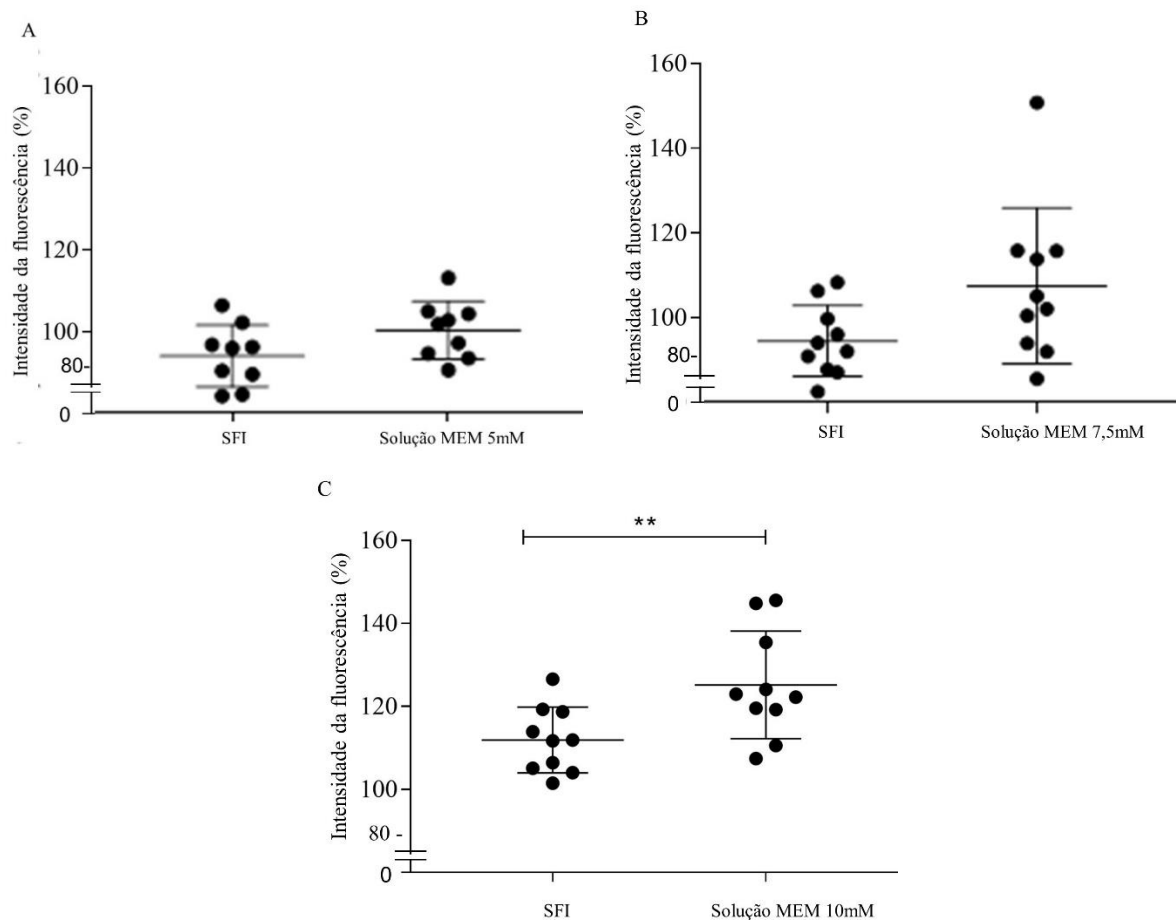


Figura 9 – Percentual da intensidade da fluorescência emitida em intestinos fechados de *Lutzomyia longipalpis* em resposta ao tratamento com SFI ou solução de aminoácidos MEM. Os dados foram obtidos comparando-se os valores de emissão de fluorescência antes do tratamento e 2 minutos após o tratamento (n=10 para cada grupo). A) SFI/Solução MEM 5mM; B) SFI/Solução MEM 7,5mM; C) SFI/Solução MEM 10mM. Representação da média \pm desvio padrão. Teste t de Student para amostras não pareadas, **p < 0,01.

A figura 10 resume como a emissão de fluorescência variou em resposta aos diferentes tratamentos realizados nos intestinos dos flebotomíneos. As imagens identificadas como A1, B1 e C1 mostram diferentes intestinos antes de serem submetidos a tratamentos distintos, e as imagens identificadas como A2, B2 e C2 mostram como ficaram os mesmos intestinos ao final de cada experimento.

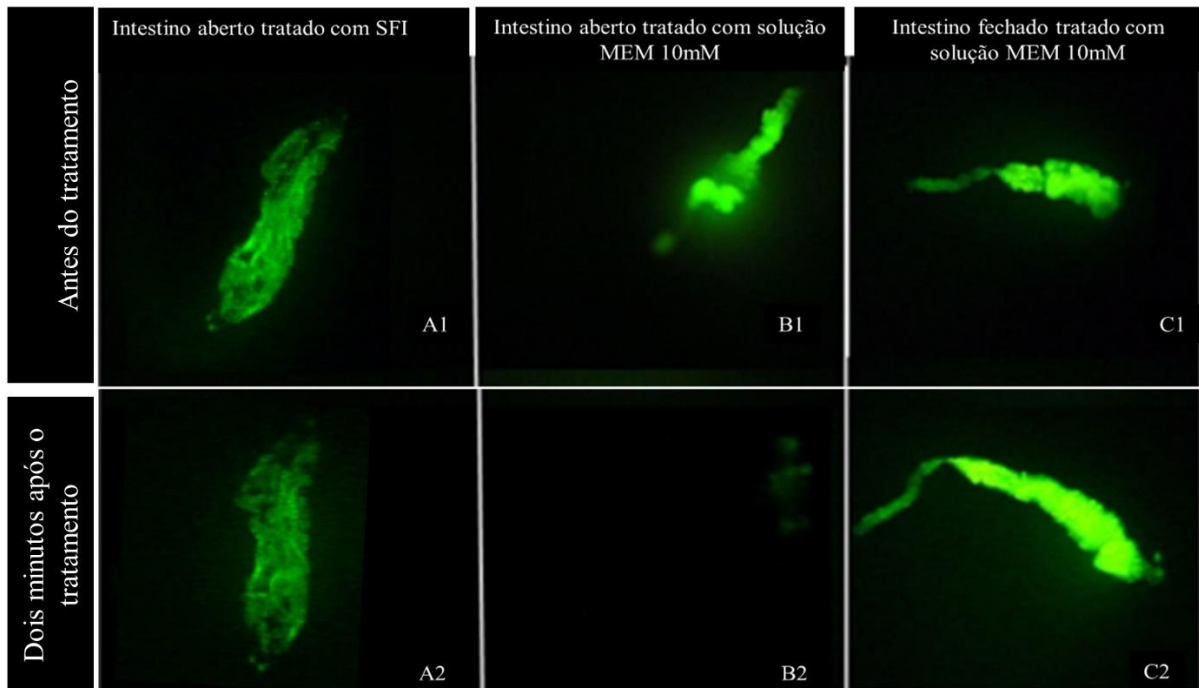


Figura 10 - Variação na emissão de fluorescência em resposta a diferentes tratamentos. A1, A2) Intestino aberto tratado com SFI; B1, B2) Intestino aberto tratado com Solução MEM 10mM; C1, C2) Intestino fechado tratado com Solução MEM 10mM.

O uso de fluoresceína permitiu evidenciar que, mesmo na concentração de 5mM, os aminoácidos desencadeavam alterações no pH intestinal, ainda que algumas delas não tenham sido significativas em relação aos respectivos grupos controle. Em intestinos abertos deveria haver algum sistema transportador que promovesse a entrada de aminoácidos e íons H^+ nos enterócitos, acidificando o citoplasma das células; assim como seria capaz de promover a alcalinização do lúmen intestinal em intestinos fechados. Concomitante aos experimentos com fluoresceína, passamos a investigar a atividade de sistemas de transporte de aminoácidos.

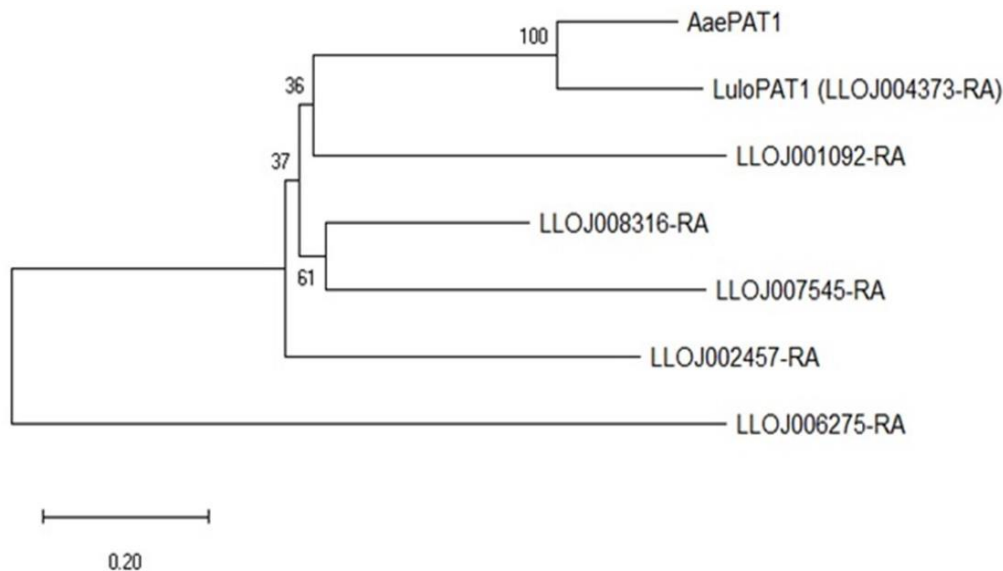
5.3. ESTUDO DA EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS LULOPAT1 EM INTESTINOS DE FÊMEAS DE *Lutzomyia longipalpis*

5.3.1. Identificação do transportador de aminoácidos em intestino de *L. longipalpis*

A partir da sequência de AaePAT1 de *Aedes aegypti* foram identificadas seis sequências relacionadas em *L. longipalpis*. As comparações entre as proteínas de *L. longipalpis* e de *A. aegypti* mostraram que em *L. longipalpis* a sequência ortóloga era codificada pelo gene LULOJ004373-RA, o qual foi nomeado LULOPAT1. O transportador LULOPAT1 mostrou 70,4% de identidade ao seu ortólogo de *A. aegypti*, representando um transportador de

aminoácidos pertencente à família SLC36 (Figura 11). É nessa família que estão os transportadores que fazem simporte de aminoácidos com o íon H⁺.

A)



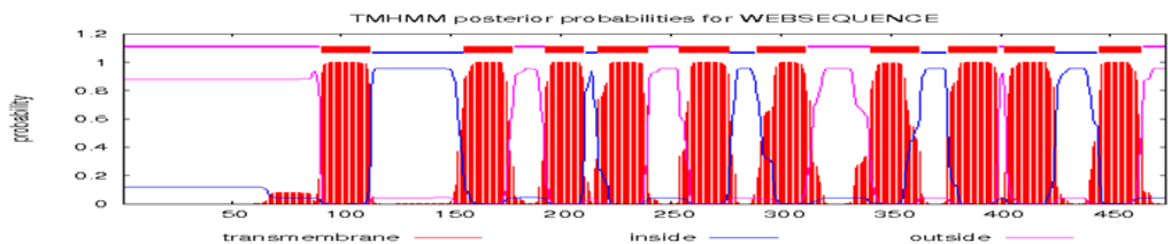
B)

AaePAT1	-----HTVDKGSNTAFVGDQVTSKKSAPVKTISANNVLEIQDKKPG-----LET	47
LuloPAT1	MSSKTRNSANHGHSNSGFVPDDGSGREKSA-----FVIELVEKRPPANTGEKDLQ	51
	:.:****:.* * : :*** :*:* :*:*	
AaePAT1	DYNPYEHRHVEHPTTSNETLIHLLKGLTGLAMPNAFHAGWLVGAVGTLIGILCTY	107
LuloPAT1	DYDPYQHRQVTHPTTNNETLIHLLKGLTGLAMPMAFYHAGYVVGSIPTAIGLLCTY	111
	:*:*:* * *.***** **:*:*:*:*:* **:*:*:*:*:* **:*:*:*	
AaePAT1	CIHLLIKAIEYELCRKRVPVSLNYPVAVTQTALLEGPDALKPLSNVHIIINVFLVYQLGT	167
LuloPAT1	CIHMLIKVEYEMCKRKKVPSLSYPVAVGAAALSDGPGWCRAIAPHIVHVINTFLLIYQLGT	171
	***:*	
AaePAT1	CCVYVVFVASHIKAIADYYTETPTDVRFLMLIILLPLILINWVRNLKFLAPFSTLANFIT	227
LuloPAT1	CCVYVVFVSSNIKSIVDYYTEEKTDVRLYMLIILLPLILINWVRNLKFLAPFSTIANFIT	231
	*****:*:*:*:*:* * ***.***** **:*:*:*:*:* **:*:*:*:*	
AaePAT1	LVSFGIILYYIFREPVTFFEGKEAFGKISEFPLFFGTVLFALAEIGVILPLENEMKPKQF	287
LuloPAT1	LISFGIILYYIFREPISFDGLIAVGKLRDFPLFFGTVLFALAEIGVILPLENEMKTPRFH	291
	*:*****:*:*:* * ***. :***** **:*:*	
AaePAT1	GGNFGVLNKAIVLIVTLVIGMGFFGYLNYGADSKGSITLNLPEQELAQCCKVGMFAFIY	347
LuloPAT1	GGPFGVLNKAIVLIVTLVYGMGLFGYINYGSDVLSITLNLPPSEILAQCCKVGMFAFIY	351
	** *****:*:*:*:*:*:*:*:*:* * ***** *	
AaePAT1	ITHGLACYVAIDITWNDYAKKRFQSDSPRSVFYEVIVRTVLVITFLLAVAIPNLELFISL	407
LuloPAT1	ITHGIACYVAIDITWNEYLFKRFQSSTRKVFWEYVTRITLVITFLLAVAIPNLELFISL	411
	:**:* * ***. * **:*:*:*:*:*:*****	
AaePAT1	FGALCLSALGIAPPALIQCTYWHQRHGWDKTMIVKNVIGVIAIVGLVVGTTTSLKEI	467
LuloPAT1	FGALCLSALGLAFPALMQTACYWHVRKKGAKVLMVKNVIAIIGVVGLVVGTYTSSIDI	471
	*****:*:*:*:*:* * ** * * * * :*****:*:*:***** **:*:	
AaePAT1	VHTFEEEE-----	475
LuloPAT1	IATFFEDGGESGHH	485
	: ****:	

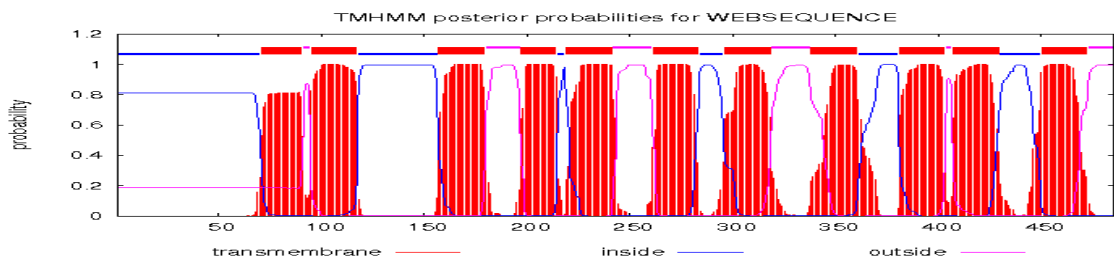
Figura 11 - Análise do gene LULOPAT1 (LLOJ004373). A) A análise filogenética das proteínas relacionadas a transportadores de aminoácidos da família SLC36 permitiu identificar, com base em AaePAT1, seis sequências relacionadas em *Lutzomyia longipalpis*. B) O alinhamento entre LULOPAT1 e AaePAT1 mostrou identidade de 70,4% entre as sequências.

Verificou-se que AaePAT1, LULOPAT1 (LLJ004373), LLJ008316 e LLJ001092 têm assinaturas muito similares. Por análise realizada a partir do *software* TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), os domínios transmembrana, citoplasmático e extracelular de AaePAT1 concordam com aqueles preditos para os três genes de *L. longipalpis* mencionados anteriormente (Figura 12). Os outros três possuem assinaturas diferentes. Tais seqüências compreendem 447 a 485 aminoácidos todos com potenciais sítios de glicosilação em região próxima à seqüência amino-terminal, predita pelo *software* NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).

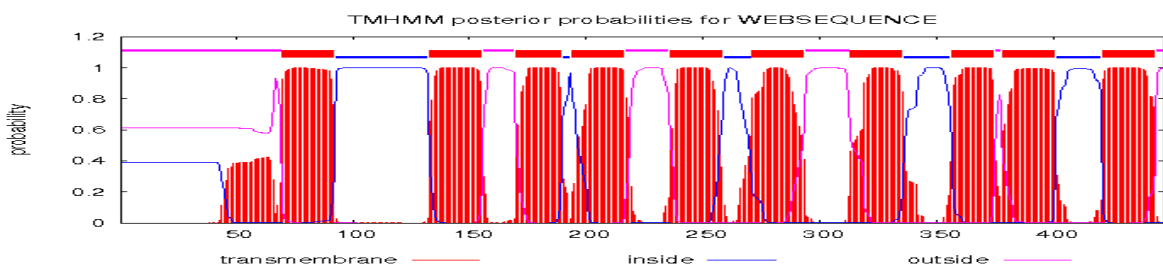
AaePAT1



LULOPAT1



LLOJ008316



LLOJ001092

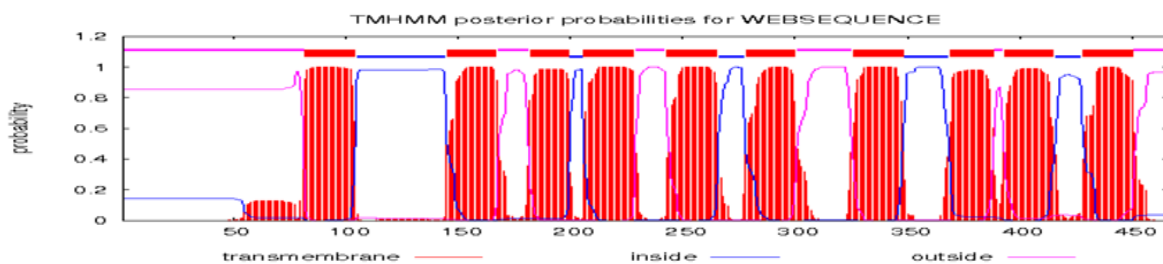


Figura 12 - Predição das assinaturas de AaePAT1, LULOPAT1 e alguns outros possíveis transportadores de aminoácidos em *Lutzomyia longipalpis*.

A análise do gene por PCR convencional (detectado pela amplificação de uma banda de 120bp) mostrou que LULOPAT1 é expresso apenas no intestino de *L. longipalpis* (Figura 13).

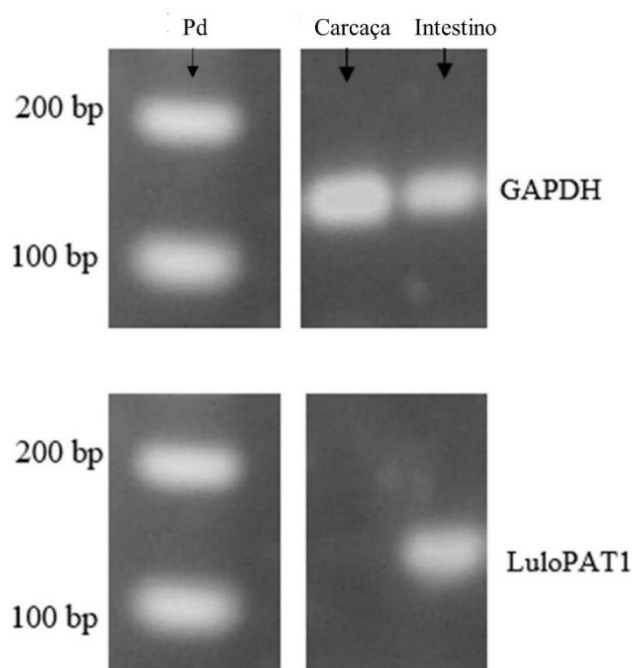


Figura 13 - Análise do produto de PCR referente ao gene LULOPAT1 (LLOJ004373) em gel de agarose 2% em relação ao gene de referência GAPDH, usando cDNA de carcaça ou de intestinos de *Lutzomyia longipalpis*. Pd: padrão de peso molecular (em pares de base).

5.3.2. Análise quantitativa da expressão gênica de LULOPAT1 em intestinos de *Lutzomyia longipalpis*

A análise de LULOPAT1 por qPCR mostrou que sua expressão varia de acordo com a condição nutricional de *L. longipalpis*. Nas primeiras 3 horas após repasto sanguíneo a expressão de LULOPAT1 foi ao menos 10 vezes maior em comparação com sua expressão em fêmeas sem repasto (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0,05$). No intervalo de 20-24 horas após o repasto sanguíneo, verificou-se redução de 50% na expressão do gene em relação à expressão observada no intervalo de 0-3 horas (Figura 14).

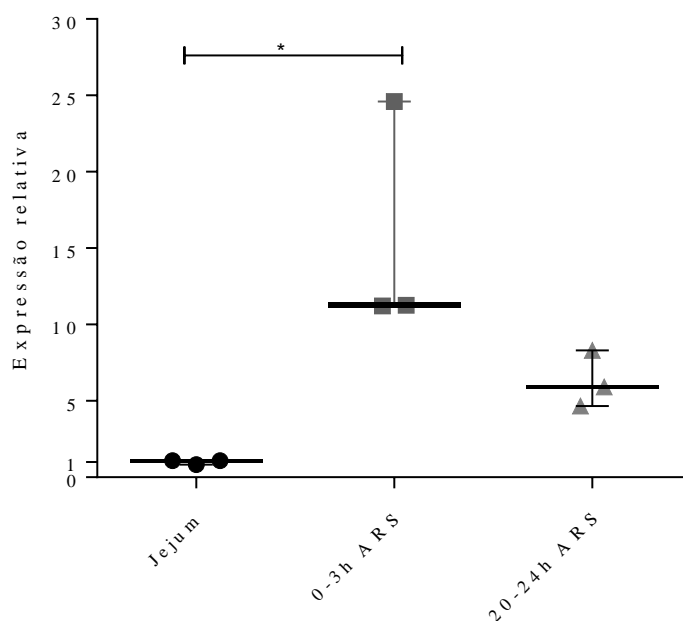


Figura 14 - Expressão (qPCR) de LULOPAT1 (LLOJ004373) no intestino de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em diferentes condições nutricionais: jejum; 0-3h após repasto sanguíneo; 20-24h após repasto sanguíneo. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão de 3 pools de 20 intestinos em cada grupo. Kruskal-Wallis, Dunn, * $p < 0,05$. (ARS – Após Repasto Sanguíneo).

Em conjunto, esses resultados e aqueles reportados nos itens 5.1 e 5.2 permitem afirmar que aminoácidos e seus transportadores têm papel marcante na alcalinização do pH intestinal. Contudo, diferentes transportadores devem ter seu funcionamento direcionado a determinados aminoácidos. Com base nisso, decidiu-se por avaliar o efeito, individual, de diferentes aminoácidos, no pH intestinal de intestinos abertos e fechados, o que permitiria verificar se outros sistemas de transporte além de PAT estariam participando da alcalinização intestinal.

5.4.ALTERAÇÕES NO pH DE INTESTINOS CORADOS COM FLUORESCÊNCIA A PARTIR DA ADIÇÃO INDIVIDUAL DOS AMINOÁCIDOS ARGININA, LISINA, LEUCINA OU SERINA

5.4.1. Intestinos Abertos

O tratamento de intestinos fechados de *L. longipalpis* com os aminoácidos serina ou leucina estimulou a acidificação do citoplasma dos enterócitos, o que promoveu significativa redução da fluorescência emitida (Figura 15 A e B), indicando, portanto, que esses aminoácidos são transportados pelos transportadores da classe PAT. Por outro lado, a emissão de fluorescência nos intestinos tratados com arginina ou lisina não diferiu significativamente do grupo controle, indicando que eles não são transportados pelos transportadores PAT e que o

provável transporte desses aminoácidos deve ser efetuado por outros sistemas de transporte (Figura 15 C e D).

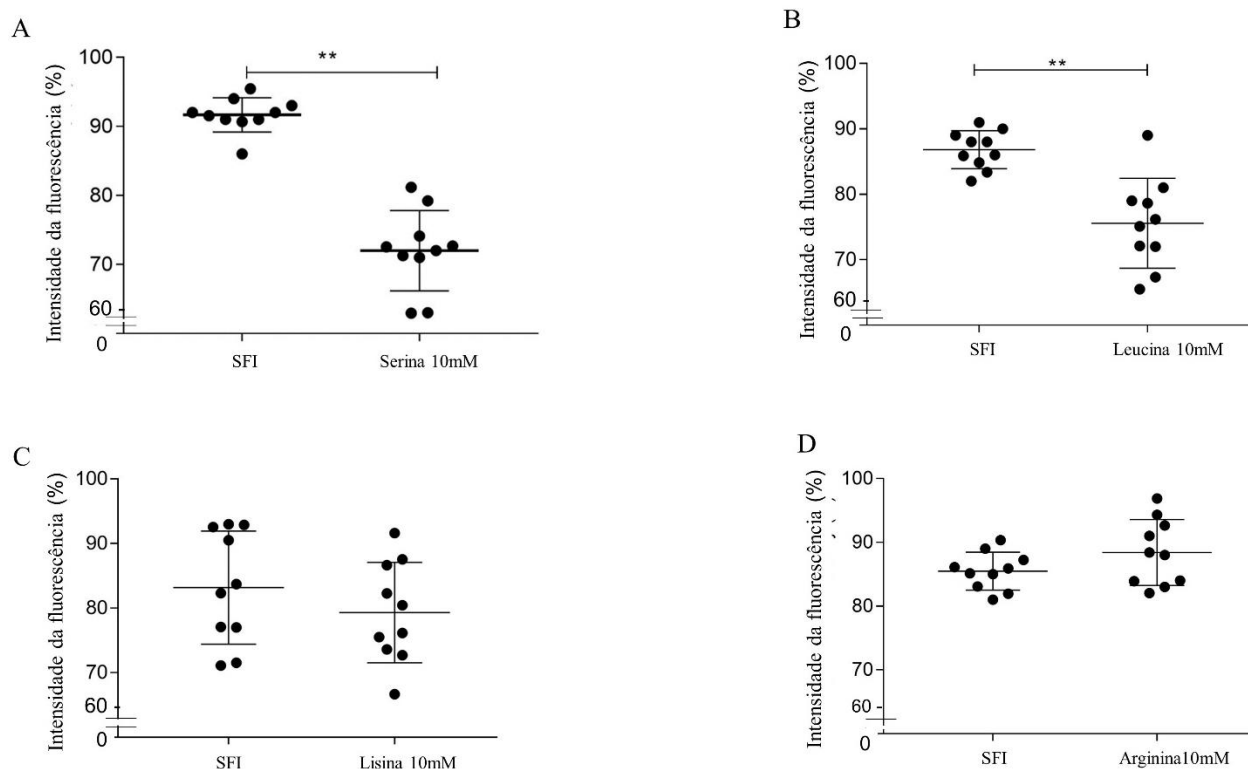


Figura 15 – Percentual da intensidade da emissão de fluorescência em intestinos abertos de *Lutzomyia longipalpis* após o tratamento com serina, leucina, arginina ou lisina. Os aminoácidos foram preparados em SFI pH 7,0 (tamponada com HEPES 10mM), à concentração final de 10mM. Os grupos controle foram tratados com SFI, apenas. Os dados foram obtidos comparando-se os valores de emissão de fluorescência antes do tratamento e 2 minutos após o tratamento (n=10 para cada grupo). A) Serina; B) Leucina; C) Lisina; D) Arginina. Representação da média \pm desvio padrão. Teste t de Student para amostras não pareadas, **, $p < 0,01$.

5.4.2. Intestinos Fechados

Nesta situação, os aminoácidos testados poderiam entrar nos enterócitos apenas através de transportadores presentes na membrana basolateral dos enterócitos, e tal transporte não poderia ser realizado por PATs uma vez que esses são tipicamente transportadores de membrana apical. Como pode ser observado na Figura 16A e B, os aminoácidos lisina e arginina estimularam a alcalinização do pH intestinal. No entanto, o tratamento com serina ou leucina não provocou diferenças significativas na emissão de fluorescência em relação ao grupo controle (Figura 16C e D, respectivamente).

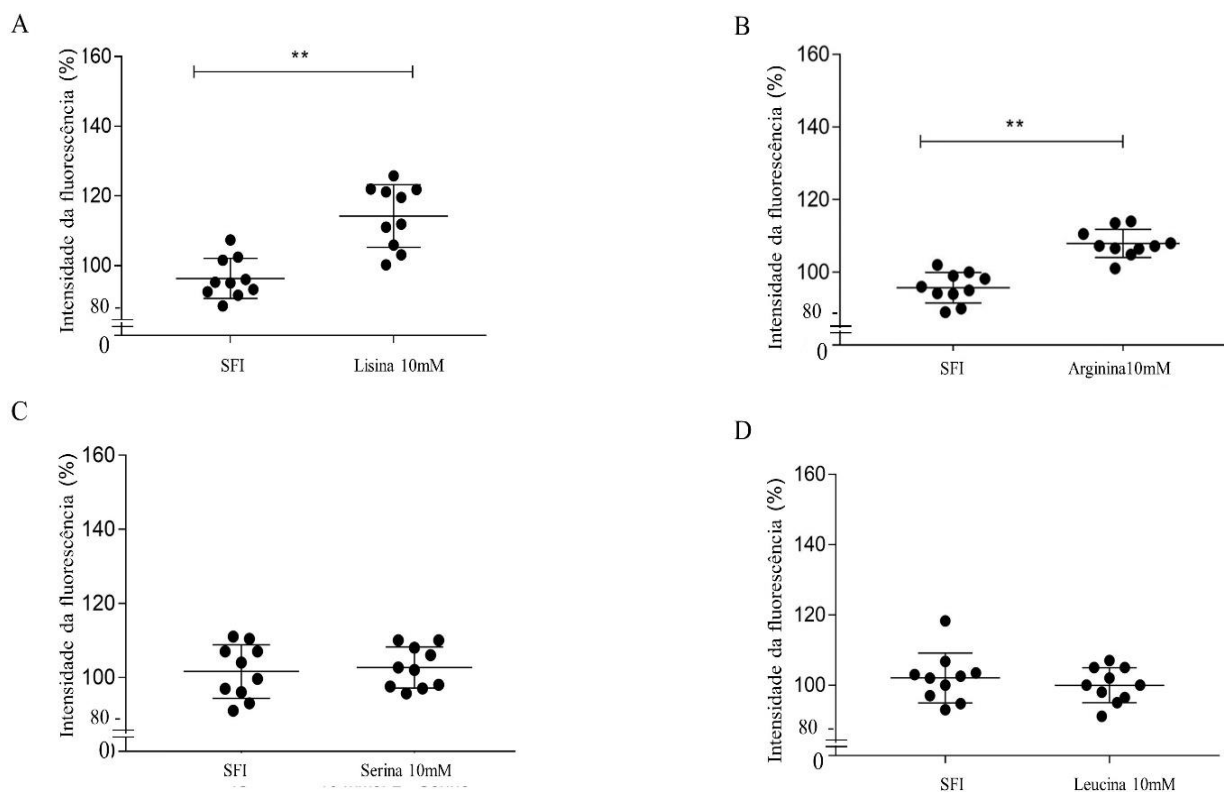


Figura 16 – Percentual da intensidade da emissão de fluorescência em intestinos fechados de *Lutzomyia longipalpis* após o tratamento com serina, leucina, arginina ou lisina. Os aminoácidos foram preparados em SFI pH 7,0 (tamponada com HEPES 10mM), à concentração final de 10mM. Os grupos controle foram tratados com SFI, apenas. Os dados foram obtidos comparando-se os valores de emissão de fluorescência antes do tratamento e 2 minutos após o tratamento (n=10 para cada grupo). A) Lisina; B) Arginina; C) Serina; D) Leucina. Representação da média \pm desvio padrão. Teste t de Student para amostras não pareadas, **, $p < 0,01$.

Quando o mesmo experimento foi realizado com solução de arginina em pH 6,0 (preparada em SFI tamponada com MES 10mM), verificou-se a alcalinização do lúmen intestinal mesmo na presença de um meio externo ácido (Figura 17). Por esse resultado, foram obtidos indícios que os intestinos fechados utilizados ao longo deste trabalho não estavam danificados, uma vez que a presença de lesões permitiria a entrada da solução ácida e consequentemente a acidificação do lúmen intestinal.

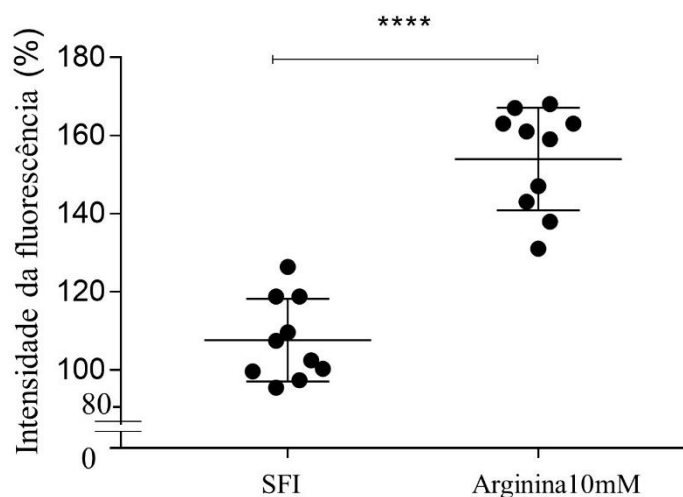


Figura 17 – Percentual da intensidade da emissão de fluorescência em intestinos fechados de *Lutzomyia longipalpis* tratados com SFI ou arginina 10mM, tamponadas em pH 6 com MES 10mM. Os dados foram obtidos comparando-se os valores de emissão de fluorescência antes do tratamento e 2 minutos após o tratamento (n=10 para cada grupo). Representação da média \pm desvio padrão. Teste t de Student para amostras não pareadas, ****, $p < 0,0001$

Esses experimentos nos levaram a concluir que alguns aminoácidos como a serina e a leucina, quando disponíveis no lúmen intestinal através da digestão, podem penetrar pelo (s) transportador(es) PAT levando consigo íons H^+ . Essa retirada de íons H^+ do lúmen auxiliaria na manutenção de um pH alcalino necessário para a atividade das proteases responsáveis pela digestão do sangue. Outros aminoácidos, como a arginina e a lisina, não entram pelos transportadores PAT e, portanto, não contribuem para esse mecanismo PAT-dependente. Contudo, eles penetram nos enterócitos por meio de outros transportadores que podem se localizar tanto na região basolateral quanto na região apical e ativam a alcalinização luminal do intestino por outro mecanismo PAT-independente.

5.5. EFEITO DA HEMOLINFA DE FÊMEAS, COLETADA EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS, NO pH INTESTINAL EM PREPARAÇÕES *ex-vivo*

Apesar da relevância dos aminoácidos, e seus sistemas transportadores na alcalinização intestinal após repasto sanguíneo, este não seria o estímulo primário a esse processo. Santos et al. (2011) verificaram, *in vivo*, que nas primeiras horas após um repasto sanguíneo a hemolinfa das fêmeas contaria com moléculas que promoveriam a alcalinização do pH intestinal. Entretanto, apesar do intestino permanecer alcalino ao longo da digestão, o pH reduz progressivamente à medida que esse processo avança (Santos et al. 2008). Assim, os estímulos que desencadeiam o aumento de pH não necessariamente seriam os mesmo que o manteriam

alcalino até a completa digestão do sangue. Dessa forma, buscamos avaliar se a hemolinfa de fêmeas com repasto manteria o efeito alcalinizante em estágios mais avançados da digestão do sangue. Diferentemente dos experimentos de Santos e colaboradores em 2011, desenvolvemos uma metodologia *ex vivo*, de execução mais simples, para fazer este estudo.

Inicialmente, ao avaliarmos o pH de intestinos tratados com hemolinfa coletada de fêmeas 0-3h ou 30-33h após repasto observamos que há alcalinização intestinal em ambos os casos, mas a intensidade do processo é significativamente maior nos instantes iniciais logo após o início da digestão: no grupo tratado com hemolinfa coletada 0-3h após o repasto, 20 dos 21 intestinos tratados passaram a $\text{pH} \geq 6,5$, dos quais 71% atingiram pH em torno de 7,0; contra 10 dos 20 intestinos tratados com hemolinfa coletada 30-33h após o repasto, para os quais o pH permaneceu em torno de 6,5. Os dados obtidos nestes experimentos encontram-se resumidos na figura 19.

O efeito alcalinizante da hemolinfa coletada 30-33h após o repasto é significativamente maior do que o efeito da hemolinfa de fêmeas mantidas em jejum, a qual não provoca qualquer alteração de pH nos intestinos. A liberação de moléculas na hemolinfa em decorrência da ingestão de sangue pode ser um dos fatores primários à alcalinização do pH intestinal, mas não teria a mesma intensidade em fases mais avançadas da digestão. Considerando que é nesse momento que ocorre um maior aporte de aminoácidos do lúmen para os enterócitos, é possível que a presença de aminoácidos tenha maior relevância para a manutenção do pH adequado durante a digestão.

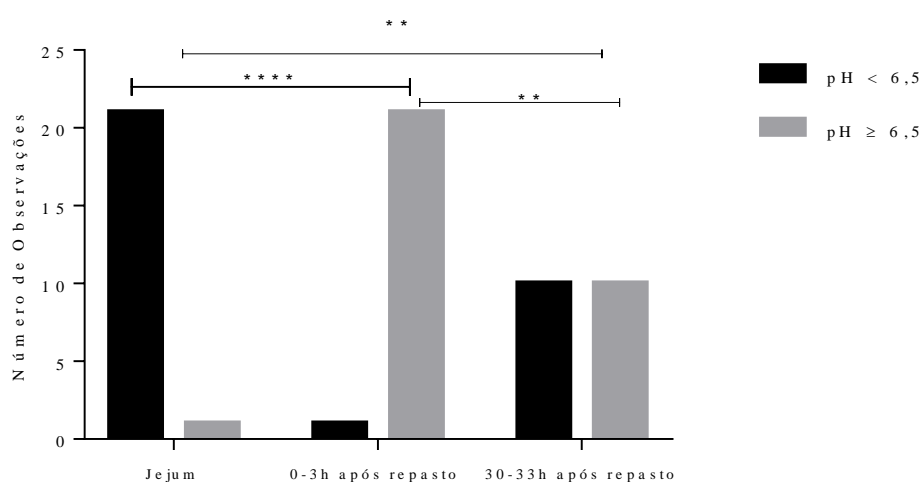


Figura 18 - pH do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após tratamento com hemolinfa de fêmeas em jejum ou após terem feito um repasto sanguíneo. As comparações feitas foram “Jejum *versus* 0-3h após repasto”; “Jejum *versus* 30-33h após repasto” e “0-3h após repasto *versus* 30-33h após repasto” (n=20 para cada grupo). Teste de Fisher, ****p < 0,0001; ** p < 0,01.

Mediante os resultados obtidos através dos experimentos com aminoácidos e com a hemolinfa de fêmeas com repasto, passamos a cogitar o envolvimento do sistema TOR na alcalinização do pH intestinal, por tratar-se de uma via de sinalização ativada tanto por estímulos nutricionais, especialmente aminoácidos, quanto por estímulos hormonais. Dessa forma, inicialmente seguimos à investigação da sinalização pela via TOR em intestinos de fêmeas de *L. longipalpis*.

5.6. ESTUDO DA SINALIZAÇÃO DO SISTEMA TOR EM INTESTINOS DE *Lutzomyia longipalpis*

5.6.1. Identificação de Lulo4E-BP

Utilizando como base a sequência de Aa4E-BP de *Aedes aegypti*, identificamos através da plataforma *Vector Base* um possível gene codificante para a proteína em *L. longipalpis*, o qual será referido como Lulo4E-BP (LLOJ007311-PA). Lulo4E-BP é ortólogo ao gene de *A. aegypti*, com o qual compartilha 57,9% de identidade, tendo ambos evoluído a partir de um gene ancestral comum entre os Diptera (figura 20).

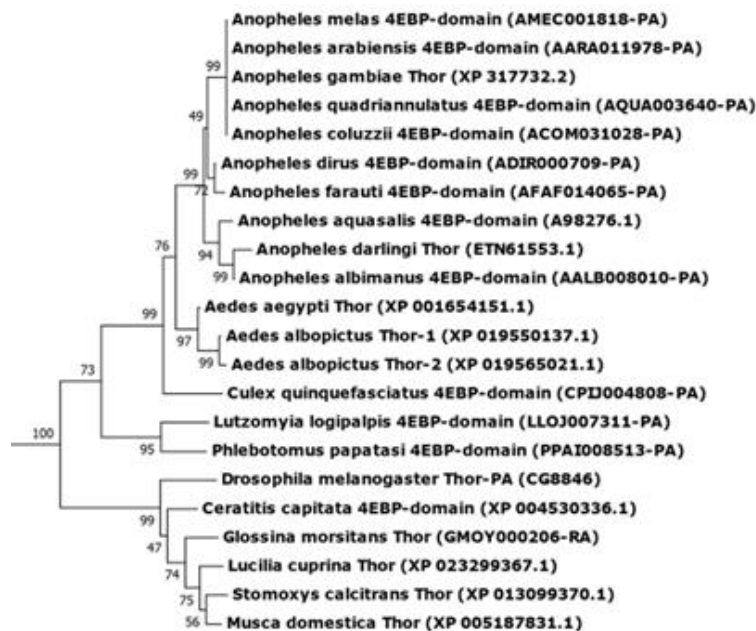


Figura 19 - Dendrograma representando a análise evolutiva do gene 4E-BP, o qual evoluiu entre diferentes espécies de Diptera a partir de um ancestral comum.

5.6.2. Análise da expressão gênica e da fosforilação de Lulo4E-BP em intestinos de *Lutzomyia longipalpis*

A análise da expressão de Lulo4E-BP por qPCR em intestinos de *L. longipalpis* em diferentes condições nutricionais evidenciou significativa diferença entre os estados de jejum e nas primeiras horas após repasto sanguíneo (Kruskal-Wallis, Dunn, * $p < 0,05$). É possível inferir pela figura 21 que os estímulos nutricionais fornecidos pela alimentação com açúcar e com sangue levaram à repressão da transcrição de Lulo4E-BP, indicando a ativação da via TOR no tecido estudado (a proteína Lulo4E-BP funciona como um inibidor da transcrição).

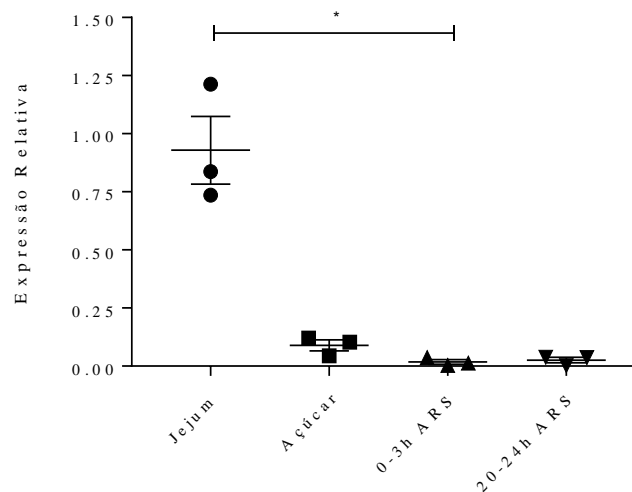


Figura 20 - Expressão (qPCR) de Lulo4E-BP (LLOJ007311-PA) no intestino de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em diferentes condições nutricionais: jejum; alimentadas apenas com açúcar; 0-3h após repasto sanguíneo; 20-24h após repasto sanguíneo. Os dados estão representados pela média \pm erro padrão de 3 pools de 20 intestinos em cada grupo. Kruskal-Wallis, Dunn, * $p < 0,05$. (ARS – Após Repasto Sanguíneo).

No experimento de *western blotting*, o anticorpo utilizado detecta a ocorrência de fosforilação em 4E-BP, provavelmente na treonina 37 (Thr 37) e na treonina 46 (Thr 46). Como pode ser observado na figura 22, Lulo4E-BP encontra-se altamente fosforilado no intestino de fêmeas que ingeriram sangue, estando apenas minimamente fosforilado nos insetos mantidos em jejum.

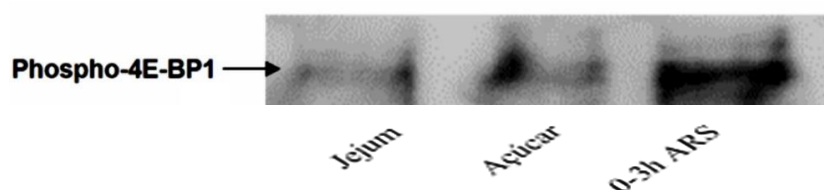


Figura 21 - Avaliação por *western blotting* da fosforilação de 4E-BP em intestinos de *Lutzomyia longipalpis* mantidas em jejum, alimentadas com açúcar, ou no intervalo de 0-3h após repasto sanguíneo. O anticorpo Phospho-4E-BP1 detecta especificamente fosforilação em Thr 37 e Thr 46 (ARS – Após Repasto Sanguíneo).

Uma vez que o estímulo à fosforilação de 4E-BP vem da ativação do sistema TOR, os experimentos mostram que o repasto sanguíneo induz a sinalização por TOR no intestino de *L. longipalpis*, o que nos conduziu a avaliar o efeito da inibição do sistema TOR na alcalinização intestinal induzida por aminoácidos, e também pela hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* coletada após o repasto sanguíneo.

5.7. ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA TOR NO CONTROLE DO pH INTESTINAL EM *Lutzomyia longipalpis*

5.7.1. Efeito da inibição do sistema TOR por rapamicina na alcalinização estimulada por hemolinfa de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* com repasto

Como mostrado na figura 23, a inibição do sistema TOR interfere na ação alcalinizante das moléculas presentes na hemolinfa de fêmeas com repasto, de forma que intestinos submetidos a esse tratamento permaneceram ácidos (pH <6,5) após aplicação da hemolinfa. Nos intestinos tratados com SFI (grupo controle), como esperado, observamos marcante alcalinização do pH intestinal após aplicação da hemolinfa.

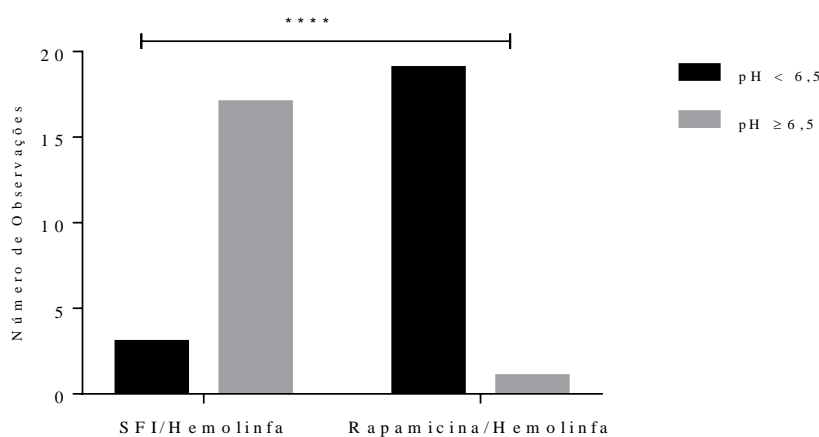


Figura 22 - Efeito da inibição do sistema TOR por rapamicina na alcalinização estimulada pela hemolinfa de fêmeas com repasto no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Concentração final no experimento: Rapamicina 20µM (n=20 para cada grupo). Teste de Fisher, **** p< 0,0001.

5.7.2. Efeito da inibição da via TOR por rapamicina na alcalinização estimulada por aminoácidos

Verificamos que a inibição do sistema TOR pela rapamicina não interferiu no processo de alcalinização intestinal que ocorre em resposta à adição de aminoácidos (Teste de Fisher, p

> 0,05), indicando que a alcalinização por aminoácidos é independente da porção da via TOR inibida pela rapamicina. Como pode ser visto na Figura 24, após a adição da solução de aminoácidos, o grupo de intestinos tratados com rapamicina comportou-se de modo similar ao grupo controle.

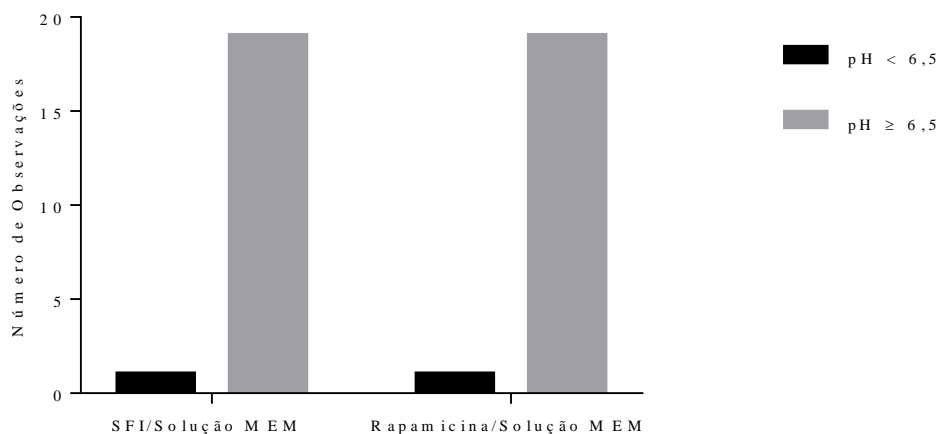


Figura 23 - Efeito da inibição da via TOR por rapamicina na alcalinização induzida por aminoácidos no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Concentração final no experimento: Rapamicina 20 μ M; Solução MEM 43mM (n=20 para cada grupo). Teste de Fisher, não significativo.

Os resultados anteriores mostram que o repasto sanguíneo ativa sistemas de transporte de aminoácidos e a via TOR em intestinos de *L. longipalpis*, os quais, em conjunto com moléculas presentes na hemolinfa, participam da alcalinização intestinal. Por ser um evento estritamente regulado, a alteração no pH intestinal que se segue à ingestão de sangue deve depender da ativação de receptores específicos. Presumimos, então, que essa ativação poderia levar à produção de segundos mensageiros, a exemplo de cAMP e cGMP, que atuariam em alvos intracelulares os quais poderiam participar desse controle de pH. Com base nessa associação, testamos a possível participação de segundos mensageiros no controle de pH intestinal.

Quando fêmeas de *L. longipalpis* ingerem sangue o aumento da disponibilidade de aminoácidos ativa diferentes sistemas de transporte que em conjunto contribuem para a alcalinização do intestino médio abdominal. O funcionamento de parte desses sistemas transportadores requer que as membranas através das quais ocorre o transporte estejam energizadas, o que torna crucial a geração e manutenção de um potencial de membrana. Para essa função, as bombas eletrogênicas Na⁺/K⁺-ATPases seriam as principais responsáveis (Wieczorek, et al. 2009; Harvey, 2009a). As V-ATPases em intestinos de insetos adultos estão voltadas para bombear H⁺ para a região luminal do intestino (Santos et al. 2011). Assim, elas

não poderiam participar da energização do epitélio intestinal em insetos que estejam digerindo sangue (neste caso o lúmen precisa permanecer alcalino). Em concordância com esse raciocínio, a avaliação da atividade de ATPases em intestinos de mosquitos adultos mostrou que a energização seria função primordial da Na^+/K^+ -ATPase (MacVicker et al. 1993; Nepomuceno et al. 2017). Tornou-se relevante, portanto, determinar a principal ATPase envolvida na energização de membranas no intestino médio de *L. longipalpis*.

5.8. ATIVIDADE DA BOMBA Na^+/K^+ -ATPase NO INTESTINO MÉDIO DE *L. longipalpis*

Os ensaios realizados para avaliar a atividade de ATPases na energização de membranas mostraram que a principal envolvida nesse processo seria a bomba Na^+/K^+ -ATPase. Como mostra a figura 18, a atividade total ATPásica ($\text{Mg}^{2+}+\text{Na}^{2+}+\text{K}^{2+}$) medida nos intestinos foi de $1,186\pm 0,340\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ h}^{-1}$, a qual, na presença de ouabaína – inibidor específico de Na^+/K^+ -ATPase-, foi significativamente reduzida à $0,416\pm 0,0596\mu\text{mol PO}_4^{3-} \text{ h}^{-1}$ ($p<0,05$). Desta forma, é possível inferir que a atividade de Na^+/K^+ -ATPase responde por aproximadamente 65% do total da atividade de ATPásica medida, sendo essa, portanto, a principal envolvida na manutenção do potencial de membrana em intestinos de *L. longipalpis*.

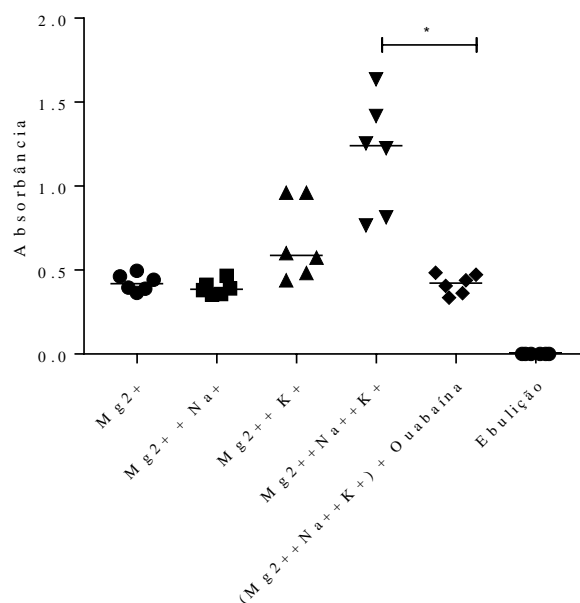


Figura 24 - Avaliação da atividade de ATPases no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Cada ponto do gráfico representa um experimento onde o grupo foi avaliado em duplicata, obtendo-se e a média das absorbâncias. Os dados estão representados como a mediana. Kruskal-Wallis, Dunn, * $p<0,05$.

5.9. PAPEL DE SEGUNDOS MENSAGEIROS NO CONTROLE DO pH INTESTINAL

Ao avaliar a participação de segundos mensageiros na regulação do pH intestinal verificamos que, em intestinos ácidos, a adição de dibutyryl-cAMP (d-cAMP) estimulou a alcalinização do pH intestinal em 90% dos intestinos avaliados (18/20) (Figura 25A), majoritariamente ao intervalo $6,5 \leq \text{pH} \leq 7$. Já a adição de cGMP (Figura 25B) não provocou alcalinização nos intestinos que estavam em pH 6.

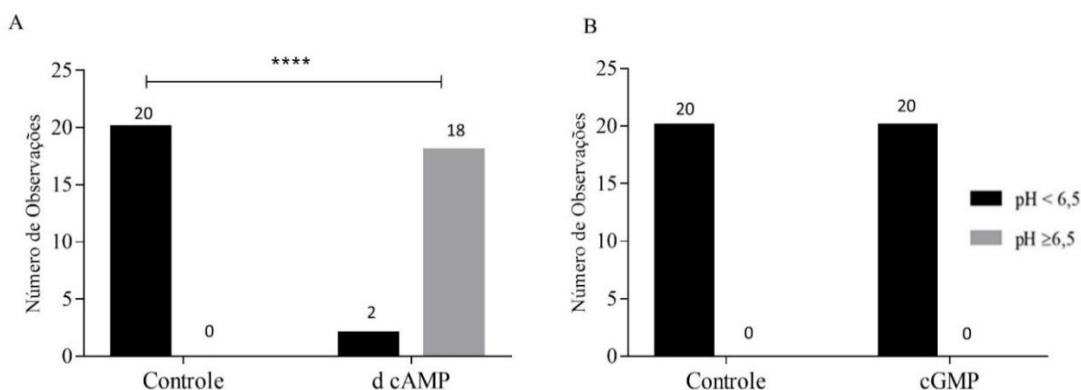


Figura 25 - Efeito do tratamento com d-cAMP ou cGMP no pH de intestinos ácidos ($\text{pH} \leq 6$) de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (n=20 intestinos/grupo). A) d-cAMP 2,8mM; B) cGMP 2mM. Teste de Fisher, ****p<0,0001.

Por outro lado, ao avaliarmos o efeito dos segundo-mensageiros em intestinos alcalinos - $\text{pH} \geq 7$ (que foram alcalinizados pela ingestão prévia de soro inativado - item 4.11), verificou-se que, enquanto a adição de d-cAMP não interferiu no pH, o tratamento com cGMP visivelmente estimulou a acidificação dos intestinos avaliados (Figura 26 A e B). Em conjunto, os dados obtidos suportam nossa hipótese que os segundos mensageiros cAMP e cGMP participam, com ações distintas, na regulação do pH intestinal de *Lutzomyia longipalpis*. cGMP pode estar ativando as V-ATPases presentes na região apical dos enterócitos.

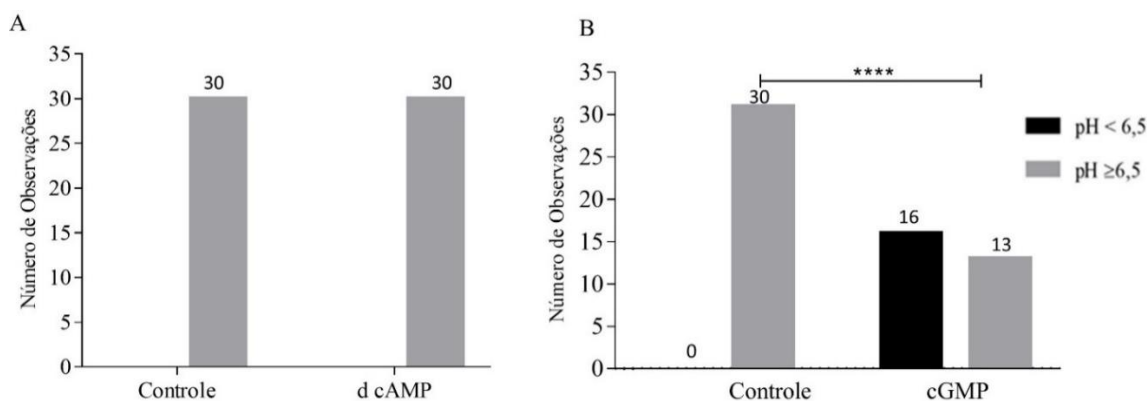


Figura 26 - Efeito do tratamento com d-cAMP ou cGMP no pH de intestinos alcalinos ($\text{pH} \geq 7$) de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (n=30 intestinos/grupo). A) d-cAMP 2,8mM; B) cGMP 2mM. Teste de Fisher, ****p<0,0001.

6. DISCUSSÃO

Dentro da subordem Nematocera, as fêmeas das espécies hematófagas alimentam-se tanto de açúcares disponíveis na natureza quanto do sangue de vertebrados. O repasto sanguíneo é essencial à maturação do sistema reprodutor das fêmeas, particularmente por seu elevado conteúdo proteico (Dillon e Lane, 1993; Dillon e El-Kordy, 1997; Soares e Turco, 2003; Hansen et al. 2004). Portanto, é crucial que o sistema digestivo desses insetos esteja adaptado ao processamento de substâncias tão distintas, e a regulação eficiente do pH intestinal é um dos principais fatores envolvidos nesse processo.

Nosso grupo de pesquisa têm estudado os mecanismos de controle do pH intestinal em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) (Gontijo et al. 1998; Santos et al. 2008; Santos et al. 2011) e dois mecanismos envolvidos no processo de alcalinização intestinal frente à ingestão de sangue foram elucidados em trabalhos anteriores. O primeiro envolve a volatilização de CO₂ do sangue ingerido, e o segundo relaciona-se ao transporte de íons através do epitélio intestinal.

No processo de volatilização, a perda de CO₂ provavelmente ocorre durante a passagem do sangue pelas peças bucais. A saída de CO₂ do sangue levaria ao desequilíbrio da equação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, promovendo o consumo de íons H⁺ e HCO₃⁻ e aumentando o pH do lúmen intestinal. Além disso, íons HCO₃⁻ produzidos no citoplasma dos enterócitos seriam levados ao lúmen intestinal, provavelmente a partir da troca com íons Cl⁻, caracterizando um sistema de antiporte Cl⁻/HCO₃⁻, o que também contribuiria para a alcalinização do lúmen intestinal, possivelmente isso acontece em conjunto ao funcionamento de outros sistemas de transporte. De fato, quando a enzima anidrase carbônica é inibida pela presença de acetazolamida, o processo de alcalinização é significativamente comprometido (Bilker et al. 2000; Santos et al. 2008; Santos et al. 2011).

O tratamento *ex-vivo* de intestinos ácidos (pH 6) de *L. longipalpis*, com diferentes concentrações de uma solução de aminoácidos permitiu evidenciar que a intensidade da alcalinização intestinal variava com a concentração utilizada (figura 6), de modo que quanto maior a disponibilidade de aminoácidos mais intenso era o aumento de pH. Uma vez que nesse experimento os intestinos estavam fechados, a única forma dos aminoácidos entrarem pelas células intestinais e desencadear a alcalinização seria através de transportadores localizados na região basolateral do epitélio.

Ao hipotetizarmos a participação de transportadores de aminoácidos na regulação do pH intestinal, conseguimos estabelecer um terceiro mecanismo, que atuaria conjuntamente aqueles previamente identificados, estimulando a alcalinização do lúmen intestinal em *L. longipalpis*.

Os transportadores classificados como PAT (*Proton/Amino acid transporter*) estão agrupados na família SLC36 e realizam simporte, acoplando o transporte de aminoácidos ao de íons H⁺ (Boll et al. 2004; Abbot et al. 2006). O simporte aminoácidos/H⁺ é eletrogênico, e ocorre na proporção 1:1. Além disso, é independente de Na⁺, K⁺ ou Cl⁻, mas é dependente do pH do meio e promove a acidificação do ambiente intracelular quando ativo (Sagné et al. 2001; Boll et al. 2002; Boll et al. 2004).

Em 2009, Evans et al. descreveram em *Aedes aegypti* o transportador de aminoácidos AaePAT1. Utilizando ovócitos de *Xenopus* e aminoácidos marcados com o radioisótopo ³H, os autores verificaram que AaePAT1 promovia o transporte de aminoácidos simultaneamente ao transporte de um cátion através de membranas. Uma vez que transportadores da classe PAT se caracterizam por realizar o simporte aminoácidos/H⁺, os autores concluíram que AaePAT1 necessariamente transportaria íons H⁺ para o citoplasma celular, mas não observaram diretamente se o funcionamento desse transportador induzia a acidificação do citoplasma dos ovócitos.

Com base na sequência de AaePAT1 identificamos em *L. longipalpis* o transportador LULOPAT1. A similaridade entre os dois transportadores é elevada (70.4%), e análises filogenéticas mostraram tratar-se de genes ortólogos (Figura 11). Assim, investigamos e propomos, pela primeira vez, a participação de transportadores PAT na regulação do pH intestinal.

Em *L. longipalpis*, a expressão de LULOPAT1 é restrita ao intestino e, similar a AaePAT1, tem perfil de expressão modulado pela ingestão de sangue: o nível de transcrição gênica aumenta expressivamente nas primeiras horas após repasto sanguíneo, o que deve coincidir com o aumento da disponibilidade de aminoácidos em decorrência da digestão do sangue. Acreditamos que a presença do sangue seja o estímulo ao aumento expressivo do transportador no intestino e, uma vez expressos, esses transportadores permaneceriam ativos até o fim da digestão. Passado o estímulo inicial, o gene LULOPAT1 seria apenas minimamente transcrito, justificando a menor expressão verificada no intervalo de 20-24 horas após o repasto sanguíneo.

O repasto sanguíneo estimularia vias de sinalização que modulam a transcrição de LULOPAT1, intensificando o transporte de aminoácidos do lúmen para o citoplasma dos enterócitos. Através do uso de fluoresceína, um corante cuja emissão de fluorescência varia linearmente com o pH do meio, obtivemos confirmação da atividade desse transportador.

Em intestinos abertos, nos quais o corante estava presente apenas nos enterócitos (Figura 27), a presença de aminoácidos levou a marcante redução da fluorescência emitida, sugerindo que íons H^+ foram transportados do lúmen intestinal para o citoplasma dos enterócitos, levando à acidificação desse compartimento (Figura 8). Em intestinos fechados a aplicação da solução de aminoácidos induziu o aumento da emissão de fluorescência (Figura 9), o que está em acordo com o fato que a acidificação do citoplasma dos enterócitos, devido ao funcionamento de LULOPAT1, necessariamente implica na alcalinização do lúmen intestinal. A expressão de outros PATs não foi avaliada no intestino, mas, se ativos nesse órgão, é plausível que também participem desse mesmo processo.

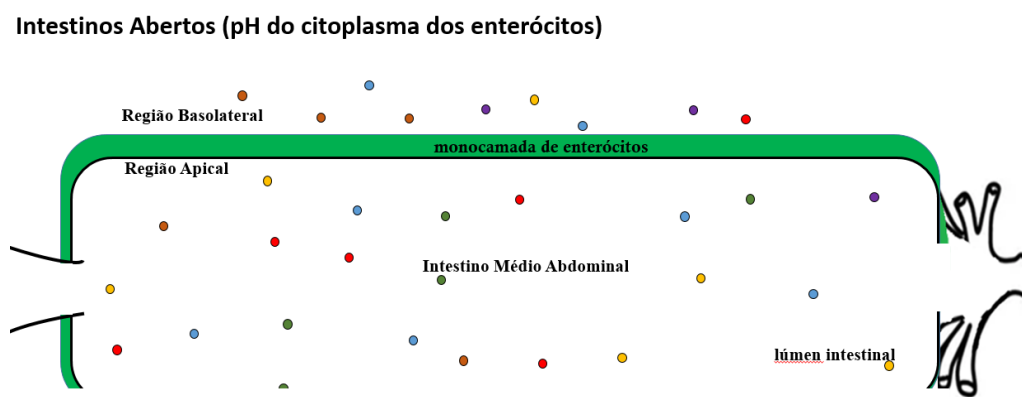


Figura 27 – Esquema representativo de um intestino aberto corado com fluoresceína, tratado com solução MEM de aminoácidos (● - aminoácidos).

É importante ressaltar que, em fêmeas adultas de *A. aegypti*, AaePAT1 é expresso apenas na membrana apical do intestino médio (Evans et al. 2009) e, considerando que PATs são tipicamente proteínas de superfície apical (Sagné et al. 2001), LULOPAT1 deveria seguir o mesmo padrão e estar localizado na superfície do lúmen intestinal. Nossos dados sugerem essa mesma localização, uma vez que apenas em intestinos abertos a entrada de aminoácidos pelo lúmen intestinal era possível, resultando na acidificação do citoplasma dos enterócitos, como no caso dos intestinos tratados com os aminoácidos serina e leucina (Figura 15). Por outro lado, os aminoácidos lisina e arginina não provocaram alterações no pH citoplasmático, indicando que a entrada deles nos enterócitos deve ser mediada por outros transportadores.

Considerando os experimentos realizados com intestinos fechados, a entrada de aminoácidos nos enterócitos somente ocorreria através de transportadores presentes na membrana basolateral do epitélio intestinal (Figura 28). Observando as variações na emissão de fluorescência (figura 16), apenas arginina e lisina estimularam a alcalinização do lúmen intestinal. Obtivemos, então, um indício de que tais aminoácidos participam do processo de alcalinização intestinal por transportadores que não estão envolvidos no simporte aminoácidos/H⁺. É possível que esse transporte seja realizado por transportadores de aminoácidos catiônicos (CATs), que integram uma subfamília da família SLC7, os quais têm elevada especificidade por aminoácidos de carga positiva como arginina, lisina e histidina (Carpenter et al. 2012). Outros aminoácidos não investigados podem estar envolvidos no processo de alcalinização discutido ao longo deste trabalho.

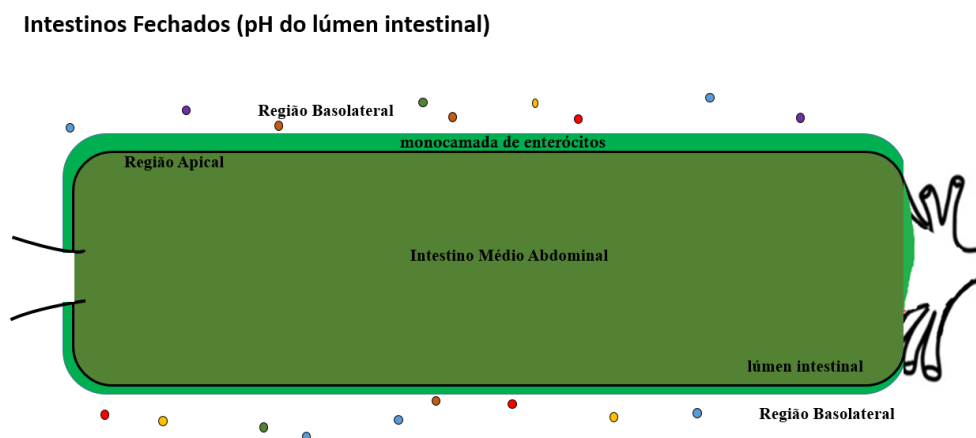


Figura 28 – Esquema representativo de um intestino fechado corado com fluoresceína, tratado com solução MEM de aminoácidos (● aminoácidos).

Considerando que, uma vez que o sangue é rico em Na⁺ e K⁺ (íons Na⁺ estão presentes em elevada concentração no plasma, e íons K⁺ dentro das células sanguíneas), é provável que o transporte de aminoácidos acoplado a esses íons também ocorra durante a digestão do sangue. Seria, portanto, o caso de transportadores classificados como NAT (*Nutrient Amino acid Transporters*, família SLC6), os quais se localizam na membrana apical do canal alimentar de metazoários e caracterizam-se por realizar um transporte de aminoácidos dependente de íons Na⁺, contra um gradiente químico (Boudko, 2012), ou dos transportadores da família SLC38 (ou SNATS – *Sodium-coupled Neutral Amino acid Transporters*), os quais co-transportam aminoácidos neutros e íons Na⁺, sendo a captação dos aminoácidos impulsionada pelo gradiente de sódio através da membrana plasmática (Schiöth et al. 2013; Bröer, 2014; Fan e Goberdhan, 2018).

O funcionamento de PATs, e de outros sistemas de transporte, é intimamente associado ao potencial de membrana das células, podendo ser afetado caso ocorram mudanças de potencial (Boll et al. 2004). Na^+/K^+ -ATPase e V-ATPases são bombas eletrogênicas que convertem a energia resultante da hidrólise de ATP em diferença de potencial eletroquímico através de membranas celulares, sendo particularmente importantes em células intestinais de insetos (Beyenbach e Wiczorek, 2006).

Em *A. aegypti*, as V-ATPases se localizam na membrana apical dos enterócitos (Patrick et al. 2006) e funcionariam transportando ativamente íons H^+ para o lúmen intestinal. Contudo, estudos prévios (Santos et al. 2011; Nepomuceno et al. 2017) já haviam sugerido que V-ATPases estariam ativas apenas em fêmeas sem repasto sanguíneo, onde atuariam mantendo o pH ácido do intestino médio; uma vez que houvesse repasto sanguíneo, elas permaneceriam inativas até a completa digestão do sangue. Nesse caso, as bombas Na^+/K^+ -ATPases seriam, portanto, as principais responsáveis pela geração de um gradiente eletroquímico através da membrana basolateral dos enterócitos, como previamente verificado em *A. aegypti* (Patrick et al. 2006; Pacey e O'Donnell, 2014; Nepomuceno et al. 2017), o que também poderia prover a energia necessária para o transporte de aminoácidos através de membranas (Taylor, 2014).

Em acordo com os estudos realizados em *A. aegypti* e em *Anopheles stephensi* (MacVicker et al. 1993), ao ensaiarmos a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase em intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* verificamos ser ela a responsável pela maior parte da atividade de ATPásica, e, portanto, da polarização de membranas. A ingestão de sangue leva à inativação temporária das V-ATPases, e na presença de ouabaína, inibidor específico de Na^+/K^+ -ATPase, a atividade enzimática total foi reduzida em mais de 60% (Figura 18). Assim como nos estudos realizados em mosquitos, em *L. longipalpis* observamos que a atividade da bomba é proporcionalmente mais dependente de íons K^+ do que íons Na^+ . Interessante destacar que a presença de íons Mg^{2+} nos ensaios realizados foi necessária pois admite-se que o complexo Mg-ATP seria o principal substrato de Na^+/K^+ -ATPase (Robinson, 1983; MacVicker et al. 1993).

Quando fêmeas de *L. longipalpis* fazem repasto sanguíneo o intestino médio abdominal torna-se fortemente alcalino, em torno de pH 8,15. Esse compartimento é mantido alcalino até o fim da digestão do sangue ingerido, mas o pH reduz progressivamente à medida que a digestão avança. Previamente, Santos et al. (2011) verificaram que aminoácidos, na concentração presente no soro, não seriam o estímulo primário à alcalinização intestinal e sugeriram que eles, na verdade, contribuiriam para a manutenção do pH adequado ao longo da digestão do repasto sanguíneo.

Já a hemolinfa de fêmeas alimentadas com sangue contaria com substâncias (hormônios alcalinizantes) capazes de disparar a alcalinização (Santos et al. 2011). O intestino de *L. longipalpis* apresenta células endócrinas que secretariam peptídeos na hemolinfa durante a digestão; tais peptídeos atuariam como hormônios, e, ao se ligarem a receptores na membrana basal dos enterócitos, desencadeariam a sinalização que leva à alcalinização do lúmen intestinal (Leite e Evangelista, 2001; Soares e Turco, 2003; Santos et al. 2011).

Ao avaliarmos o efeito da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* no pH intestinal, observamos que a hemolinfa coletada no intervalo de 0-3 horas após repasto sanguíneo promoveu intenso estímulo à alcalinização em relação aos outros tempos avaliados (Figura 19). Interessante ressaltar que o intervalo de 30-33 horas após repasto corresponde a um momento no qual a concentração de moléculas alcalinizantes está decrescendo, o que justificaria a menor eficácia da hemolinfa coletada nesse intervalo em ativar a alcalinização intestinal.

Em mosquitos, foi mostrado que o pico de concentração de aminoácidos na hemolinfa após repasto sanguíneo ocorre, em média, 30h após o início da digestão do sangue (Uchida et al.1990; Boudko et al. 2015), e considerando que em *L. longipalpis* o pico de atividade proteolítica ocorre entre 36h e 48h após o início da digestão (Santos et al. 2014), é provável que o ápice da disponibilidade de aminoácidos para transporte também ocorra em fases mais avançadas da digestão.

Por conseguinte, acreditamos que os estímulos que ativam a alcalinização intestinal podem diferir daqueles necessários à manutenção do pH alcalino até o fim da digestão de sangue. Dessa forma, moléculas liberadas durante a hematofagia deflagrariam o processo de alcalinização. Em etapas posteriores da digestão, em um momento no qual há a redução na concentração dessas moléculas alcalinizantes na hemolinfa, a atividade de enzimas proteolíticas seria máxima, com maior proporção de aminoácidos absorvida pelos enterócitos, contribuindo para a manutenção do pH alcalino.

Transportadores de aminoácidos têm papel crucial na homeostase de organismos multicelulares. De fato, tais transportadores podem ser considerados o elo inicial entre uma célula e o seu ambiente ao iniciar e regular alterações na disponibilidade intracelular e extracelular de aminoácidos, permitindo à célula adaptar-se de modo eficaz a alterações no *status* nutricional (Hundal e Taylor, 2009). A geração e propagação de sinais anabólicos decorrentes da ingestão de alimentos ricos em proteínas requer que aminoácidos sejam conduzidos a sensores intracelulares e a moléculas efetoras associadas ao sistema TOR, e, para tal, o funcionamento de transportadores de aminoácidos é fundamental (Taylor, 2014).

TOR (*Target of Rapamycin*) responde por uma via de sinalização intracelular presente em todos os organismos eucarióticos, evolutivamente conservada quanto à sua estrutura e função (Nakashima e Tamanoi, 2010). Atua como controlador central do crescimento celular, integrando sinais intra e extracelulares e controlando a atividade celular em resposta a nutrientes, hormônios e estresse (Heitman et al. 1991; Hansen et al. 2005; Kim & Guan, 2011). A ativação da via TOR ocorre mediante estímulos nutricionais ou hormonais, e dentre os estímulos nutricionais, um dos principais seria exatamente o aumento da disponibilidade de aminoácidos. Em fêmeas de *L. longipalpis*, e em outros dípteros nematóceros hematófagos, isso ocorreria mediante o repasto sanguíneo, por exemplo.

A captação de aminoácidos através de proteínas transportadoras seria parte fundamental da regulação de TOR, mas como as células percebem e respondem a alterações nas concentrações de aminoácidos ainda não é claro (Murphy et al. 2009). Em mamíferos, sabe-se que a presença de aminoácidos essenciais como leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e triptofano (os quais integram o grupo de aminoácidos neutros) são peças-chave para a ativação de mTORC1, particularmente leucina sendo considerado um potente ativador e utilizado para mostrar a dependência de TOR por aminoácidos (Dodd e Tee, 2012).

Em fêmeas de *A. aegypti*, transportadores da família SLC7 já foram implicados como integrantes da cascata de sinalização de TOR, atuando como sensores que permitiriam que o corpo gorduroso “detectasse” o aumento da disponibilidade de aminoácidos após o repasto sanguíneo, aumentando expressivamente a atividade de TOR e culminando na ativação de genes envolvidos nos eventos da vitelogenese (Attardo et al. 2005; Attardo et al. 2006; Hansen et al. 2011; Carpenter et al. 2012). Além disso, já foi verificado que o *knockdown* de TOR inibe intensamente a produção da proteína vitelogenina *in vitro*, e que, *in vivo*, interfere na formação dos ovos, após repasto sanguíneo (Hansen et al. 2004; Hansen et al. 2005; Attardo et al. 2006; Park et al. 2006).

Dentre as metodologias utilizadas para investigar a ativação de TOR está a avaliação do estado de fosforilação de suas principais proteínas alvo: 4E-BP e/ou S6K (Kimball e Jefferson, 2010; Iadevaia et al. 2012). Em seu estado não fosforilado, 4E-BP está firmemente ligada ao fator eIF4E, uma proteína associada à ligação inicial de ribossomos à extremidade 5' de RNA mensageiros (mRNA). Tal ligação inibe eIF4E, e, portanto, os eventos de tradução de proteínas. Quando TOR é ativado há a fosforilação e consequente inativação de 4E-BP. Ocorre, então, o seu desligamento de eIF4E, permitindo que esse induza o recrutamento de mRNA pelos ribossomos e, assim, o estímulo à síntese proteica (Avruch et al. 2009; Taylor, 2014).

Nesse sentido, pode-se utilizar anticorpos específicos para 4E-BP fosforilada, os quais detectam fosforilação especificamente na treonina 37 e na treonina 46, sítios de fosforilação filogeneticamente conservados em todas as espécies (Brandon et al. 2008; Qin et al. 2016). Através dessa abordagem, Roy e Raikhel (2012) observaram que 4E-BP torna-se altamente fosforilada no corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti*, tanto após repasto sanguíneo (*in vivo*) quanto após incubação com aminoácidos (*in vitro*).

Brandon et al. (2008) mostrou que 4E-BP torna-se altamente fosforilada em intestinos de fêmeas de *A. aegypti* após repasto sanguíneo. Além disso, os autores sugerem que a sinalização por TOR seria necessária aos eventos iniciais de tradução de tripsina precoce, a qual é expressa como proteína apenas após um repasto sanguíneo (Barillas-Mury et al. 1995; Noriega et al. 1996). Apesar dos estudos do sistema TOR em corpos gordurosos de insetos, não temos conhecimento de trabalhos que investigaram sua sinalização em intestinos além do realizado por Brandon et al. (2008), e, até o momento, não temos conhecimento de estudos que avaliaram a possível participação de TOR na regulação do pH intestinal.

Com base na sequência de Aae4E-BP (Roy e Raikhel, 2012) conseguimos identificar em intestinos de *L. longipalpis* uma sequência codificante para o gene de 4E-BP. Similar ao verificado previamente em intestinos e no corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* (Brandon et al. 2008; Roy e Raikhel, 2012) o nível de fosforilação da proteína no intestino varia de acordo com o estado nutricional das fêmeas de *L. longipalpis*, elevando-se significativamente nas primeiras horas após um repasto sanguíneo (Figura 22). Acreditamos que, assim como em mosquitos, a ingestão de sangue aumentou a disponibilidade de aminoácidos e estimulou o funcionamento de seus transportadores, ativando a sinalização por TOR nos intestinos e culminando, portanto, na fosforilação de 4E-BP.

Havendo a sinalização pela via TOR em intestinos de *L. longipalpis*, passamos a investigar se esse sistema teria participação na alcalinização do pH intestinal estimulada por aminoácidos. Utilizando preparações *ex-vivo* de intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* em $\text{pH} \leq 6$ e previamente tratados com rapamicina, inibidor específico de TOR, verificamos que a alcalinização estimulada pela presença de aminoácidos não foi afetada.

Estudos prévios mostraram que em intestinos de mosquitos a fosforilação de 4E-BP pela via TOR em resposta à presença de aminoácidos é apenas minimamente afetada pela presença de rapamicina (Brandon et al. 2008), sendo insensível à presença dessa droga em corpos gordurosos de fêmeas de *A. aegypti* (Roy e Raikhel, 2012), sugerindo que a ativação de TOR por aminoácidos ocorre através de uma ramificação da via TOR que não é afetada por

rapamicina. De forma interessante e tendo empregado uma metodologia simples, nossos resultados corroboram os dados disponíveis na literatura, mas também sugerem que a alcalinização estimulada pela presença de aminoácidos pode ocorrer por outros sistemas que não TOR, os quais serão alvo de estudos futuros.

A ativação de TOR por estímulos hormonais ocorreria principalmente pela sinalização do receptor de insulina (InR) através da via insulina/ fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), o que já foi mostrado em vários organismos, como *Drosophila* (Miron et al. 2003; Goberdhan et al. 2005), *A. aegypti* (Roy et al. 2007; Gulia-Nuss et al. 2011), e em mamíferos (Nobukuni et al. 2005).

Assim, também investigamos uma possível relação entre a alcalinização intestinal estimulada por moléculas presentes na hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* após repasto sanguíneo e a sinalização por TOR. Também utilizando preparações *ex-vivo* de intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* em $\text{pH} \leq 6$, nossos resultados mostraram que, na presença de rapamicina, a ação alcalinizante da hemolinfa é completamente reprimida (Figura 23), sugerindo que esse seria um mecanismo dependente da via TOR, e, ao contrário do estímulo fornecido por aminoácidos, refletiria a parte sensível à rapamicina dessa via de sinalização. Em corpos gordurosos de fêmeas de *A. aegypti* foi mostrado que tanto o silenciamento de InR, quanto a presença de rapamicina, afetam a fosforilação de 4E-BP em resposta à ativação de TOR por insulina (Roy e Raikhel, 2012). É possível que essas observações também sejam verdadeiras para *L. longipalpis*, mas iremos aprofundar as investigações sobre o papel de InR em nosso modelo experimental.

Segundos mensageiros são moléculas que atuam na condução de sinais no meio intracelular e podem determinar alterações em diferentes funções celulares (Lewis et al. 1990). Ao avaliarmos se cAMP e cGMP poderiam participar do controle de pH intestinal, inicialmente investigamos se eles poderiam interferir na atividade de ATPases: esperava-se que cAMP atuasse desligando as V-ATPases e o cGMP, por sua vez, ativando-as. Entretanto, os ensaios realizados não permitiram afirmar com clareza se os segundos mensageiros avaliados afetam a atividade de ATPases (resultados não mostrados).

Posteriormente, utilizando preparações *ex-vivo* de intestinos de *L. longipalpis*, observamos que em intestinos ácidos ($\text{pH} \leq 6,0$) a presença de cAMP induziu a alcalinização intestinal, enquanto cGMP não produziu quaisquer alterações. No entanto, em intestinos alcalinos, a partir de tratamento prévio com soro inativado, o efeito foi exatamente o oposto: na presença de cAMP não houve alteração do pH intestinal, o qual, na presença de cGMP, tornou-

se proeminentemente ácido. Os dados obtidos são promissores e revelam uma nova perspectiva a ser explorada no estudo da regulação do pH intestinal em insetos.

Acreditamos que nossos resultados sejam os únicos a sugerirem a participação de segundos mensageiros cíclicos na regulação do pH intestinal em dípteros nematóceros hematófagos adultos. Estudos sugerem que a atividade da enzima adenil ciclase, responsável pela geração de cAMP, seja dependente do pH citoplasmático: a queda no pH reduziria a atividade de adenil ciclase, reduzindo a produção de cAMP, enquanto a alcalinização citoplasmática aumentaria a atividade dessa enzima, aumentando, portanto, a concentração intracelular de cAMP (Thevelein et al. 1987; Roos e Boron, 1981; Hollomon et al. 2016). É possível que o efeito que verificamos quando trabalhando com cGMP siga o mesmo padrão, mas deveremos aprofundar a investigação da participação de segundos mensageiros nas alterações de pH que ocorre no intestino médio de *L. longipalpis*.

7. CONCLUSÕES

- A fluoresceína é um corante eficaz para verificar variações no pH intracelular e no lúmen intestinal e poderia ser utilizado em outras situações na pesquisa;
- Intestinos de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* expressam LULOPAT1, transportador de aminoácidos envolvido no simporte aminoácidos/H⁺, cujo nível de expressão é modulado pelo estado nutricional do inseto. Outros transportadores também devem estar presentes e atuar no processo de alcalinização intestinal, os quais serão alvo de pesquisas futuras;
- A atividade de LULOPAT1 resulta em acidificação do citoplasma dos enterócitos, com conseqüente alcalinização do lúmen intestinal;
- Os aminoácidos serina e leucina são eficientes substratos para LULOPAT1. Por outro lado, os aminoácidos arginina e lisina devem ser transportados por outros sistemas não relacionados ao simporte com íons H⁺, os quais devem também estar localizados na membrana basolateral dos enterócitos, uma vez que apenas em intestinos fechados estimularam a alcalinização do lúmen intestinal;
- Na⁺/K⁺-ATPase é a principal bomba energizadora nas membranas do intestino de *L. longipalpis*, respondendo pela maior parte da atividade de ATPases medida;
- Nos instantes iniciais após um repasto sanguíneo, acreditamos que o lançamento de moléculas na hemolinfa ativaria a alcalinização do pH do intestino médio; com o avanço da digestão, esse mecanismo teria menor relevância na manutenção do pH alcalino. Nesse momento, é possível que o aumento da disponibilidade de aminoácidos em razão da máxima atividade proteolítica atue na manutenção do pH alcalino até a completa digestão do sangue;
- Em intestino de fêmeas de *L. longipalpis*, após repasto sanguíneo, há intensa fosforilação de 4E-BP, um dos principais alvos *downstream* do sistema TOR. Portanto, a ingestão de sangue também estimula a sinalização pela via TOR em intestinos de *L. longipalpis*;
- A inibição da via TOR por rapamicina não afeta a alcalinização estimulada por aminoácidos, mas inibe a alcalinização mediada por moléculas presentes na hemolinfa após repasto sanguíneo, refletindo que, apesar de ambos os estímulos ativarem TOR, a condução dos sinais efetores é provavelmente realizada por mecanismos distintos;
- cAMP participaria dos eventos de alcalinização, e cGMP na acidificação, em intestinos de *L. longipalpis*. Esses resultados serão utilizados para aprofundar o estudo de segundos mensageiros na regulação do pH intestinal.

Ainda permanecem lacunas a serem preenchidas. Contudo, o estudo realizado desvendou mecanismos que participam ativamente na regulação do pH intestinal, além de propor novas vias que podem ter influência nesse processo, expandindo sobremaneira os conhecimentos existentes. Espera-se em breve ser possível elaborar um modelo de funcionamento que contemple todos os mecanismos envolvidos no controle do pH intestinal em *L. longipalpis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot EL; Grenade DS; Kennedy, DJ; Gatfield, KM; Thwaites, DT. 2006. Vigabatrin transport across the human intestinal epithelial (Caco-2) brush-border membrane is via the H(+)-coupled amino-acid transporter hPAT1. *Br. J. Pharmacol.* 147, 298-306.
- Abraham RT; Wiederrecht GJ. 1996. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol.*14:483-510.
- Adibi SA, Mercer DW. 1973. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *J. Clin. Invest.* v. 52, p. 1586-1594.
- Alvar, J; Velez, ID; Bern, C; Herrero, M.; Desjeux, P; Cano, J; Jannin, J; den Boer. M; WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one.* 7:e35671
- Arsham A.M., Neufeld T.P. 2006. Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 589–597.
- Attardo, G.M., Hansen, I.A., Raikhel, A.S. 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochem Mol Biol.* 34: 661–675.
- Attardo, G.M., Hansen, I.A., Shiao, S.H., Raikhel, A.S. 2006. Identification of two cationic amino acid transporters required for nutritional signaling during mosquito reproduction. *J. Exp. Biol.* 209, 3071–3078.
- Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Dai N. 2009. Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 296:E592–602.
- Backer JM. 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* 410: 1–17.
- Baertl JM, Placko, R.P, Graham GG. 1974. Serum proteins and plasma free amino acids in severe malnutrition. *AM. J. Clin. Nutr.* v.27, p.733-742.
- Balgi AD, Diering GH, Donohue E, Lam KKY, Fonseca BD, Zimmerman C, Numata M, Roberge M. 2011. Regulation of mTORC1 signaling by pH. *PLoS ONE* 6(6): e21549.
- Barillas-Mury, CV; Noriega, FG; Wells, MA. 1995. Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 241-246.
- Bates PA; Tetley L. 1993. *Leishmania mexicana*: Induction of Metacyclogenesis by Cultivation of Promastigotes at Acidic pH. *Exp Parasitol* 76: 412–423
- Beyenbach, KW; Wieczorek, H. 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* 209, 577-589.

- Bezerra, JMT; de Araújo, VEM; Barbosa, DS; Martins-Melo, FR; Werneck, GL; Carneiro, M. 2018. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Negl Trop Dis*. 12:e0006697.
- Boll, M; Foltz M; Rubio-Aliaga, I; Kottra G; Daniel, H. 2002. Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *J. Biol. Chem.* 277, 22966-22973.
- Boll M, Daniel H, Gasnier B. 2004. The SLC36 family: proton-coupled transporters for the absorption of selected amino acids from extracellular and intracellular proteolysis. *Pflugers Arch.* 447(5):776-9.
- Boudko DY, Moroz LL, Harvey WR, Linser PJ. 2001. Alkalinization by chloride/bicarbonate pathway in larval mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 15354–15359.
- Boudko, DY. 2012. Molecular basis of essential amino acid transport from studies of insect nutrient amino acid transporters of the SLC6 family (NAT-SLC6). *J Insect Physiol.* 58(4): 433–449.
- Boudko DY, Tsujimoto H, Rodriguez SD, Meleshkevitch EA, Price DP, Drake LL, Hansen IA. 2015. Substrate specificity and transport mechanism of amino-acid transceptor Slimfast from *Aedes aegypti*. *Nat Commun.* 9;6:8546.
- Brandon MC, Pennington JE, Isoe J, Zamora J, Schillinger AS, Miesfeld RL. 2008. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 38:916-22.
- Bröer S. 2014. The SLC38 family of sodium-amino acid co-transporters. *Pflugers Arch.* 466:155-72.
- Cameron MM, Pessoa FAC, Vasconcelos AW; Ward RD. 1995. Sugar meal sources for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceara´ State, Brazil. *Med Vet Ent.* 9:263–72
- Carpenter VK, Drake LL, Aguirre SE, Price DP, Rodriguez SD, Hansen IA. 2012. SLC7 amino acid transporters of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* and their role in fat body TOR signaling and reproduction. *J Insect Physiol.* 58(4):513-22.
- Clements, AN. *The Biology of Mosquitoes*. London: Chapman and Hall Press; 1992. 5.3. Nutrition requirements; p. 509.
- da Costa SG; Bates P; Dillon R; Genta FA. 2019. Characterization of α -glucosidases from *Lutzomyia longipalpis* reveals independent hydrolysis systems for plant or blood sugars. *Front. Physiol.* 10:248.
- Dames P, Zimmermann B, Schmidt R, Rein J, Voss M, Schewe B, Walz B, Baumann O. 2006. cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H⁺-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 3926–3931
- De Virgilio, C.; Loewith, R. 2006. The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:1476-81.

Delaporte C, Jean G, Broyer M. 1978. Free plasma and muscle amino acids in uremic children. *Am. J. Clin. Nutr.* v. 31, p.1647-1651.

Dillon, R.J., Lane, R.P., 1993. Blood meal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med Vet Entomol.* 7, 225–232.

Dillon, R.J., El-Kordy, E., 1997. Carbohydrate digestion in sandflies: alfa-glucosidase activity in the midgut of *Phlebotomus langeroni*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 116B, 35–40.

Dodd KM, Tee AR. 2012. Leucine and mTORC1: a complex relationship. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E1329–42.

Duszenko, M.; Ginger, M.L.; Brennand, A.; Gualdrón-López, M.; Colombo, M.I.; Coombs, G.H.; Coppens, I.; Jayabalasingham, B.; Langsley, G.; de Castro, S.L.; Menna-Barreto, R.; Mottram, J.C.; Navarro, M.; Rigden, D.J.; Romano, P.S.; Stoka, V.; Turk, B.; Michels, P.A. 2011. Autophagy in protists. *Autophagy.* 7:127-58.

Evans AM, Aimanova KG, Gill SS. 2009. Characterization of a blood-meal-responsive proton-dependent amino acid transporter in the disease vector, *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* 212: 3263-3271.

Fan, S-J; Goberdhan, DCI. 2018. PATs and SNATs: amino acid sensors in disguise. *Front Pharmacol.* 9: 640

Fingar, D.C.; Blenis, J. 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene.* 23: 3151-71.

Gemetchu T. 1974. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 68: 111–124

Goberdhan DC, Meredith D, Boyd CA, Wilson C. 2005. PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development.* 132: 2365-75.

Gontijo NF, Almeida-Silva S, Williams P, Mares-Guia ML, Melo MN. 1998. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and their relationship with *Leishmania* development. *Exp. Parasitol.* 90: 212-219.

Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F, Kozma SC, Thomas AP, Thomas G. 2008. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab.* 7:456-65.

Gulia-Nuss M, Robertson AE, Brown MR, Strand MR. 2011. Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS One.* 6:e20401.

- Hansen IA, Attardo GM, Park JH, Peng Q, Raikhel AS. 2004. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 10626-10631.
- Hansen IA, Attardo GM, Roy SG, Raikhel AS. 2005. Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. *J Biol Chem.* 280: 20565-72.
- Hansen IA, Boudko DY, Shiao SH, Voronov DA, Meleshkevitch EA, Drake LL, Aguirre SE, Fox JM, Attardo GM, Raikhel AS. 2011. AaCAT1 of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: a novel histidine-specific amino acid transporter from the SLC7 family. *J Biol Chem.* 286: 10803-13.
- Harvey WR 2009a. Voltage coupling of primary H⁺ V-ATPases to secondary Na⁺- or K⁺-dependent transporters. *J. Exp. Biol.* 212: 1620–1629.
- Harvey WR, Boudko DY, Rheault MR, Ockech BA. 2009b. NHE_{VNAT}: an H⁺ V-ATPase electrically coupled to a Na⁺: nutrient amino acid transporter (NAT) forms an Na⁺/H⁺ exchanger (NHE). *J. Exp. Biol.* 212: 347-357.
- Hay N; Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18:1926–1945.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 253(5022):905-9.
- Hirata T, Czapar A, Brin L, Haritonova A, Bondeson DP, Linser P, Cabrero P, Thompson J, Dow JA, Romero MF. 2012. Ion and solute transport by Prestin in *Drosophila* and *Anopheles*. *J Insect Physiol.* 58:563-9.
- Hollomon JM, Grahl N, Willger SD, Koeppen K, Hogan DA. 2016. Global role of cyclic AMP signaling in pH-dependent responses in *Candida albicans*. *mSphere* 1(6):e00283
- Hundal, H.S., Taylor, P.M. 2009. Amino acid transporters: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296, E603-13.
- Iadevaia V, Huo Y, Zhang Z, Foster LJ, Proud CG. 2012. Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis. *Biochem Soc Trans;* 40:168–72.
- Jobling B. 1987. Anatomical drawing of biting flies. London: British Museum (Natural History). 119p.
- Leite AC; Evangelista LG. 2001. Ultrastructure of endocrine cells from the abdominal midgut epithelium of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 38: 749-752
- Kandasamy P ; Gyimesi G ; Kanai ; Hediger MA. 2018. Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends Biochem Sci.* 43:752-789.
- Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology.* 17:279–289

- Killick-Kendrick R; Killick-Kendrick M. 1987. Honeydew of aphids as a source of sugar for *Phlebotomus ariasi*. *Med Vet Ent* 1:297–302.
- Kim J; Guan KL. 2011. Amino acid signaling in TOR activation. *Annu Rev. Biochem.* 80: 1001-32.
- Kimball SR, Jefferson LS. 2010. Control of translation initiation through integration of signals generated by hormones, nutrients, and exercise. *J Biol Chem*; 285:29027–32.
- Kumar S; Stecher G; Li M; Knyaz, C; Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 35, 1547- 1549.
- Lewis D.L., Lechleiter J.D., Kim D., Nanavati C., Clapham D.E. 1990. Intracellular Regulation of Ion Channels in Cell Membranes. *Mayo Clinic Proceedings*, 65:1127-1143.
- Li J.; Kim S.G.; Blenis J. 2014. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.* 19: 373–379
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402- 408.
- Loewith, R.; Jacinto, E.; Wullschlegel, S; Lorberg, A.; Crespo, J.L.; Bonenfant, D.; Oppliger, W.; Jenoe, P.; Hall, MN. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell.* 10:457-68
- Maclean WCJR, Graham GG, Placko R P, Lopez de Romaña G. 1983. Plasma free amino acids in children consuming lupin protein with and without methionine supplementation. *J. Nutr.* 113: 779-785.
- MacVicker JA1, Billingsley PF, Djamgoz MB. 1993. ATPase activity in the midgut of the mosquito, *Anopheles stephensi*: biochemical characterisation of ouabain-sensitive and ouabain-insensitive activities. *J Exp Biol.*174:167-83.
- Martin MM, Lindqvist L. 1975. The pH dependence of fluorescein fluorescence. *J. Lumin.* 10: 381-390.
- Meleshkevitch EA, Robinson M, Popova LB, Miller MM, Harvey WR, Boudko DY. 2009. Cloning and functional expression of the first eukaryotic Na⁺-tryptophan symporter, AgNAT6. *J Exp. Physiol.* 212:1559–1567.
- Miron, M., Lasko, P., Sonenberg, N. 2003. Signaling from Akt to FRAP/TOR targets both 4E-BP and S6K in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 23: 9117–9126.
- Modi GB, Tesh RB. 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 20: 568–569.
- Molyneuax, D. H.; Moore, J.; Maroli, M. 1991. Sugars in sandflies. *Parasitologia* 33: 431–436.
- Morton DB; Hudson ML. 2002. Cyclic GMP regulation and function in insects. *Advances in Insect Physiology*, 1–54.

Murphy L.O; Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B.L., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H.D., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V.E., MacKeigan, J.P., Porter, J.A., Wang, Y.K., Cantley, L.C., Finan, P.M. 2009. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 136: 521–534.

Nakashima, A; Tamanoi, F. 2010. Conservation of the Tsc/Rheb/TORC1/S6K/S6 Signaling in Fission Yeast. *The Enzymes*, 167–187.

Nepomuceno DB, Santos VC, Pereira MH, Araujo, RN, Sant’anna, MRV, Gontijo NF. 2017. pH control in the midgut of *Aedes aegypti* under different nutritional conditions. *J.Exp.Biol.* 220: 3355-3362.

Newton AC; Bootma MD; Scott, JD. 2016. Second Messengers. *Cold Spring Harb Perspect Biol*

Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S.G., Kim, S.Y., Gulati, P., Byfield, M.P., Backer, J.M., Natt, F., Bos, J.L., Zwartkruis, F.J., Thomas, G. 2005. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 14238–14243.

Noriega, F. G., Pennington, J. E., Barillas-Mury, C., Wang, X. Y. and Wells, M. A. 1996. *Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding. *Insect Mol. Biol.* 5, 25-29.

Okech B, Boudko DY, Linser PJ, Harvey WR. 2008. Cationic pathway of pH regulation in larvae of *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 211: 957–968.

Onken H, Moffett DF. 2009. Revisiting the cellular mechanisms of strong luminal alkalization in the anterior midgut of larval mosquitoes. *J. Exp. Biol.* 212: 373–377.

Onken H, Patel M, Javoroncov M, Izeirovski S, Moffett SB, Moffett DF 2009. Strong Alkalization in the Anterior Midgut of Larval Yellow Fever Mosquitoes (*Aedes aegypti*): Involvement of Luminal Na⁺/K⁺ - ATPase. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 311: 155–161.

Pacey, E.K; O’Donnell, MJ. 2014. Transport of H(+) and K(+) across the posterior midgut of blood-fed mosquitoes (*Aedes aegypti*). *J. Insect Physiol.* 61, 42-50.

Park, J.H., Attardo, G.M., Hansen, I.A., Raikhel, A.S. 2006. GATA factor translation is the final downstream step in the amino acid/target-of-rapamycin-mediated vitellogenin gene expression in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem.* 281: 11167–11176.

Patrick, ML; Karlygash, A; Sanders, HR; Gill, SS. 2006. P-type Na⁺/K⁺- ATPase and V-type H⁺-ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* 209, 4638-4651.

Pradhan, RK; Vinnakota, KC; Beard, DA; Dash, RK. 2013. Carrier-Mediated Transport Through Biomembranes. *Transport in Biological Media*, 181–212.

Qin X, Jiang B1, Zhang Y. 2016. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle.* 15:781-6.

- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 856-862.
- Ramalho-Ortigão JM; Pitaluga NA; Telleria EL; Marques C; Souza AA, Traub-Cseko YM. 2007. Cloning and characterization of a V-ATPase subunit C from the American visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* modulated during development and blood ingestion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 509-515
- Rheault MR, Okech BA, Keen SBW, Miller MM, Meleshkevitch EA, Linser PJ, Boudko DY, Harvey WR. 2007. Molecular cloning, phylogeny and localization of AgNHA1: the first Na⁺/H⁺ antiporter (NHA) from a metazoan, *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 210: 3848–3861.
- Robinson, JD. 1983. Kinetic analysis and the reaction mechanism of the Na,K-ATPase. In *Current Topics in Membranes and Transport*, vol. 19 (ed. J. F. Hoffmann and B. Forbush III), pp. 485–512. New York: Academic Press.
- Roos, A; Boron W F. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61: 296-433,1981.
- Roy SG; Hansen IA; Raikhel AS. 2007. Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 37:1317-26
- Roy, S.G.; Raikhel, A.S. 2012. Nutritional and hormonal regulation of the TOR effector 4E-binding protein (4E-BP) in the mosquito *Aedes aegypti*. *The FASEB Journal.* 26:1334-1342.
- Rudin W; Hecker H. 1982. Functional morphology of the midgut of a sandfly as compared to other hematophagous nematocera. *Tissue and Cell* 14:751–758
- Sagné, C; Agulhon, C; Ravassard, P; Darmon, M; Hamon, M; El Mestikawy, S; Gasnier, B; Giros B. 2001. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7206-7211.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4, 406-425.
- Santos VC, Araujo RN, Machado LAD, Pereira MH, Gontijo NF. 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J. Exp. Biol.* 211: 2792-2798.
- Santos VC, Nunes CA, Pereira MH, Gontijo NF. 2011. Mechanisms of pH control in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*: roles for ingested molecules and hormones. *J. Exp. Biol.* 214: 1411–1418.
- Santos VC, Vale VF, Silva SM, Nascimento AAS, Saab NAA, Soares RPP, Michalick MSM, A RN, Pereira MH, Fujiwara, RT, Gontijo, NF. 2014. Host modulation by a parasite: how *Leishmania infantum* modifies the intestinal environment of *Lutzomyia longipalpis* to favor its development. *PLoS ONE* 9(11): e111241.
- Schewe B, Schmälzlin E, Walz B. 2008. Intracellular pH homeostasis and serotonin-induced pH changes in *Calliphora* salivary glands: the contribution of V-ATPase and carbonic anhydrase. *J. Exp. Biol.*: 805–815.

Schiöth HB, Roshanbin S, Hägglund MG, Fredriksson R. 2013. Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects. *Mol Aspects Med.* 34:571-85.

Schmelzle, T.; Hall, M.N. 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 103:253-62.

Soares RP, Turco SJ. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc.* 75(4):441.

Taylor PM. 2014. Role of amino acid transporters in amino acid sensing. *Am J Clin Nutr.* 99:223S-230S.

Thevelein JM, Beullens M, Honshoven F, Hoebeeck G, Detremerie K, den Hollander JA, Jans AW. 1987. Regulation of the cAMP level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: intracellular pH and the effect of membrane depolarizing compounds. *J Gen Microbiol.* 13:2191-6.

Uchida K, Ohmori D, Yamakura F, Suzuki K. 1990. Changes in free amino acid concentration in the hemolymph of the female *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae), after a blood meal. *J Med Entomol.* 27:302-8.

Waller DG; Sampson AP. 2018. Principles of pharmacology and mechanisms of drug action. *Medical Pharmacology and Therapeutics*, 3–31.

WHO. 2017. World Health Organization. Geneva: Leishmaniasis -Fact sheet Updated April. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

Wieczorek H, Putzenlechner M, Zeiske W, Klein U. 1991. A vacuolar-type proton pump energizes K⁺/H⁺ antiport in an animal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266: 15340–15347.

Wieczorek, H., Beyenbach, K.W., Huss, M. and Vitavska, O. 2009. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. *J. Exp. Biol.* 212: 1611-1619.

Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*; 124:471-8.

Young, DC; Duncan, NA. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Ann Entomol Institut*; 54: 1-881

Zhang, H; Stallock, J.P; Ng, J.C; Reinhard, C; Neufeld, T.P. 2000. Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev.* 14: 2712–2724.

Zimmermann B, Dames P, Walz B, Baumann O 2003. Distribution and serotonin-induced activation of vacuolar-type H⁺-ATPase in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J. Exp. Biol.*: 1867–1876.

Zuckerandl, E., Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol.* 8, 357-366.