



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**



**Ação de anticoagulantes na atividade enzimática de proteases e carboidrases do  
intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)  
e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

**Tarcísio de Freitas Milagres**

**Belo Horizonte – MG**

**2019**

**Tarcísio de Freitas Milagres**

**Ação de anticoagulantes na atividade enzimática de proteases e carboidrases do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

Dissertação 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 Mestre em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna  
Coorientador: Prof. Dr. Nelder Figueiredo Gontijo

**Belo Horizonte – MG**

**2019**

- 043 Milagres, Tarcísio de Freitas.  
Ação de anticoagulantes na atividade enzimática de proteases e carboidrases do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) [manuscrito] / Tarcísio de Freitas Milagres. - 2019.  
69 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna. Coorientador: Prof. Dr. Nelder Figueiredo Gontijo.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Aedes. 2. *Lutzomyia longipalpis* - Teses. 3. Psychodidae. 4. Dípteros. 5. Anticoagulantes. 6. Digestão. I. Sant'Anna, Maurício Roberto Viana. II. Gontijo, Nelder Figueiredo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



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

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO - NÚMERO: 400/2019**

**TÍTULO: "AÇÃO DE ANTICOAGULANTES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES E CARBOIDRASES DO INTESTINO MÉDIO DE LUTZOMYIA LONGIPALPIS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) E AEDES AEGYPTI (DIPTERA: CULICIDAE)"**

**ALUNO: TARCISIO DE FREITAS MILAGRES**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENTOMOLOGIA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **vinte e nove de março de 2019**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Vladimir Fazito do vale**

FIOCRUZ - MG

**Daniella Castanheira Bartholomeu**

UFMG

**Nelder de Figueiredo Gontijo - Coorientador**

UFMG

**Mauricio Roberto Viana Sant'Anna- Orientador**

UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 08/09/2022, às 10:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1743191** e o código CRC **B3B69B63**.

**“O importante é o que importa. O resto é secundário” – Seu Neldi**

Trabalho realizado no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Aos meus mais que amados pais, Antônio e Graça, que nunca mediram esforços para  
a minha realização.*

*Ao meu querido irmão André, agora futuro papai!*

*Aos meus alicerces em toda essa trajetória pessoal/profissional, Jozi e Andrey. São  
meu porto seguro nessa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Ricardo Toshio Fujiwara, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, que, mesmo antes de ser aluno da instituição, me acolheu e aconselhou com carinho e respeito.

Aos meus colegas de classe, principalmente os do “motim”. Cheios de polêmicas, afeto, e muitos causos pra contar, tornaram minha caminhada na UFMG muito mais viva.

À Sibeles e a Sumara, secretárias do programa, que do começo ao fim dessa trajetória, seguraram as minhas mãos e não soltaram mais.

À todos meus colegas do LFIH que dividiram comigo, sem egoísmos, seus conhecimentos e sabedorias, me auxiliando em meu trabalho (e às vezes fora dele) sempre que precisei.

Ao César Nonato, técnico mais multitarefas e competente que conheci, além de ser a pessoa mais politizada desse ICB.

Ao Maurício, meu orientador, que me acolheu não só como seu aluno, mas também como pessoa. Sem dúvida se tornou um grande parceiro. Muita gratidão envolvida!

Ao Nelder, meu petralha favorito no mundo. Grande ser humano, dono de um coração gigante! Ah, se eu tivesse metade da sua sabedoria... uma verdadeira honra ser seu orientado.

À todos os professores de LFIH que participaram direta ou indiretamente desse trabalho.

Aos melhores amigos que alguém pode ter no mundo: Thaysa, Camila, Mirray, e Helena. Não teria conseguido sem o amor de vocês.

Aos amigos do CBAV, em especial ao Renato e a Pops. Verdadeiras forças que me inspiram como profissional.

Ao Paulo Marcos da Matta Guedes, coordenador do Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária-UFRN, que me aceitou como aluno especial nas disciplinas de “Parasitologia e Campo” e “Parasitologia e Comunidade”. Minhas maiores notas e um dos maiores orgulhos desse mestrado.

Aos meus estimados colegas da UFLA, que continuam me inspirando, ainda que distantes.

À todos os meus familiares e amigos que torceram por mim nessa trajetória.

À UFMG pela formação profissional.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por espécies de protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, sendo transmitidos aos seus hospedeiros vertebrados por insetos denominados flebotomíneos. *Leishmania infantum*, o agente etiológico da leishmaniose visceral, é transmitida aos hospedeiros vertebrados no novo mundo através da picada de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). O *Aedes aegypti*, espécie pertencente à ordem Diptera, família Culicidae, é uma espécie cosmopolita e apresenta hábito extremamente adaptado aos ambientes urbano e doméstico, sendo o vetor urbano de arboviroses como Dengue, Chikungunya, Zika e febre amarela. Para um melhor entendimento da fisiologia digestiva de insetos vetores, alimentações artificiais contendo fármacos que possam manipular sua fisiologia digestiva são corriqueiramente utilizadas. Uma vez que o sangue é retirado do hospedeiro vertebrado e administrado via alimentador artificial, a adição de anticoagulantes se faz necessária. O presente estudo tenta desvendar a possível interferência que anticoagulantes possam ter na atividade de proteases e glicosidases intestinais de dois vetores de suma importância na transmissão de parasitoses e arboviroses a seres humanos: *L. longipalpis* e *A. aegypti*. A atividade intestinal das enzimas  $\alpha$ -glicosidase, aminopeptidase, tripsina, e N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase foram avaliadas na presença dos anticoagulantes heparina nas concentrações de 2U e 150U, citrato de sódio, e EDTA. Observamos que a utilização de heparina na concentração de 2U/mL resultou em uma atividade de  $\alpha$ -glicosidase com perfil de atividade enzimática mais uniforme, sugerindo este ser o anticoagulante de escolha para o seu estudo em *L. longipalpis*. O EDTA parece ser a melhor escolha para o estudo da atividade de  $\alpha$ -glicosidase intestinal de *A. aegypti*, uma vez que o perfil enzimático observado para este coagulante se assemelha ao perfil observado para insetos alimentados em hospedeiro humano, assim como o citrato de sódio e heparina (2U/mL) são os anticoagulantes de escolha para o estudo da atividade de hexosaminidase intestinal de *L. longipalpis*. Em relação a atividade de hexosaminidase intestinal de *A. aegypti*, a escolha de um anticoagulante parece não ter influencia na atividade enzimática. A heparina (2U/mL) é o anticoagulante de escolha para o estudo da atividade de aminopeptidase intestinal de *L. longipalpis* e *A. aegypti*. A escolha do anticoagulante causou um grande impacto na atividade tripsinolítica intestinal de *L. longipalpis*, sendo que heparina (nas concentrações de 2U/mL e 150U/mL) é o anticoagulante de escolha para estudo desta atividade nesta espécie de flebotomíneo. Vimos também que citrato de sódio e EDTA são os anticoagulantes de escolha para o estudo da atividade tripsinolítica intestinal de *A. aegypti*. Concluimos que a escolha correta de um anticoagulante é fundamental para o estudo da atividade de proteases intestinais de insetos nematóceros hematófagos. O estudo da influência de anticoagulantes em experimentos de atividade enzimática intestinal de insetos hematófagos torna-se importante para que conclusões experimentais não sejam mascaradas pela influência direta da ação de um anticoagulante na fisiologia intestinal.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aedes aegypti*, *Lutzomyia longipalpis*, Anticoagulantes, enzimas digestivas, alimentação artificial.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, being transmitted to their vertebrate hosts by minute insects called sand flies. *Leishmania infantum*, the etiologic agent of visceral leishmaniasis in the Americas, is transmitted to vertebrate hosts in the New World through the bites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) females. *Aedes aegypti*, a mosquito species belonging to the order Diptera, family Culicidae, is a cosmopolitan species that is extremely adapted to urban and domestic environments, being the urban vector of arboviruses such as Dengue, Chikungunya, Zika and yellow fever. For a better understanding of the digestive physiology of insect vectors, artificial feeds containing drugs that can manipulate their digestive physiology are commonly used. Once blood is withdrawn from the vertebrate host and administered via an artificial feed, the addition of anticoagulants is crucial. The present study tries to understand the possible interference that anticoagulants may have on intestinal protease and glycosidase activities of two vectors of high importance in the transmission of protozoans and arboviruses to humans: *L. longipalpis* and *A. aegypti*. The intestinal activity of  $\alpha$ -glucosidase, aminopeptidase, trypsin, and N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase enzymes were evaluated in the presence of heparin at concentrations of 2U and 150U/mL, sodium citrate, and EDTA. We observed that the use of 2U/mL heparin in an artificial blood feed to *L. longipalpis* resulted in a more uniform  $\alpha$ -glycosidase activity profile, suggesting that heparin is the anticoagulant of choice to study  $\alpha$ -glycosidase activity in *L. longipalpis*. EDTA seems to be the best anticoagulant choice to study *A. aegypti* intestinal  $\alpha$ -glycosidase activity as the enzymatic profile observed for this coagulant resembles the profile observed for insects fed on a human host. Sodium citrate and heparin (2U / mL) are the anticoagulants of choice for the study of intestinal hexosaminidase activity of *L. longipalpis*. Regarding intestinal hexosaminidase activity of female *A. aegypti*, the choice of an anticoagulant seems to have no influence on the enzymatic activity. Heparin (2U / mL) is the anticoagulant of choice for the study of intestinal aminopeptidase activity of *L. longipalpis* and *A. aegypti*. The choice of anticoagulant had a great impact on the *L. longipalpis* intestinal trypsinolytic activity, with heparin (at the concentrations of 2U/mL and 150U/mL) being the anticoagulant of choice for the study of trypsin activity in this phlebotomine species. We have also seen that sodium citrate and EDTA are the anticoagulants of choice for the study of *A. aegypti* intestinal trypsinolytic activity. We conclude that the correct choice of an anticoagulant during artificial feeds is crucial for the study of intestinal protease activity in haematophagous insects. The wrong choice of an anticoagulant could mask the results and have a direct influence on the intestinal physiology of these insects or in experiments investigating vector-pathogen interaction within the gut of haematophagous arthropods.

**KEY WORDS:** *Aedes aegypti*, *Lutzomyia longipalpis*, Anticoagulants, digestive enzymes, artificial feed.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

LV – Leishmaniose Visceral

M – Molar

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mg – Miligrama

nm – Nanômetro

µL – Microlitro

MS – Ministério da Saúde

PBS – Solução salina fosfatada

pH – potencial de hidrogênio

PSG – Promastigote Secretory Gel

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

RCF – Relative Centrifugal Force (Força Centrífuga Relativa)

U – Unidade

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO – World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo Holometábolo de insetos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae.....	14
<b>Figura 2:</b> Situação da Leishmaniose Visceral mundo.....	16
<b>Figura 3:</b> Ciclo Holometábolo do <i>Aedes aegypti</i> .....	17
<b>Figura 4:</b> Faixa de susceptibilidade dos países do mundo à ocorrência para os mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .....	19
<b>Figura 5:</b> Compartimentalização do tubo digestivo de insetos hematófagos.....	20
<b>Figura 6:</b> Aparelho Hemotek utilizado em alimentações artificiais de insetos hematófagos.....	25
<b>Figura 7:</b> Atividade de $\alpha$ -glicosidase em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	33
<b>Figura 8:</b> Atividade de hexosaminidase em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os anticoagulantes citrato de sódio, EDTA e heparina.....	35
<b>Figura 10:</b> Atividade tripsinolítica no intestino de <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	37
<b>Figura 11:</b> Atividade de $\alpha$ -glicosidase em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	39
<b>Figura 12:</b> Atividade de hexosaminidase em <i>A. aegypti</i> frente aos anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	41
<b>Figura 13:</b> Atividade de aminopeptidase em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	43
<b>Figura 14:</b> Atividade de tripsina em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	45
<b>FIGURA 15:</b> ATIVIDADE DE tripsina em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	47
<b>FIGURA 16:</b> ATIVIDADE DE hexosaminidase em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO .....	49

FIGURA 17: ATIVIDADE DE aminopeptidase em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	50
FIGURA 18: ATIVIDADE DE $\alpha$ -glicosidase em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	52
FIGURA 19: ATIVIDADE DE tripsina em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	54
FIGURA 20: ATIVIDADE DE tripsina em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	56
FIGURA 21: ATIVIDADE DE aminopeptidase em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	58
FIGURA 22: ATIVIDADE DE $\alpha$ -glicosidase em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	60

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	O vetor <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	13
1.1.2	Epidemiologia de Leishmaniose Visceral.....	15
1.2	O Vetor <i>Aedes aegypti</i> .....	16
1.2.1	Importância epidemiológica de <i>A. aegypti</i> .....	17
1.3	Hematofagia, enzimas digestivas e fatores determinantes para a digestão do sangue.....	19
1.4	Alimentação artificial e os anticoagulantes.....	23
2	JUSTIFICATIVA.....	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	Origem dos insetos utilizados.....	27
4.1.1	Origem e criação dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .....	27
4.1.2	Origem e criação dos Flebotomíneos.....	27
4.2	Atividade das enzimas $\alpha$ -glicosidase, hexosaminidase, aminopeptidase e tripsina após a utilização dos anticoagulantes heparina, citrato de sódio, EDTA.....	27
4.2.1	Preparação da amostra.....	28
4.2.2	Atividade intestinal de $\alpha$ -glicosidase.....	28
4.2.3	Atividade intestinal de Aminopeptidase.....	28
4.2.4	Atividade intestinal de Tripsina.....	29
4.2.5	Atividade intestinal de N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase.....	29
4.2.6	Análise estatística.....	30
5	RESULTADOS.....	31
5.1	ATIVIDADE DE $\alpha$ -glicosidase no intestino de <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	

5.2 ATIVIDADE DE hexosaminidase em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	33
5.3 ATIVIDADE DE aminopeptidase em <i>L. longipalpis</i> FRENTE AOS ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	35
5.4 ATIVIDADE DE tripsina em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	37
5.5 ATIVIDADE DE $\alpha$ -glicosidase em <i>Aedes aegypti</i> FRENTE AOS ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	39
5.6 ATIVIDADE DE hexosaminidase em <i>Aedes aegypti</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	41
5.7 ATIVIDADE DE aminopeptidase em <i>Aedes aegypti</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	43
5.8 ATIVIDADE DE tripsina em <i>Aedes aegypti</i> utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.....	45
5.9 ATIVIDADE DE tripsina em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO....	47
5.10 ATIVIDADE DE hexosaminidase em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	49
5.11 ATIVIDADE DE aminopeptidase em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	51
5.12 ATIVIDADE DE $\alpha$ -glicosidase em <i>L. longipalpis</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	53
5.13 ATIVIDADE DE tripsina em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO....	55
5.14 ATIVIDADE DE hexosaminidase em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	57
5.15 ATIVIDADE DE aminopeptidase em <i>A. aegypti</i> utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO.....	59

5.16 ATIVIDADE DE  $\alpha$ -glicosidase em *A. aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO

6 DISCUSSÃO.....	61
7 PERSPECTIVAS.....	62
8 CONCLUSÕES.....	63
9 REFERÊNCIAS.....	64

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O vetor *Lutzomyia longipalpis*

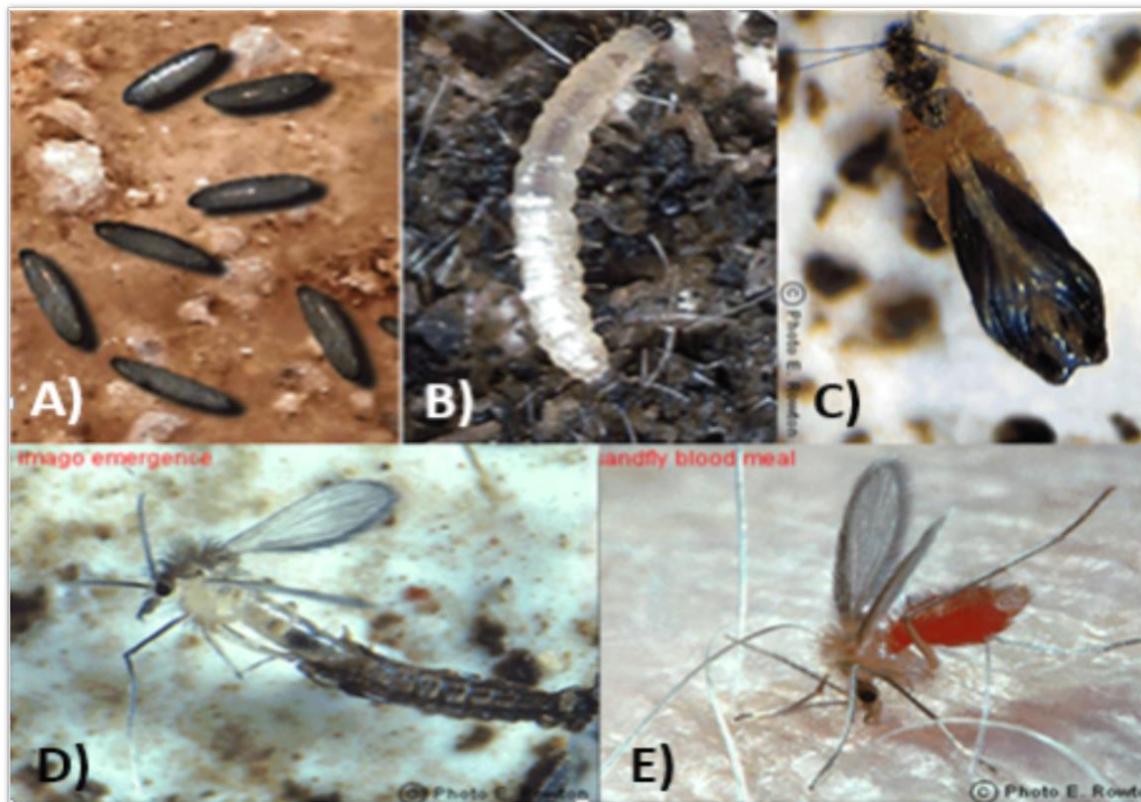
No Brasil, a transmissão de *Leishmania infantum*, principal agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) se dá pela picada de fêmeas de insetos dípteros pertencentes à família Psychodidae, tendo como principal vetor *Lutzomyia (L.) longipalpis*. Mais recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi também incriminada como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul (Gallati et al., 1997).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, com seu ciclo de vida envolvendo uma fase de ovo, quatro estágios larvários, seguindo de pupa e o estágio final de adulto alado (Monteiro, 2012), (Figura 1). A postura de ovos é realizada em micro-habitats terrestres, ricos em matéria orgânica (Alexander, 2000), possuem forma elipsoide, de cor negra, medindo de 300 a 500 micrometros de comprimento por 70 a 150 micrometros de largura (Ferro et al., 1998; Brazil & Brazil, 2003). Cada fêmea adulta de flebotomíneos é capaz de realizar uma postura de dois a 80 ovos, com média em 28 ovos por fêmea (Morales et al., 2005), e levam em média oito dias e meio para eclodirem (Ferro et al., 1998).

As larvas são cobertas de cerdas, esbranquiçadas e de aspecto vermiforme. As formas imaturas têm habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal (Aguiar & Medeiros, 2003). Seu corpo é dividido em cabeça, três seguimentos torácicos e nove seguimentos abdominais. A cabeça é recoberta de espinhos, possui um par de antenas e as peças bucais são do tipo mastigador. O tórax, apesar de menos desenvolvido, é recoberto por cerdas, o que pode ser utilizado para identificação da espécie. Os dois últimos segmentos do abdômen são diferenciados dos demais, possuindo falsas patas abdominais que se dedicam à locomoção. É também no último segmento, que existem estruturas responsáveis pela fixação da larva no momento da muda (Leite & Williams, 1997). São de pequenas e ativas, dificultando o seu encontro, ainda que no ambiente haja grande quantidade de adultos (Brazil; Brazil, 2003). A pupa possui tonalidade branco-amarelado, é dividida em cefalotórax e abdômen, fica aderida a um substrato endurecido até o momento da eclosão após uma média de 15 dias (Ferro et al., 1998), quando sua coloração assume um tom mais escuro (Brazil & Brazil, 2003).

Os adultos são amarelados (cor de palha), pequenos, com cerca de 2,5 mm de comprimento. As pernas são longas e delgadas, possuem voo saltitante e de curto alcance. As asa são hialinas e densamente revestidas de cerdas longas. Quando o animal está em repouso, elas se mantêm eretas, em posição de “asa delta”. Durante o dia, o inseto abriga-se em locais onde possa proteger-se das mudanças bruscas que ocorrem no meio ambiente, que o afeta devido a sua superfície corporal, que apresenta um revestimento quitinoso delgado (Aguiar et al., 1987). A umidade é o fator determinante à manutenção destes insetos em abrigos, como troncos de árvores, tocas de tatu, folhas caídas no solo,

grutas, fendas nas rochas, anexos de animais domésticos e até paredes externas e internas de domicílio, que possuem as condições adequadas (Aguiar & Medeiros, 2003).



**Figura 1 :Ciclo Holometábolo de insetos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. A) Ovos; B) Larva; C) Pupa; D) Adulto emergindo; E) Adulto.**

Os adultos diferem dos demais dípteros da família Psychodidae, por possuírem corpo mais delgado e pernas mais longas e delgadas. Os adultos de uma mesma espécie, apresentam dimorfismo sexual e diferem-se também pelo hábito alimentar. Tanto as fêmeas como os machos se alimentam de fontes de açúcar para produzir energia e manter a homeostasia (Azevedo et al., 2011), no entanto as fêmeas também necessitam de sangue na alimentação, para possibilitar a maturação de seus ovos (Monteiro, 2012). Morfologicamente, as principais diferenças entre sexo estão nos últimos segmentos abdominais, que são modificados para constituir a genitália, e nas probóscides, em que a fêmea à possui longa e adaptada para picar e sugar (Brazil & Brazil, 2003).

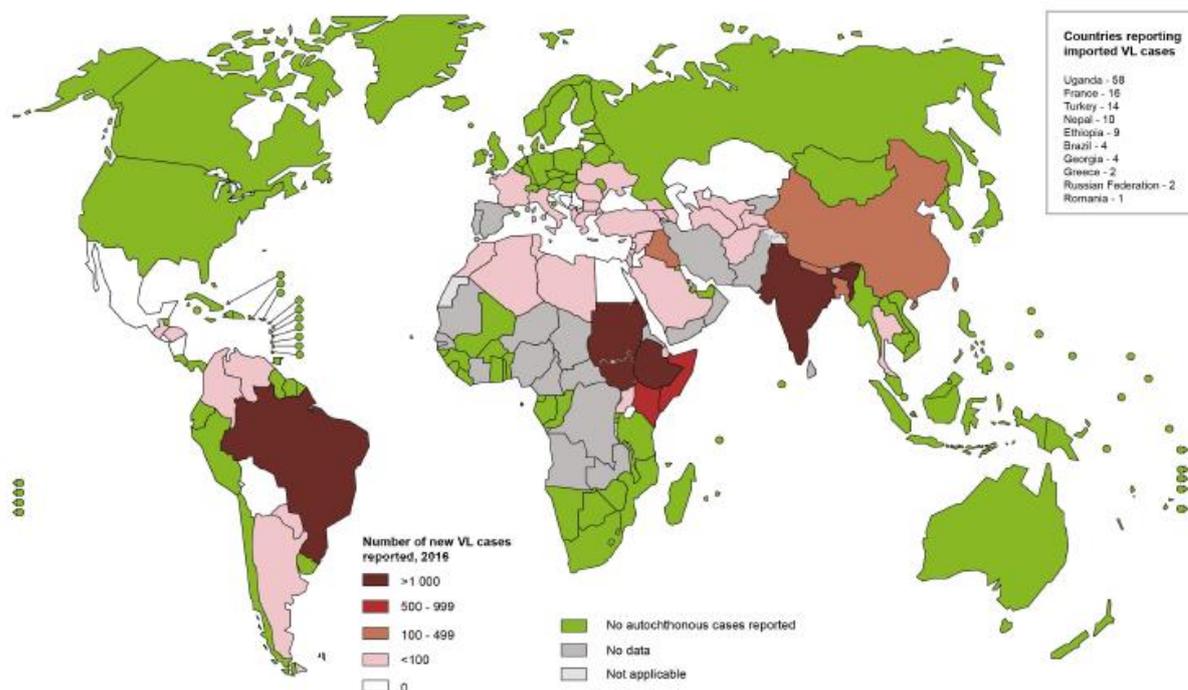
Com relação à dispersão, de acordo com Chianots et al., 1974, o alcance de flebotomíneos é pequeno, limitando-se a 200 metros ou menos. A densidade populacional sofre grande interferência pela variação das estações do ano (Oliveira et al., 2003; Andrade, 2010). Em áreas tropicais, a densidade populacional de flebotomíneos aumenta durante ou após períodos chuvosos, pois é a alta umidade resultante das primeiras chuvas que proporciona a eclosão das pupas e maior atividade destes insetos fora de seus abrigos (Almeida et al., 2010). Usualmente se registra uma redução populacional durante longos

períodos secos (Tesh, 1988), resultando um complexo dependente de fatores bióticos, físicos e ambiental (Lewis, 1974). De acordo com Killick-kendrick (1990a, 1990b, os flebotomíneos são os vetores de parasitos do gênero *Leishmania* no mundo, embora algumas espécies de *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Mundinia* sejam transmitidas a hospedeiros invertebrados por dípteros ceratopogonídeos (Dougall et al., 2011; Seblova et al., 2015; Cotton, 2017).

### 1.1.2 Epidemiologia de Leishmaniose Visceral

Existem duas formas clínicas principais das leishmanioses: a leishmaniose tegumentar (LT), que é subdividida em: forma cutânea, muco-cutânea, cutâneodifusa e disseminada, e a leishmaniose visceral (LV). A LV, também chamada de calazar, é a de maior relevância, pois apresenta alta morbidade e alta letalidade, especialmente entre crianças e pessoas imunocomprometidas. (Desjeus, 2004). Estima-se que ocorram, anualmente, de 700 mil a 1 milhão de novos casos de leishmanioses, e de 20 mil a 30 mil novos óbitos (OMS, 2017). No entanto, o número de casos relatados é bem menor, devido ao fato dessas doenças serem extremamente subnotificadas (Alvar et al., 2012; Maia-Elkhoury et al., 2007).

Mais de 90% dos casos de LV estão concentrados em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (Mondal, 2012; Abubakar et al., 2014; OMS, 2014), (Figura 2). As leishmanioses são causadas por diversas espécies de *Leishmania* (Killick-kendrick, 1990). Na América do Sul, a LV é uma zoonose causada pela espécie *Leishmania infantum* e que tem o cão como seu principal reservatório no ambiente urbano. A LV é responsável por elevada morbidade e mortalidade caso não seja diagnosticada e tratada precocemente; é considerada a segunda maior causa de mortes por doenças parasitárias no mundo, atrás apenas da malária (Alvar et al., 2013).



**Figura 2 – Situação da Leishmaniose Visceral no mundo. Cores mais escuras correspondem a um maior número de casos novos da doença naquele país. Fonte: OMS, 2016.**

Apesar dos esforços no controle de vetores e reservatórios, a doença encontra-se em rápida expansão, por isso representa uma ameaça para a população e preocupa as autoridades sanitárias. Embora tenham sido investidos recursos e estabelecidas rotinas para o tratamento específico da leishmaniose visceral, estas medidas não têm sido suficientes, uma vez que o país vem registrando um aumento na incidência e na letalidade em diversas regiões (Leite e Araújo, 2013).

## 1.2 O Vetor *Aedes aegypti*

O *A. aegypti* é um inseto díptero, pertencente à Família Culicidae. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas, sendo as fêmeas hematófagas (Consoli et al., 1998). O mosquito se desenvolve através de metamorfose completa, e o ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, larva (L1, L2, L3, e L4), pupa e adulto e que apresenta hábito extremamente adaptado aos ambientes urbano e doméstico, sendo considerado um mosquito diurno (Natal 2002). Os criadouros preferenciais são aqueles que acumulam água limpa, pobres em matéria orgânica, sombreados, com fundos e paredes escuras. A fêmea adulta de *A. aegypti* seleciona o local de oviposição influenciada pela luz, pela cor do recipiente, pela temperatura, pelo grau de salinidade e por outras características favoráveis (Vianna, 2001).

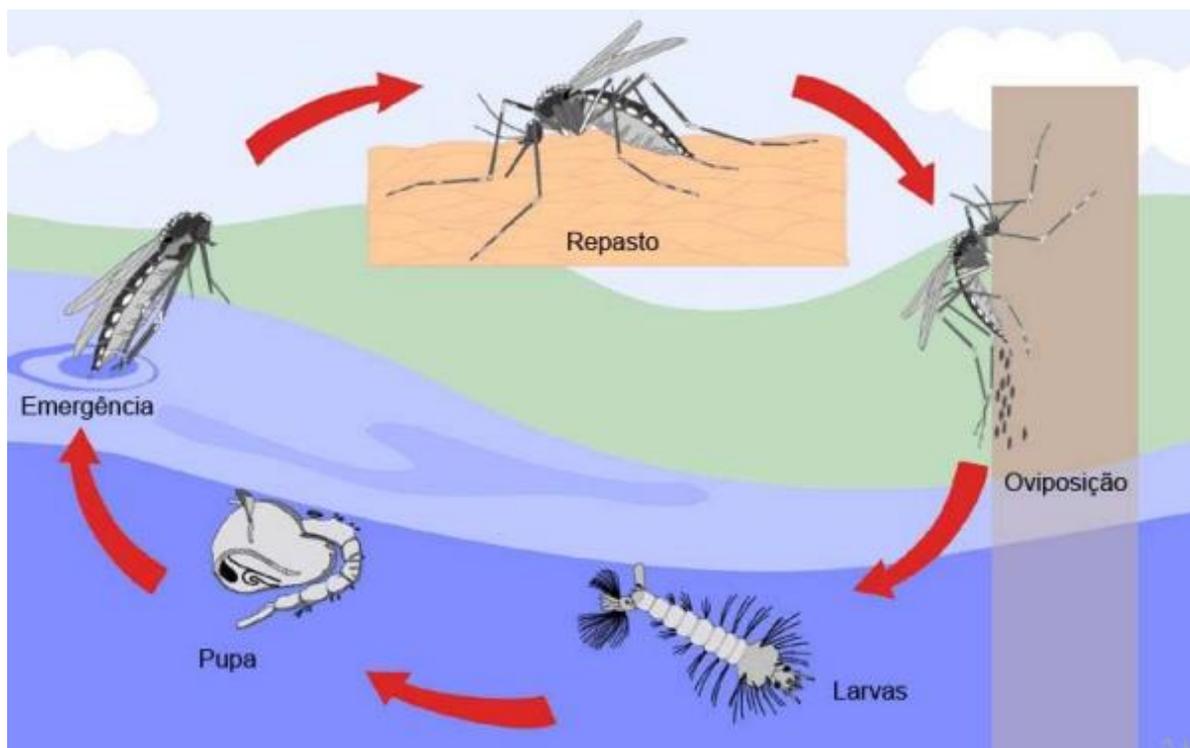


Figura 3: Ciclo Holometábolo do *Aedes aegypti*. Fonte: Instituto Oswaldo Cruz (2010).

Ambos, fêmeas e machos, possuem o tempo médio de vida de 45 dias e nutrem-se de carboidratos encontrados em seiva de flores e frutas, porém apenas a fêmea é hematófaga, sendo nutrientes do sangue armazenados como reservas nutricionais (Naksathit et al., 1999), usados em outros processos metabólicos (Zhou et al., 2004), ou usados para a produção de ovos (Ziegler e Ibrahim, 2001). O sangue animal é rico em proteínas e sua digestão é principalmente facilitada por proteases, proteínas, particularmente tripsinas (Barillas-Mury et al., 1995; Noriega et al., 1994; Noriega et al., 2001). Uma alta porcentagem de aminoácidos derivados de sangue é enviada para o corpo gorduroso onde são usados para produzir as proteínas precursoras de vitelogenina que desempenham um papel crítico na vitelogênese (Attardo et al., 2005; Raikhel et al., 2002). Componentes sanguíneos não digeridos e compostos potencialmente prejudiciais que contêm amônia ou ferro são metabolizados, desintoxicados e, em seguida, excretados (Graca Souza et al., 2006).

### 1.2.1 Importância epidemiológica de *A. aegypti*

A alimentação de sangue pelo *Aedes aegypti* é essencial para a sua reprodução, mas também permite que o mosquito atue como vetor para patógenos humanos importantes, sendo esse inseto o principal vetor urbano de Febre Amarela, sendo também o vetor primário de arbovírus que causam a Dengue, Chikungunya e Zika (Gloria-Soria et al. 2016). O intestino médio durante a digestão do sangue é um importante local de

interação entre o mosquito e os vírus que o mesmo transmite, uma vez que este órgão é o primeiro ponto de contato entre os vírus e o inseto vetor.

A dengue é uma doença infecciosa, febril e aguda, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae* chamado de vírus dengue (DENV) (Brasil, 2010). A importância da dengue para a saúde pública é amplamente conhecida, dada a sua grande magnitude epidemiológica e amplitude demográfica, que levam a grandes epidemias em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Barbosa; Lourenço, 2010). A febre alta acompanhada de dores de cabeça, dores por todo o corpo, seja nos músculos ou nas articulações, fraqueza, além da possível perda de peso, náuseas, vômitos ocasionais, erupção e coceira na pele, são os principais sintomas (Guerdan 2010). DENV-1, 2, 3, e 4 são os 4 sorotipos mais conhecidos do vírus causador da dengue. Entretanto, recentemente, um novo sorotipo foi identificado, o DENV-5 (MUSTAFA et al., 2014). A cepa, o sorotipo do vírus infectante, o estado imunológico, idade e antecedentes genéticos e humorais do hospedeiro humano e a ocorrência de infecções secundárias por outros sorotipos são fatores que influenciam diretamente na ocorrência da forma grave da doença (Simmons et al., 2012).

A chikungunya é uma doença febril aguda ocasionada por um arbovírus do gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*. Indivíduos infectados pelo vírus apresentam sintomas clássicos, como febre alta, erupção cutânea e poliartralgia. (Powers; Logue, 2007; Staples et al., 2009). Após o aparecimento da febre, grande parte dos doentes desenvolve dores intensas e debilitantes nas articulações, geralmente simétricas e atingindo mais comumente dedos, punhos, cotovelos, joelhos e tornozelos, que podem durar de semanas a meses. Outros sintomas comumente relatados incluem cefaleia, fotofobia, náuseas, vômitos, fraqueza e mialgias.

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae*. Os sintomas são semelhantes aos da dengue, mas geralmente menos graves. As manifestações clínicas incluem o exantema macopapular no rosto, tronco e membros. Infectados também podem desenvolver dor de cabeça, mal-estar, febre transitória e dores no corpo. Outras manifestações incluem anorexia, diarreia, constipação, dor abdominal, tonturas, prurido, conjuntivite e artralgia (Hayes, 2009). A infecção por ZIKV tem sido associada a desordens com acometimentos neurológicos em pessoas infectadas e a casos de microcefalia em bebês cujas mães foram acometidas pelo vírus durante a gestação, em especial no primeiro trimestre (OPAS/OMS, 2016).

O *A. aegypti* está distribuído pelos cinco continentes (Kraemer et al. 2015) e no Brasil está presente nos vinte e sete estados da Federação, distribuído em aproximadamente 4.523 municípios (Zara et al. 2016). Por ser uma espécie de mosquito cosmopolita, antropofílica e susceptível aos vírus supracitados, esta espécie de mosquito constitui-se em um dos mais importantes insetos vetores de arboviroses urbanas no mundo.

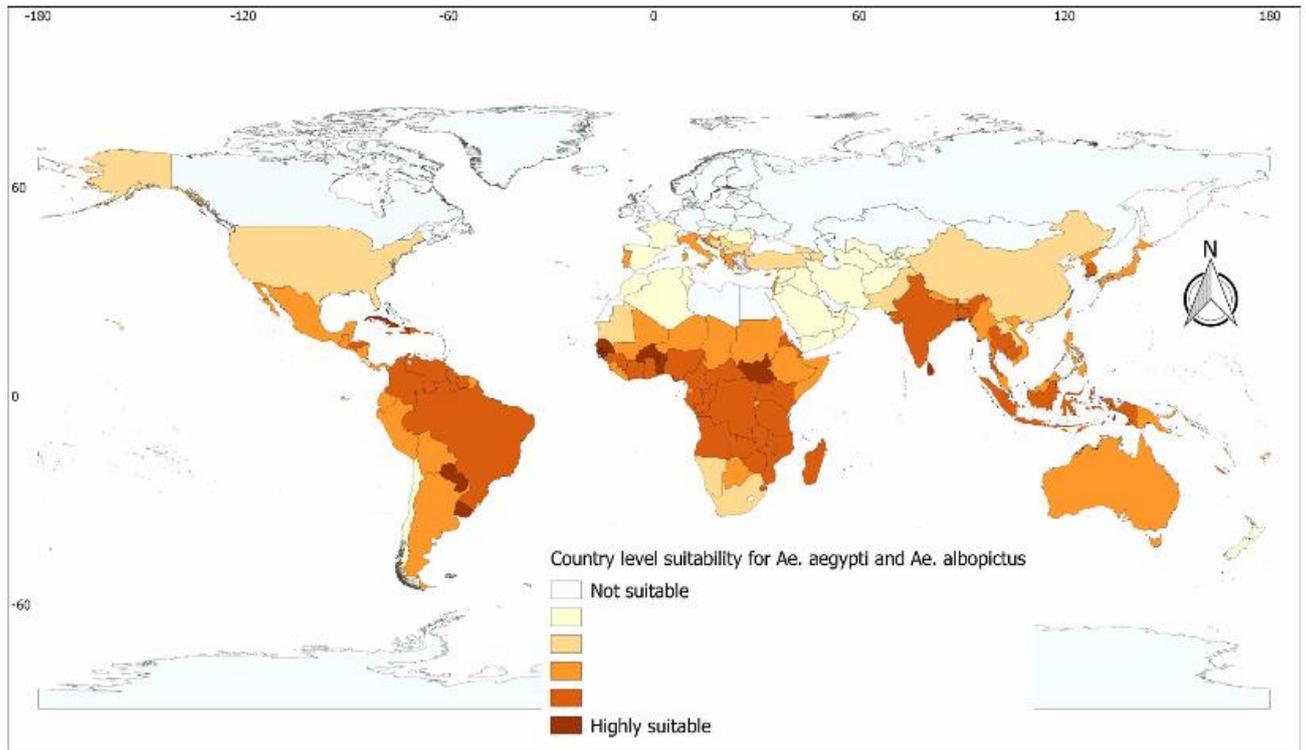


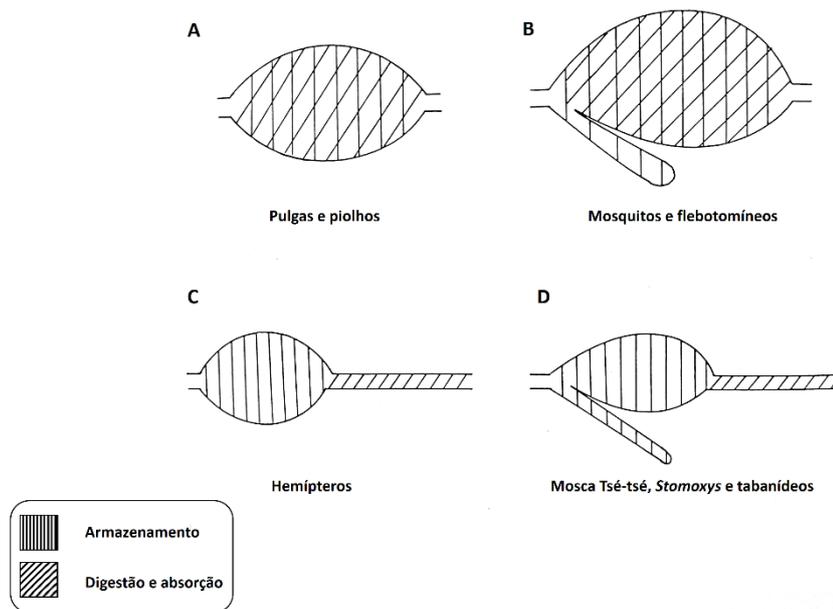
Figura 4: Faixa de susceptibilidade dos países do mundo à ocorrência para os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*: a susceptibilidade varia de 0 (branco) a 100% (marrom escuro). Adaptado de Leta, S (2018).

### 1.3 Hematofagia, enzimas digestivas e fatores determinantes para a digestão do sangue

A hematofagia surgiu independentemente por várias vezes ao longo da evolução dos artrópodes (Ribeiro, 1995). A adaptação a este novo modo de alimentação constituiu em um processo complexo, envolvendo modificações significativa nestes artrópodes, como por exemplo alterações nas peças bucais para melhor acesso a vasos sanguíneos na pele dos hospedeiros vertebrados (Peres-Silva et al., 2012), glândulas salivares expressando moléculas que atuam contra a hemostasia do hospedeiro (vasoconstrição, coagulação, agregação plaquetária e reações inflamatórias locais)(Ribeiro, 1987; 1995) e modificações no intestino médio para neutralizar lesões causadas pelas reações imunológicas em decorrência de moléculas presentes no sangue, bem como modificações para otimizar a digestão e absorção de nutrientes (Khattab et al., 2015; Ribeiro, 1996; Stark & James, 1996). Ao adquirir este modo de alimentação, artrópodes também passaram a entrar em contato com agentes patógenos, funcionando como vetores dos mesmos a hospedeiros vertebrados (Peres-Silva et al., 2012).

O sangue é um alimento rico em nutrientes, constituído por proteínas, em sua maioria por células vermelhas (80%), além de albumina e imunoglobulinas (Wicher & Fries, 2006). A digestão do sangue resulta na liberação de peptídeos, aminoácidos e

grande quantidade de heme, que é o grupamento não protéico da molécula de hemoglobina presente nas hemácias (Peres-Silva et al., 2012). A digestão do sangue e absorção de nutrientes ocorre em diferentes compartimentos de acordo com grupos diferentes de insetos hematófagos. Alguns insetos armazenam o sangue em um compartimento do intestino antes de transportá-lo para ser digerido em um outro compartimento deste órgão. Na mosca tsé-tsé e triatomíneos, o sangue é armazenado no intestino médio, sendo digerido no intestino posterior. Já em outros grupos como pulgas, piolhos, mosquitos e flebotomíneos, o sangue é armazenado e digerido no intestino médio destes insetos (Lehane, 1991)(Figura 5).



**Figura 5: Compartimentalização do tubo digestivo de insetos hematófagos.** O trato digestivo de insetos hematófagos podem ser dividido em dois tipos: tubo contínuo (A e C) ou tubo com a presença de divertículos (B e D). Insetos hematófagos também podem ser divididos em categorias de acordo com a metodologia de absorção e digestão do repasto sanguíneo. Os insetos de digestão em lote (“batch processors”) começam a digestão à partir da entrada do sangue sobre o bolo alimentar (A e B) e os de digestão contínua, com partes de intestino estocando o sangue e transmitindo partes do mesmo para uma outra região onde acontece a digestão e absorção (C e D). Adaptado de Lehane, 1991.

O sangue ingerido é envolto por uma matriz acelular que é secretada pelas células do intestino e que separa o bolo alimentar da camada unicelular deste órgão (Billingsley & Lehane, 1996). A mesma é constituída por mucopolissacarídeos, principalmente quitina, e tem como função a proteção das células intestinais da proliferação bacteriana que ocorre no bolo alimentar, bem como proteger os enterócitos da abrasividade da digestão (Lehane, 1991). Este tipo de membrana peritrófica do tipo 1 está ausente em insetos não alimentados de sangue e é produzida pelo intestino depois da ingestão do mesmo, sendo observada em insetos como flebotomíneos, mosquitos, ceratopogonídeos e tabanídeos. O outro tipo de matriz peritrófica (tipo 2) é constantemente produzida continuamente pelo proventrículo e formam um cilindro cobrindo o intestino de insetos alimentados e não alimentados, estando presente em grupos de insetos como dipteros da família Muscidae, Hippoboscidae e mosca tsé-sté. A matriz peritrófica é uma malha semi-permeável que permite o trânsito de enzimas digestivas e peptídeos (Billingsley & Lehane, 1996).

Como o sangue de vertebrados é constituído principalmente de proteínas, proteases são importantes na digestão sanguínea. A maioria dos insetos hematófagos utilizam-se de serino endopeptidases para a digestão inicial no espaço endoperitrófico (dentro da matriz peritrófica). A parte intermediária da digestão é realizada por enzimas do tipo carboxipeptidases e aminopeptidases que se encontram ancoradas na superfície dos enterócitos, ocorrendo então no espaço ectoperitrófico (Peres-Silva et al., 2012). Em mosquitos e flebotomíneos, a digestão primária das proteínas é feita por isoformas de tripsina que são produzidas em diferentes tempos durante a alimentação. As tripsinas são serino proteases que clivam cadeias proteicas no lado carboxílico dos aminoácidos básicos, tais como arginina ou lisina. Atividade digestiva semelhante à tripsina foi relatada na maioria das espécies de insetos examinadas (Applebaum, 1985). As exceções importantes são espécies de Hemiptera e espécies pertencentes à série Cucujiformia de Coleoptera. Em flebotomíneos, 4 tripsinas foram descritas, sendo que uma isoforma chamada de Lltryp2 é expressa de forma constitutiva, enquanto que a expressão de Lltryp1 é induzida pelo repasto sanguíneo, atingindo pico de expressão a 12 horas após o repasto sanguíneo, retornando aos níveis de expressão iguais aos de insetos não alimentados a 72 horas após o repasto (Telleria et al., 2007). Sabe-se que a atividade proteolítica desencadeada pela digestão do sangue causa um impacto no desenvolvimento de *Leishmania* no tubo digestivo de seu inseto vetor. Ocorre uma redução do número de promastigotas de *Leishmania* no tubo digestivo de flebotomíneos que não são seus vetores naturais durante o início do processo de digestão (Lawyer et al. 1990, Schlein & Jacobson 1998). Além disso, a *Leishmania* é capaz de modular o nível de proteases no intestino médio após um repasto sanguíneo infeccioso e que a diminuição da atividade tripsinolítica é realmente benéfica para o desenvolvimento de formas promastigotas no intestino dos insetos vetores (Sant'anna et al. 2009, Telleria et al. 2010, Santos et al., 2014). Sant'Anna et al. 2009 em seus estudos mostrou que em *L. longipalpis*, a população de promastigotas de *Leishmania* tendeu a aumentar quando a atividade de tripsina 1 de *L. longipalpis* foi reduzida por RNAi. Mais recentemente, a infecção de *L. longipalpis* por *L. infantum* reduziu a atividade tripsinolítica no intestino desses flebotomos em comparação com

insetos não infectados (Santos et al. 2014). A redução da produção de proteases no intestino de flebotomíneos provavelmente favorece o estabelecimento de espécies de *Leishmania* no intestino do inseto vetor uma vez que as formas de transição amastigota-promastigota são especialmente sensíveis às proteases digestivas (Pimenta et al. 1997). Entretanto, este fato foi recentemente contestado por Pruzinova e colaboradores (2018) onde os autores afirmam que a fase de desenvolvimento de *Leishmania* mais sensível às enzimas digestivas são as formas promastigotas. Além disso, os autores provaram que proteinases não atuam diretamente sobre *Leishmania* e que a geração de stress oxidativo devido à digestão da hemoglobina via liberação de heme seria a causa de mortalidade do parasito. De fato, o contato com substâncias que geram stress oxidativo é deletério para *Leishmania* (Diaz-Albiter et al., 2012).

Desta forma, a atividade proteolítica no intestino de flebotomíneos, além de ser responsável pela digestão, é uma das barreiras que reduz a competência de *Leishmania* em se desenvolver no compartimento intestinal. Assim sendo, habilidade de escapar da atividade proteolítica no intestino do inseto vetor poderia ser um fator determinante para o sucesso ou não da progressão da infecção.

Em mosquitos, as tripsinas são responsáveis a maior parte da atividade endoproteolítica (Yang e Davies, 1971; Briegel e Lea, 1975). A ingestão de sangue pelo mosquito *Aedes aegypti* resulta em um aumento nas atividades de proteinase, até 24 h após a alimentação (Fisk, 1950; Fisk e Shambaugh, 1952). A principal proteinase é a tripsina (Gooding, 1966), mas as atividades de quimotripsina (Gooding, 1969) e aminopeptidase (Graf e Briegel, 1982) também estão presentes no intestino médio. Em *A. aegypti*, a tripsina inativa é liberada de pequenas vesículas secretoras dentro das células epiteliais do intestino médio para o lúmen do intestino médio posterior, onde a enzima é ativada (Graf et al., 1986). A ingestão de sangue induz duas fases de síntese de tripsina no intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*. A primeira fase, que engloba as primeiras 4-6 horas após uma refeição de sangue, é caracterizada pela presença de pequenas quantidades de tripsina minoritária (Noriega et al., 1996). A segunda fase, que ocorre entre 8 e 36 horas após o fornecimento de sangue, é caracterizada pela presença de grandes quantidades de tripsina (Graf et al., 1988). A atividade enzimática de tripsina minoritária desempenha um papel único e crítico na regulação da síntese tardia de tripsina, funcionando como um "sensor", realizando proteólise limitada das proteínas ingeridas e, de alguma forma, os produtos desta proteólise limitada induzem a síntese da tripsina tardia, que é a protease responsável pela maioria da clivagem endoproteolítica das proteínas do repasto (Barillas-Mury et al. 1995). O RNA mensageiro da tripsina minoritária está presente no intestino médio de fêmeas não alimentadas mas sua tradução ocorre somente após a ingestão do sangue, ainda rapidamente nas primeiras 8 horas após o repasto (Noriega et al., 1996). Duas tripsinas são responsáveis pela atividade majoritária de tripsina de *A. aegypti*: uma delas denominada de "late trypsin" (Barillas-Mury et al., 1991) e a outra de 5G1 (Kalhok et al., 1993). Sua síntese tem pico a 24 horas após a ingestão de sangue, com regulação ao nível transcricional.

Além de tripsinas, mosquitos apresentam outras atividades de endopeptidases no intestino. Em *A. aegypti*, o mRNA da quimotripsina é produzido após a emergência mas sua síntese protéica é induzida pelo repasto sanguíneo, mantendo-se alta durante a digestão e caindo a níveis basais após o fim deste processo (Jiang et al., 1997).

Entre as exopeptidases, o gene da carboxipeptidase A de *A. aegypti* apresenta pico de expressão entre 16 e 24 horas após o repasto sanguíneo (Edwards et al., 2000). As exopeptidases aminopeptidase, carboxipeptidase A e carboxipeptidase B possuem perfis de expressão semelhante de expressão ao da tripsina induzida pelo repasto, com picos de atividade entre 20 e 24 horas após a alimentação (Noriega et al., 2002).

As aminopeptidases hidrolisam os aminoácidos isolados do terminal N da cadeia peptídica e são classificadas com base na sua dependência dos íons metálicos e da especificidade do substrato. As aminopeptidases digestivas mais conhecidas são aquelas encontradas em intestinos de mamíferos associadas às membranas microvilares ou ao citosol (leucina aminopeptidase, aminopeptidase B e tripeptídeo aminopeptidase) dos enterócitos, sendo que aminopeptidases de insetos são encontradas no intestino (Terra, W. R., & Ferreira, C. 1994). A aminopeptidase em *A. aegypti* é detectável em vários níveis de atividade durante todas as fases do ciclo vital, e no intestino médio adulto, é estimulada pela presença de sangue, sendo igualmente associada com o epitélio do intestino médio e o espaço ectoperitrófico (Graf R, Briegel H, 1982). Outros estudos demonstraram a distribuição espacial das enzimas através do intestino médio do mosquito e sugeriram que a membrana peritrófica pode servir como um filtro molecular para as proteínas do sangue, como separação de eventos hidrolíticos no lúmen e como uma camada importante na separação de enzimas e inibidores (Borovsky 1986, Van Handel & Romoser, 1987).

Além da alimentação sanguínea, necessária para maturação dos ovos, os insetos hematófagos das famílias Culicidae e da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, alimentam-se de soluções açucaradas provenientes de plantas (néctar de flores, frutos) ou de soluções açucaradas de afídeos no caso dos flebotomíneos (Chaniotis, 1974). Portanto, o intestino destes insetos expressam enzimas para digestão de açúcares.

As glicosidases são geralmente nomeadas com base no monossacarídeo que dá seu grupo redutor à ligação glicosídica e na configuração ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) dessa ligação. Esta classificação implica que uma enzima pode clivar vários substratos e que um substrato pode ser clivado por diferentes enzimas. As  $\alpha$ -glicosidases são enzimas intestinais em insetos envolvidas na quebra de carboidratos complexos como amido e glicogênio em seus monômeros. As mesmas catalisam a clivagem terminal de resíduos  $\alpha$ -1-4 de glicose a partir de aril (ou alquil) glicosídeos, dissacarídeos ou oligossacarídeos (Terra, 2005). Glicosidases têm um papel significativo na fisiologia das flebotomíneas e no estabelecimento de interações com espécies de *Leishmania*, principalmente  $\alpha$ -glicosidases. A presença de glicosidases digestivas em flebotomíneos foi previamente descrita em *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia youngi* (Samie et al. 1990; Anés et al. 1994) e no intestino médio de *Phlebotomus langeroni* (Dillon e El Kordy 1997). Gontijo e colaboradores (1998)

descreveram a atividade de  $\alpha$ -glicosidase no intestino de *L. longipalpis*, mostrando que esta enzima possui sua atividade ligada à membrana do intestino deste inseto, mostrando pico de atividade em torno de pH=6. A atividade da  $\alpha$ -glicosidase é elevada no intestino médio posterior após a alimentação em resposta à refeição sanguínea, enquanto a atividade no intestino anterior é consistente com um papel de processamento de néctar para essa região do intestino médio (Billingsley, P. F., & Hecker, H. 1991).

A função da N-acetil- $\beta$ -d-hexosaminidase provavelmente é o de finalizar a digestão da quitina, atuando sobre os oligossacarídeos gerados por essa quitinas. Alternativamente, esta enzima pode estar envolvida na digestão de glicoproteínas (Moraes et al., 2012). A enzima é encontrada no glicocálix de células do intestino médio e no espaço ectoperitrófico de larvas de *Rhynchasciara americana* (Diptera, Sciaridae) (Terra e Ferreira, 1983). O papel fisiológico da enzima é provavelmente a hidrólise de compostos ligados a N-acetil-glicosamina, como a difusão de glicoproteínas a partir do espaço endoperitrófico. Esta enzima tem um pH ótimo de 6,2. Larvas de *Erinnyis ella* (Lepidoptera, Sphingidae) e *Spadaptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) possuem enzimas semelhantes (Terra e Ferreira, 1994). A atividade de N-acetil-b-D-hexosaminidase foi observada por Gontijo e colaboradores (2012) no intestino médio de larvas de *L. longipalpis*, possivelmente fazendo parte de um sistema quitinolítico no intestino destes insetos.

#### **1.4 Alimentação artificial e os anticoagulantes**

A alimentação artificial é uma das alternativas para infecções experimentais em insetos. Para alimentação por membrana, amastigotas ou promastigotas são misturados com sangue e oferecidos aos flebotomíneos usando-se de um alimentador artificial. Este método permite padronizar a concentração de parasitas no repasto sanguíneo infeccioso. Se configurado corretamente, este método produz taxas de infecção constantes e muito altas (mais de 90%). O mesmo também permite manipular o número de parasitos ingeridos que podem ser úteis para estudos de suscetibilidade em vetores. (Dostalova et al., 2012). Dos vários tipos de membranas disponíveis, os melhores resultados para flebotomíneos foram obtidos utilizando pele de pintos com até 7 dias de idade (Modi, 1997; Volf & Volfova, 2011). Membranas de Parafilm não são recomendadas para qualquer espécie de flebotomíneo, apesar de funcionar bem para mosquitos. As penas são removidas da pele sobrepondo a região do peito e a pele é cuidadosamente dissecada longe do corpo. É lavada com etanol a 70% salina estéril e armazenada a -20 ° C. Pouco antes do uso, a membrana é descongelada, lavada em solução salina estéril e colocada sobre a abertura do alimentador com a superfície externa voltada para fora. Experimentos de infecção recentes de flebotomíneos utilizam-se do aparelho Hemotek® inventado para manutenção de colônias de mosquitos em laboratório (Sant'Anna et al., 2009; 2012; 2014).

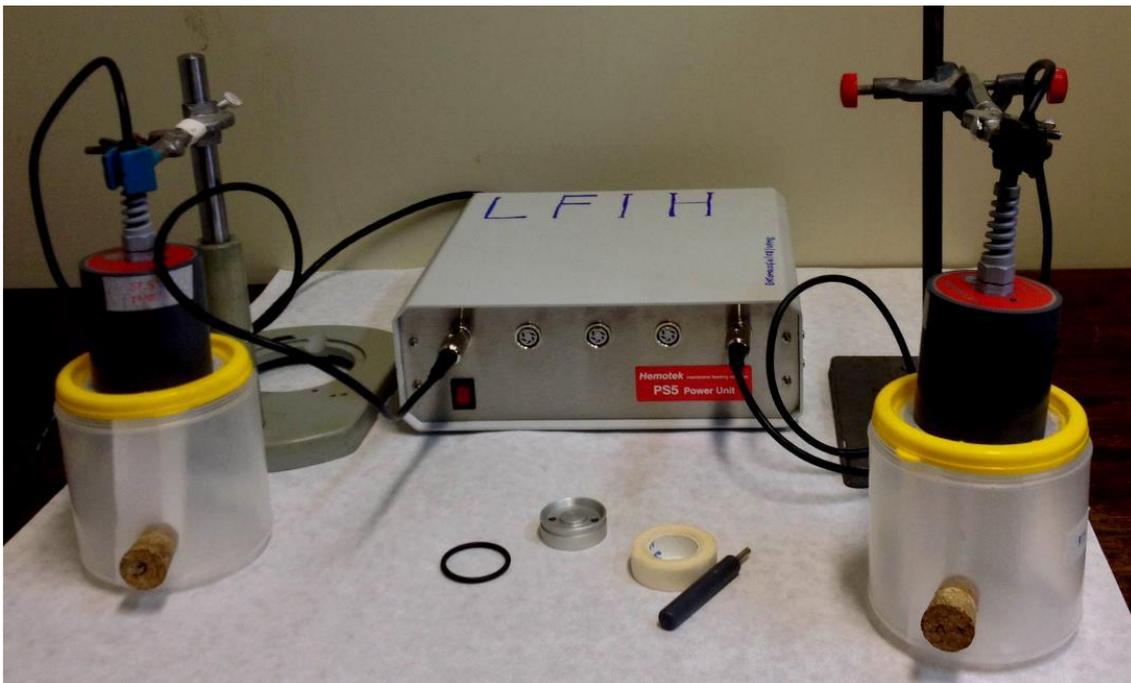


Figura 6: Aparelho Hemotek utilizado em alimentações artificiais de insetos hematófagos, especialmente mosquitos e flebotomíneos.

Estudos laboratoriais de biologia e/ou interação mosquito-patógeno emprega em grande parte sistemas artificiais de fornecimento de sangue para alimentar mosquitos, onde o uso de animais é restrito (Ferdowsian HR, BeckN., 2011). A crescente conscientização sobre o bem-estar animal e o rigor na regulamentação que rege o uso científico de animais para pesquisa, juntamente com a inconveniência de usar animais vivos como hospedeiros de sangue, levaram ao ímpeto para o desenvolvimento de um sistema de alimentação de sangue de membrana, artificial, barato e fácil de usar (Deng et al., 2012). A alimentação sanguínea artificial precisa de sangue, especialmente de humanos, o hospedeiro de muitos mosquitos. O sangue precisa de anticoagulante para impedir a coagulação, para que os mosquitos possam se alimentar adequadamente. O anticoagulante de uso pode causar alteração no funcionamento de enzimas intestinais, provocando alterações fisiológicas significativas, além de poder afetar o ciclo reprodutivo dos insetos e a quantidade de sangue ingerido (Lusiyana, N. et al, 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial de Saúde aponta que uma das causas do insucesso no combate a doenças parasitárias da pobreza (que tendem a ser negligenciadas pelas agências de fomento devido ao seu baixo impacto acadêmico) seria o desconhecimento da biologia de artrópodes vetores, que limita o desenvolvimento de novas estratégias de combate. Assim, uma maior compreensão dos diversos mecanismos que permitem a estes artrópodes atingir grande sucesso na obtenção de sangue, sucesso reprodutivo e elevada competência vetorial poderá revelar novos alvos para o desenvolvimento de estratégias de controle.

Para um melhor entendimento da fisiologia digestiva de insetos vetores, alimentações artificiais contendo fármacos diversos que possam manipular sua fisiologia digestiva seria uma boa alternativa. Uma vez que o sangue é retirado do hospedeiro vertebrado e administrado via alimentador artificial, a adição de anticoagulantes se faz necessária. Entretanto, até a presente data nenhum pesquisador se atentou para o fato de que anticoagulantes diferentes possam influir, por exemplo, no resultado final de estudos de atividade enzimática no intestino de artrópodes vetores. O presente estudo tenta desvendar a possível interferência que anticoagulantes possam ter na atividade de proteases e glicosidases intestinais de dois vetores de suma importância na transmissão de parasitoses e arboviroses a seres humanos: *L. longipalpis* e *A. aegypti*.

### 3.OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Desvendar o impacto de anticoagulantes diferentes na atividade de proteases e glicosidases intestinais de *L. longipalpis* e *A. aegypti*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Investigar a ação dos anticoagulantes Citrato de Sódio, Heparina e EDTA na atividade enzimática de tripsina, aminopeptidase, hexoxaminidase e  $\alpha$ -glicosidase de *L. longipalpis* utilizados durante alimentações artificiais.

- Investigar a ação dos anticoagulantes Citrato de Sódio, Heparina e EDTA na atividade enzimática de tripsina, aminopeptidase, hexoxaminidase e  $\alpha$ -glicosidase de *A. aegypti* utilizados durante alimentações artificiais.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Origem e manutenção dos insetos utilizados

#### 4.1.1 Origem e criação dos mosquitos *Aedes aegypti*

Os mosquitos utilizados nos experimentos foram da espécie *Aedes aegypti* pertencentes à linhagem Rockefeller. Os insetos adultos foram acondicionados em colônias fechadas em insetário no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos – LFIH mantidos em gaiolas cilíndricas 30 cm X 90 cm com tela na parte superior, temperatura de  $27 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12:12 h (L:E), umidade relativa de 75% e acesso contínuo à algodão embebido em solução de sacarose 10%. Hamsters previamente anestesiados com 0,2 mL de Thiopental® (50 mg/mL) e com o abdômen tricotomizado foram colocados sobre a tela das gaiolas para que as fêmeas realizassem o repasto sanguíneo durante 1 hora. Os ovos foram obtidos 2 dias após o repasto através do uso de papel filtro embebido em água desclorada dentro de potes de plásticos escuros. Após retirada dos papéis contendo os ovos, estes foram guardados em recipiente de plástico até colocá-los para eclodir em cubas de plástico contendo água desclorada e sendo fornecida ração de peixe ad labtium até a fase de pulpa. As pulpas foram então retiradas e colocadas nas gaiolas cilíndricas para a eclosão dos adultos.

#### 4.1.2 Origem e criação dos Flebotomíneos

Foram utilizados flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* advindos da área urbana de Teresina-Pi e mantidos em colônia fechada já estabelecida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, do Departamento de Parasitologia, ICB-UFGM, desde 2008. Esta colônia é mantida em um insetário climatizado, sob condições semi-controladas de temperatura ( $25 \pm 1$ °C) e umidade (maior que 80%) dentro de gaiolas de criação. A alimentação dos insetos foi realizada diariamente com solução de sacarose a 30% em algodão hidrófilo e mantidos em fotoperíodo, sendo 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. As fêmeas foram alimentadas semanalmente em hamsters (*Mesocricetus auratus*) previamente anestesiados com Xilazina e Ketamina (50mg/mL), de acordo com as exigências determinadas pelo comitê de ética animal do ICB-UFGM. Esta colônia foi estabelecida a partir de espécimes coletadas na cidade de Teresina-PI, área endêmica para leishmaniose visceral.

### 4.2 Atividade das enzimas $\alpha$ -glicosidase, hexosaminidase, aminopeptidase e tripsina após a utilização dos anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA

#### 4.2.1 Preparação da amostra

Os flebotomíneos utilizados foram fêmeas de *L. longipalpis* com idade entre 3 e 5 dias e os mosquitos foram fêmeas de *A. aegypti* com idade de 4 a 6 dias, sendo que para ambos insetos a alimentação com sacarose 30% para flebotomíneos e de sacarose 10% para os mosquitos foram retiradas no dia anterior ao repasto sanguíneo.

Após o repasto sanguíneo, os insetos bem alimentados foram selecionados, e permaneceram de repouso, se alimentando de sacarose. Os intestinos foram dissecados 24h, 48h, 72h após o repasto em salina 0,9% e em seguida transferidos individualmente para tubos Eppendorf de 1.5ml contendo 500µl de salina 0,9% e 5µl de Triton X100 (concentração final de 1%). A amostra foi sonicada, centrifugada e o sobrenadante foi utilizado.

#### 4.2.2 Atividade intestinal de $\alpha$ -glicosidase

Foram dissecados intestinos individuais de *L. longipalpis* e *A. aegypti* 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo e transferidos para tubos Eppendorf contendo 50 microlitros de salina. Este volume foi ajustado para 500µL de salina a 0,9% com 5µL de Triton X100 1%. As amostras foram maceradas com pistilo de polietileno, brevemente sonicadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos.

À 50µL de amostra (equivalente a 0.1 intestino) foram adicionados 50 µL substrato p-Np- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo na concentração de 10 mM dissolvido em água, 20µL de tampão 0.1M (MES / NaOH, pH 6), 20µL H<sub>2</sub>O. Os brancos foram preparados substituindo as amostras por solução salina 0,9%. As incubações foram realizadas durante 1 h a 30°C e as reações foram interrompidas pela adição de 200 µL de tampão 0,375 M de glicina, pH 10,5. Duzentos microlitros de cada tubo foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorção foi medida utilizando-se um leitor de ELISA a 400 nm. Neste ensaio tipo endpoint, utilizamos os intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* e *A. aegypti* alimentadas com sangue contendo citrato de sódio 0.109M diluído 1:10 em sangue humano, EDTA 5% e heparina nas concentrações de 150U/mL e 2U/mL de sangue.

#### 4.2.3 Atividade intestinal de Aminopeptidase

Foram dissecados intestinos individuais de *L. longipalpis* e *A. aegypti* 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo e transferidos para tubos Eppendorf contendo 50 microlitros de salina. Este volume foi ajustado para 500µL de salina a 0,9% com 5µL de Triton X100. As amostras foram maceradas com pistilo de polietileno, brevemente sonicadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos.

Para a preparação do ensaio, 100µL tampão Tris / HCl 100mM pH8, 30µL de água e 20µL de 10mM L-leucina P-NA (substrato da reação previamente dissolvido em

DMSO), foram incubados a 30°C por 5 minutos em um leitor de ELISA. Para o começo da reação, 50µL da amostra (equivalente a 0.1 intestino) foram adicionados, e realizou-se um ensaio cinético feito a 415 nm com leituras realizadas a cada 30 segundos durante 30 minutos. Neste ensaio, utilizamos os intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* e *A. aegypti* alimentadas com sangue contendo citrato de sódio 0.109M diluído 1:10 em sangue humano, EDTA 5% e heparina nas concentrações de 150U/mL e 2U/mL de sangue.

#### 4.2.4 Atividade intestinal de Tripsina

Foram dissecados intestinos individuais de *L. longipalpis* e *A. aegypti* 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo e transferidos para tubos Eppendorf contendo 50 microlitros de salina. Este volume foi ajustado para 500µL de salina a 0,9% com 5µL de Triton X100. As amostras foram maceradas com pistilo de polietileno, brevemente sonicadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos.

À 50µL da amostra (equivalente a 0.1 intestino) foram adicionados 100µl de Tampão TRIS-HCL 0,1M (pH8), 40µl de salina 0,9% e 10mM do substrato BApNA diluído em DMSO. Imediatamente após a adição do substrato sintético foi feita a leitura enzimática no leitor de microplacas Versamax em modo cinético à 401nm de 30 em 30 segundos, durante 30 minutos, com agitação prévia de 5 segundos entre cada leitura. Neste ensaio tipo cinético, utilizamos os intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* e *A. aegypti* alimentadas com sangue contendo citrato de sódio 0.109M diluído 1:10 em sangue humano, EDTA 5% e heparina nas concentrações de 150U/mL e 2U/mL de sangue.

#### 4.2.5 Atividade intestinal de N-acetyl-β-D-hexosaminidase

Foram dissecados intestinos individuais de *L. longipalpis* e *A. aegypti* 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo e transferidos para tubos Eppendorf contendo 50 microlitros de salina. Este volume foi ajustado para 500µL de salina a 0,9% com 5µL de Triton X100. As amostras foram maceradas com pistilo de polietileno, brevemente sonicadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos.

À 50µL da amostra (correspondendo a 0,1 de intestino) misturou-se 50ul de p-N-fenil-N-acetyl-β-D-hexosamina [4mM], 20µl de tampão MES e 20µl de água destilada. Os reagentes foram incubados a 30°C por 10 minutos.

Para dar início a reação dos tubos teste e controle, foi adicionado ao substrato 50µl da amostra seguido de incubação 30°C por 1 hora. Duzentos microlitros de tampão 0,375 M de glicina, pH 10,5 foram adicionados para interromper a reação. No tubo branco, o tampão glicina foi adicionado à solução antes da amostra.

Duzentos microlitros de cada tubo foram utilizados para a leitura do tipo endpoint da atividade enzimática em um leitor de microplacas Versamax a 400nm.

#### **4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

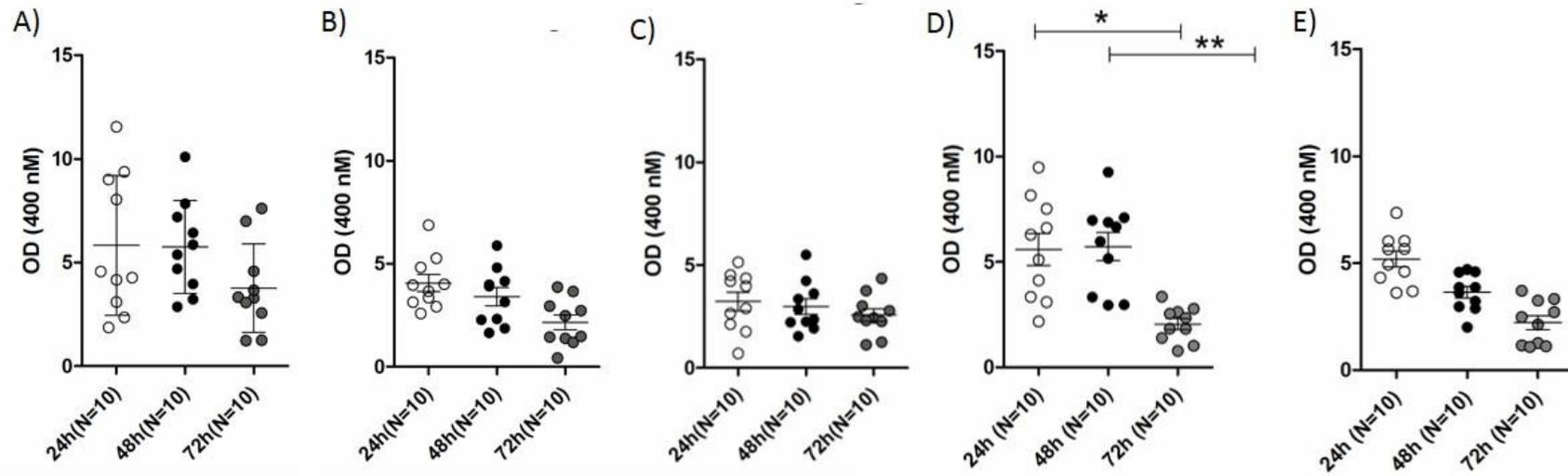
Para os testes estatísticos foi utilizado o GraphPad Prism. Foi feito o teste de normalidade pra saber se os dados eram paramétricos ou não. Se paramétricos, era feito o teste ANOVA seguido de teste de Tukey. Quando não paramétrica, foi feito Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ATIVIDADE DE $\alpha$ -glicosidase no intestino de *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA

Estes resultados tiveram como objetivo observar se a escolha de anticoagulantes diferentes influencia na atividade enzimática intestinal de  $\alpha$ -glicosidase no intestino do flebotomíneo *L. longipalpis*. Nestes experimentos, utilizamos como referência o experimento realizado em hospedeiro humano onde os flebotomíneos se alimentaram diretamente de um voluntário humano, portanto sem a presença de nenhum anticoagulante.

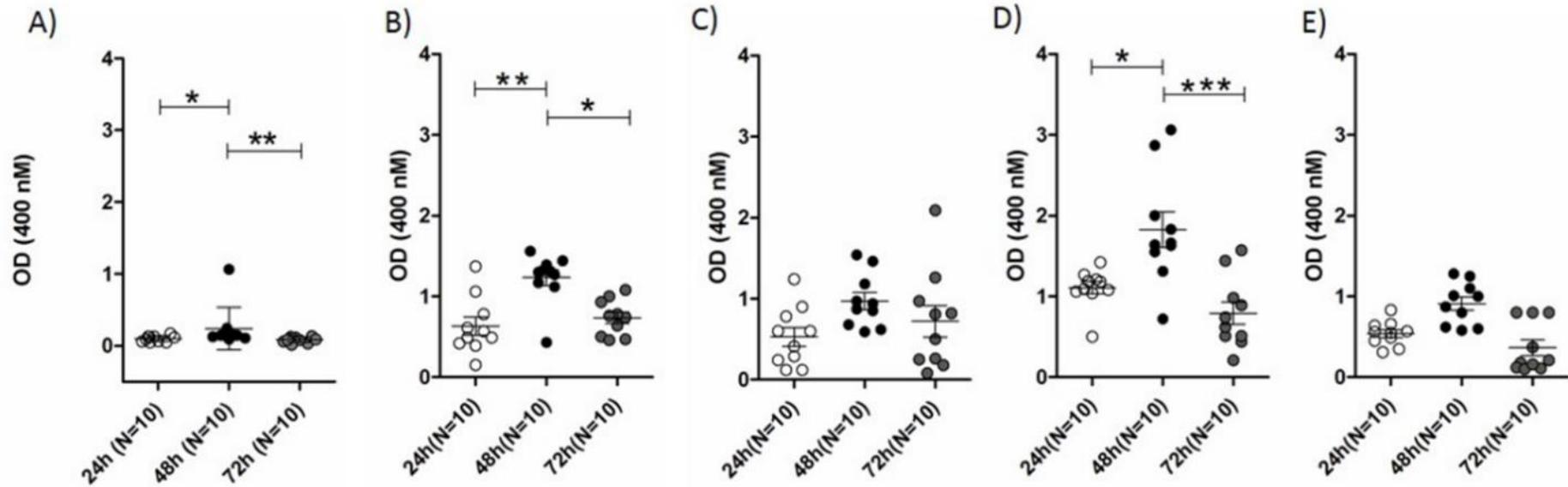
Os experimentos mostraram que os anticoagulantes citrato de sódio, EDTA e heparina na concentração de 150 U/mL não alteraram o perfil enzimático em comparação com o observado para insetos que se alimentaram diretamente no hospedeiro vertebrado, mostrando uma ligeira queda de atividade enzimática ao longo dos dias analisados, sem apresentar diferença estatística. Entretanto, a utilização do anticoagulante heparina na concentração de 2U/mL resultou em uma atividade de  $\alpha$ -glicosidase estatisticamente mais baixa a 72 horas em comparação com a atividade desta enzima registrada a 24 e 48 horas após o repasto sanguíneo (Figura 7).



**Figura 7: Atividade de  $\alpha$ -glicosidase em *L. longipalpis* utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA. A) Grupo controle (alimentação em hospedeiro humano); B) Grupo alimentado com Citrato de sódio; C) Grupo alimentado com EDTA; D) Grupo alimentado com heparina 2U/ml; E) grupo alimentado com heparina 150U/ml. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) Kruskal-wallis seguido de pós-teste de Dunn.**

## **5.2 ATIVIDADE DE hexosaminidase em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA**

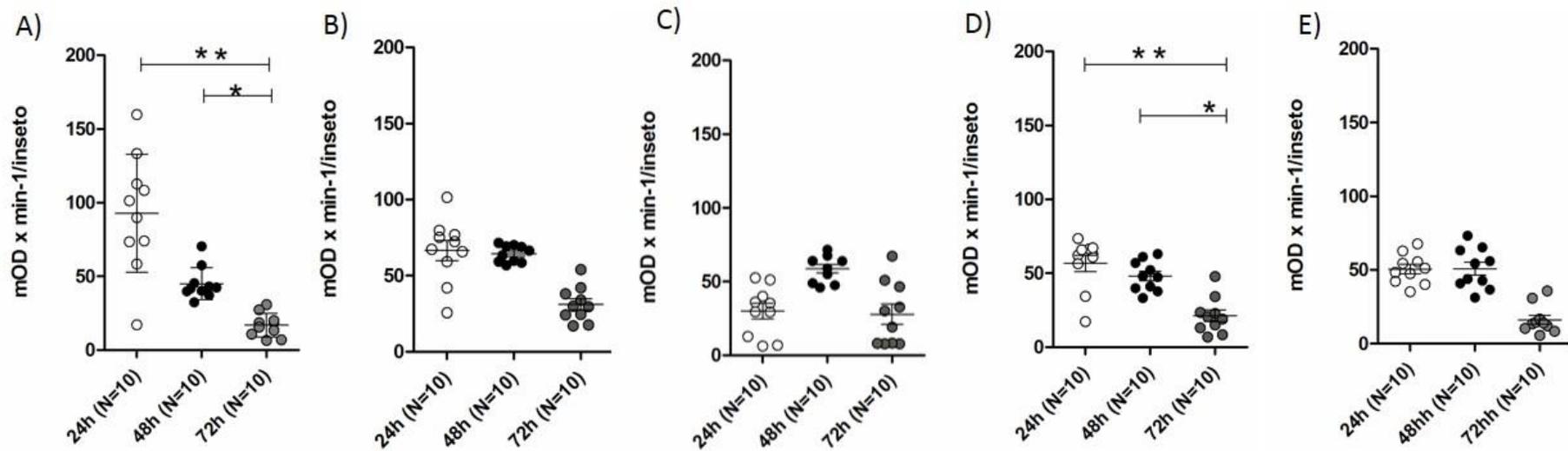
A atividade observada para a enzima hexosaminidase mostrou um perfil diferente daquele observado para a enzima  $\alpha$ -glicosidase, quando observamos o grupo controle (insetos alimentando-se diretamente no hospedeiro humano). Neste caso, observamos um pico estatisticamente significativo de atividade enzimática a 48 horas após o repasto sanguíneo em insetos alimentados em voluntário humano. Este perfil também foi observado para insetos alimentados com sangue humano suplementado com os anticoagulantes citrato de sódio e heparina na concentração de 2U/mL, observando-se também nestes grupos uma maior dispersão dos pontos experimentais. Os resultados obtidos para os anticoagulantes EDTA e heparina na concentração de 150U/mL mostraram resultados semelhantes aos descritos anteriormente, porém sem diferença estatística entre os grupos experimentais (figura 8).



**Figura 8: Atividade de hexosaminidase em *L. longipalpis* utilizando-se os anticoagulantes citrato de sódio, EDTA e heparina.** A) Grupo controle; B) Grupo alimentado com Citrato de sódio; C) Grupo alimentado com com EDTA; D) Grupo alimentado com heparina 2U/ml; E) grupo alimentado com heparina 150U/ml. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) Kruskal-wallis seguido de pós-teste de Dunn.

### **5.3 ATIVIDADE DE aminopeptidase em *L. longipalpis* FRENTE AOS ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA**

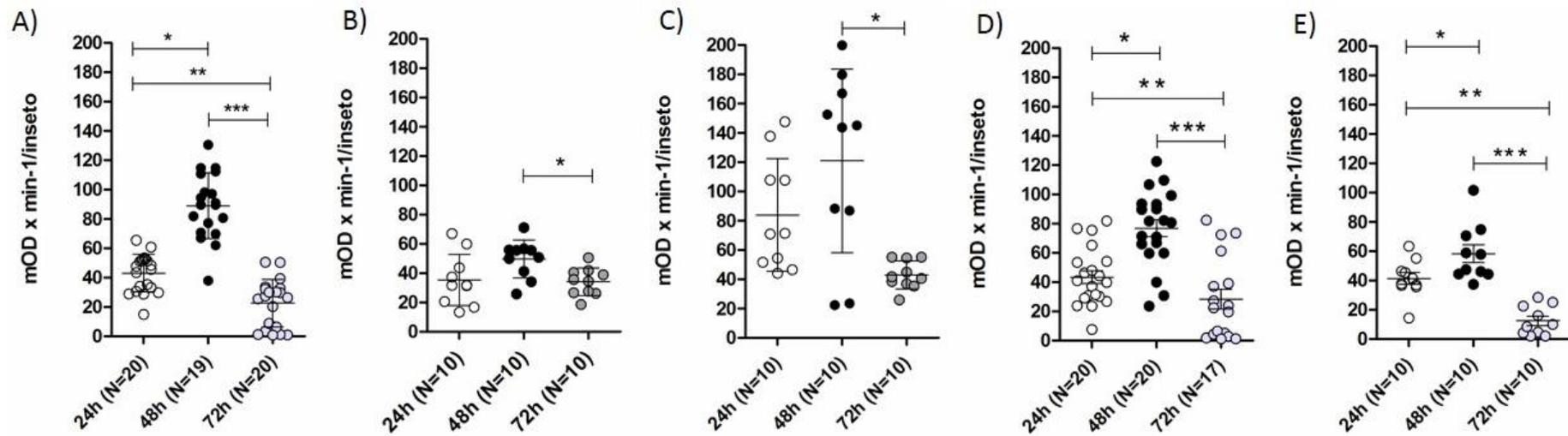
Em nossas análises nós investigamos também se a escolha do anticoagulante influencia a atividade intestinal de proteases em *L. longipalpis*. Em nossos experimentos, a atividade da aminopeptidase apresentou um maior valor 24 horas após o repasto sanguíneo, apresentando queda progressiva e com diferença estatisticamente significativa na atividade enzimática a 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo quando insetos se alimentaram em hospedeiro humano (figura 9A). Este perfil de atividade enzimática também foi observado quando os insetos foram alimentados com sangue humano suplementado com heparina na concentração de 2U/mL (figura 9D). Para os anticoagulantes citrato de sódio e heparina na concentração de 150 U/mL, observamos que não houve diferença estatística na atividade de aminopeptidase no intestino entre os insetos coletados a 24 horas e 48 horas após o repasto, diferentemente do que observamos para os insetos controle alimentados em hospedeiro humano (figura 9B e E). O anticoagulante EDTA foi aquele que, quando utilizado, apresentou o maior desvio em comparação com o grupo controle, apresentando um pico de atividade enzimática a 48 horas após o repasto, diferentemente dos demais grupos que apresentaram pico de atividade enzimática a 24 horas pós repasto (Figura 9C).



**FIGURA 9: Atividade de aminopeptidase em *L. longipalpis* utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.** A) Grupo controle; B) Grupo alimentado com Citrato; C) Grupo alimentado com com EDTA; D) Grupo alimentado com heparina 2U/ml; E) grupo alimentado com heparina 150U/ml. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

#### **5.4 ATIVIDADE DE tripsina em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA**

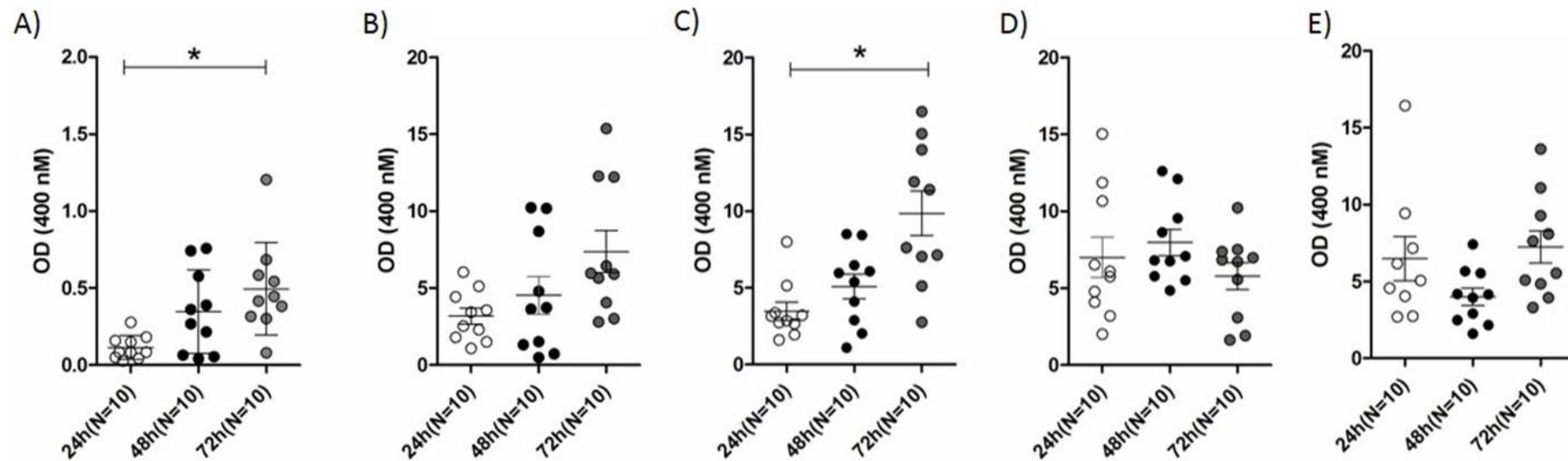
Neste conjunto de experimentos, observamos uma significativa influência da escolha do anticoagulante na atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis*. Ao observarmos o grupo controle, verificamos que a atividade tripsinolítica observada está de acordo com o observado por Santos e colaboradores (2014), onde observamos um pico de atividade tripsinolítica 48 horas após o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado, com diferenças estatisticamente significativas entre os tempos analisados (figura 10A). Este perfil foi também observado quando utilizamos o anticoagulante heparina em ambas concentrações testadas, com um resultado mais semelhante ao perfil do experimento controle obtido quando utilizamos a concentração de 2 unidades enzimáticas por mL (figura 10D e E). Entretanto, grandes desvios de atividade tripsinolítica foram observados quando utilizamos os anticoagulantes citrato de sódio e EDTA. A suplementação do repasto artificial utilizando-se citrato de sódio causou uma redução significativa da detecção de atividade enzimática, com valores inferiores a  $80 \text{ mOD} \times \text{min}^{-1}$  como observado na figura 10 B. A utilização de EDTA levou a uma maior dispersão dos pontos experimentais (figura 10C). Tanto a utilização de citrato de sódio e EDTA ocasionaram desvios importantes no perfil de atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis*.



**Figura 10: Atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis* utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA. A) Grupo controle; B) Grupo alimentado com citrato de sódio; C) Grupo alimentado com EDTA; D) Grupo alimentado com heparina 2U/ml; E) grupo alimentado com heparina 150U/ml. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.**

### **5.5 ATIVIDADE DE $\alpha$ -glicosidase em *Aedes aegypti* FRENTE AOS ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA**

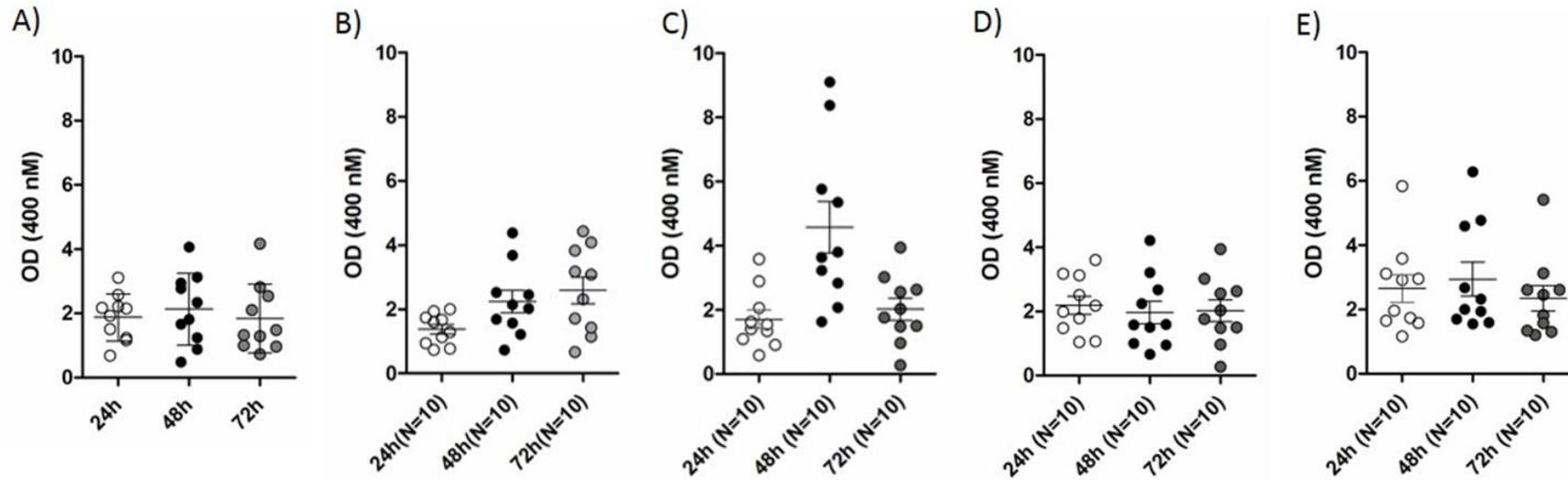
O perfil enzimático de atividade da  $\alpha$ -glicosidase no intestino de *A. aegypti* mostrou-se bem diferente do perfil apresentado por esta enzima em *L. longipalpis*. Em insetos alimentados em hospedeiro vertebrado, a atividade de  $\alpha$ -glicosidase mostrou tendência em aumentar ao longo dos tempos estudados (24, 48 e 72 horas), com um aumento significativo observado comparando-se a atividade enzimática nos tempos de 24 e 72 horas (figura 11A). Perfil enzimático semelhante ao grupo controle foi observado quando os mosquitos foram alimentados artificialmente com sangue humano suplementado com citrato de sódio e EDTA (figura 11B e C). Entretanto, a utilização de heparina causou um desvio no padrão da atividade de  $\alpha$ -glicosidase em comparação com o grupo controle. Insetos alimentados artificialmente com sangue humano suplementado com heparina na concentração de 2U/mL mostraram uma tendência de queda de atividade enzimática a 72 horas após o repasto artificial, enquanto que insetos alimentados artificialmente com sangue humano suplementado com heparina na concentração de 150U/mL mostraram uma tendência de queda de atividade enzimática a 48 horas após o repasto artificial (figura 11 D e E).



**Figura 11: Atividade de  $\alpha$ -glicosidase em *A. aegypti* utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.** A) Grupo controle alimentado em hospedeiro humano; B) Grupo alimentado artificialmente com Citrato de sódio; C) Grupo alimentado com EDTA; D) Grupo alimentado com heparina 2U/ml; E) grupo alimentado com heparina 150U/ml. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

## **5.6 ATIVIDADE DE hexosaminidase em *Aedes aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA**

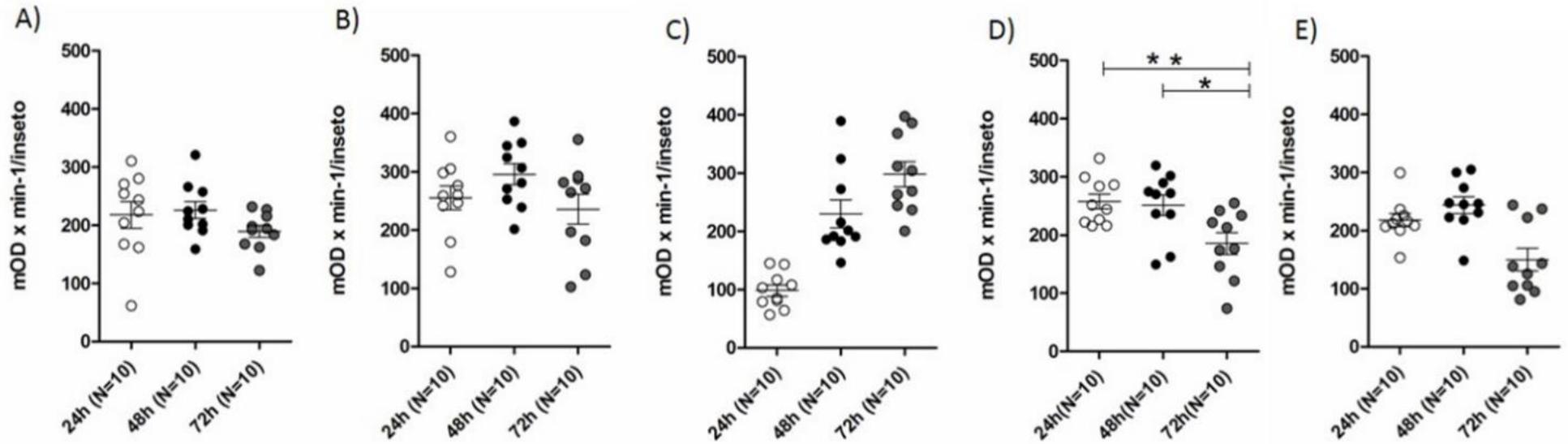
O estudo da atividade de hexosaminidase no intestino de fêmeas de *A. aegypti* mostrou-se sem diferenças estatísticas ao longo dos tempos após o repasto sanguíneo estudados (24, 48 e 72 horas), seja para o grupo controle alimentado em hospedeiro humano, seja para os insetos alimentados artificialmente com os anticoagulantes estudados (figura 12). Nos insetos alimentados com sangue suplementado com EDTA, observou-se uma tendência de aumento de atividade de hexosaminidase 48 horas após o repasto artificial (Figura 12C).



**Figura 12: Atividade de hexosaminidase em *A. aegypti* frente aos anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.** A) Grupo controle; B) Grupo alimentado com Citrato de sódio; C) Grupo alimentado com EDTA; D) Grupo alimentado com heparina 2U/ml; E) grupo alimentado com heparina 150U/ml.

### **5.7 ATIVIDADE DE aminopeptidase em *Aedes aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA**

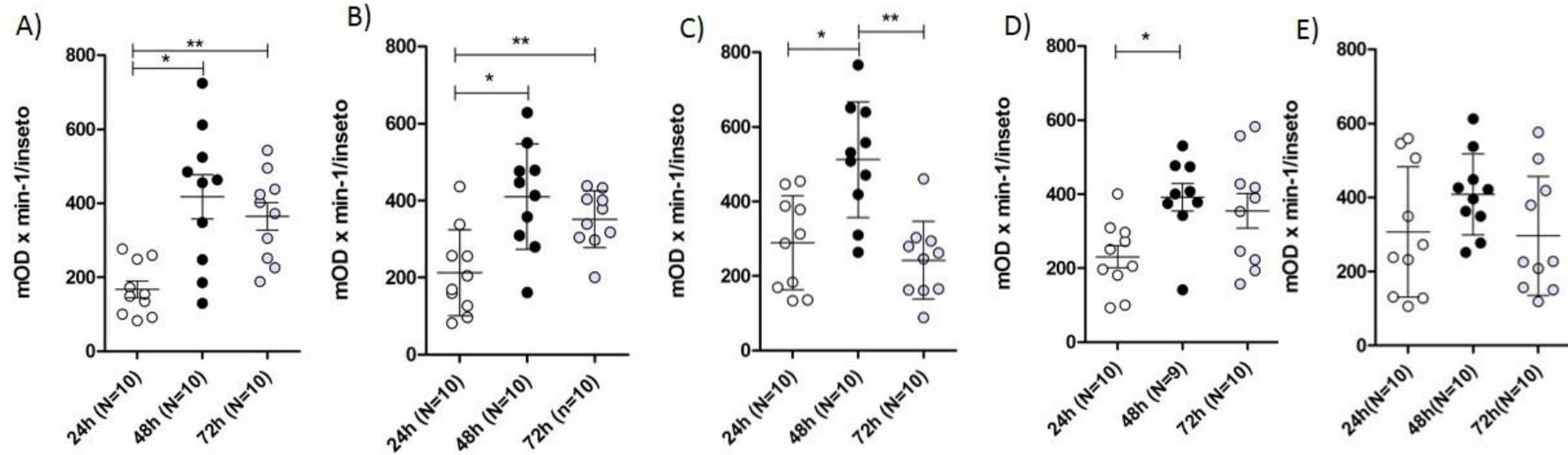
O estudo da atividade de aminopeptidase no intestino de fêmeas de *A. aegypti* mostrou uma tendência de queda de atividade enzimática a 72 horas após o repasto em hospedeiro humano (grupo controle) e nos demais grupos utilizando-se anticoagulantes em alimentações artificiais em aparelho hemotek (Figura 13). A exceção a essa regra pode ser observada quando os mosquitos se alimentaram com sangue contendo EDTA, onde observamos uma tendência de aumento de atividade enzimática ao longo do tempo estudado, com pico em 72 horas após o repasto (figura 13C). O anticoagulante heparina em ambas concentrações estudadas mostrou um perfil enzimático mais semelhante ao grupo controle (figura 13 D e E).



**Figura 13: Atividade de aminopeptidase em *A. aegypti* utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA. A) Grupo controle; B) Grupo alimentado com Citrato; C) Grupo alimentado com com EDTA; D) Grupo alimentado com heparina 2U/ml; E) grupo alimentado com heparina 150U/ml. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.**

### **5.8 ATIVIDADE DE tripsina em *Aedes aegypti* utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA**

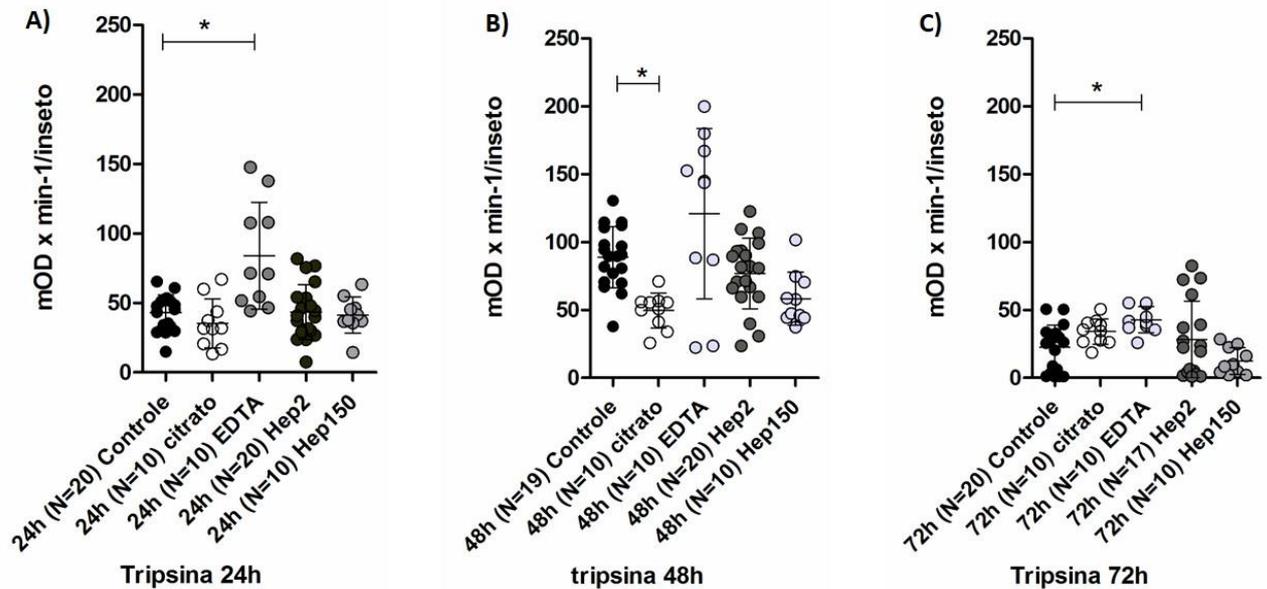
O perfil de atividade tripsinolítica do intestino de fêmeas de *A. aegypti* mostrou-se semelhante ao observado para *L. longipalpis* em nosso trabalho, com pico de atividade em torno de 48 horas após o repasto sanguíneo. Os grupos experimentais de mosquitos alimentados com sangue suplementado com citrato de sódio, EDTA, e heparina na concentração de 2U/mL mostraram atividade enzimática semelhante ao grupo controle alimentado em hospedeiro humano (figura 14 B, C e D). No grupo alimentado com sangue humano suplementado com heparina na concentração de 150U/mL observamos o maior desvio de atividade enzimática em comparação com o grupo controle, não observando nenhuma diferença estatística de atividade enzimática entre os grupos (figura 14E).



**Figura 14: Atividade de tripsina em *A. aegypti* utilizando-se os anticoagulantes heparina, citrato de sódio, e EDTA.** A) Grupo controle; B) Grupo alimentado com Citrato de sódio; C) Grupo alimentado com com EDTA; D) Grupo alimentado com heparina 2U/ml; E) grupo alimentado com heparina 150U/ml. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

### **5.9 ATIVIDADE DE tripsina em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO**

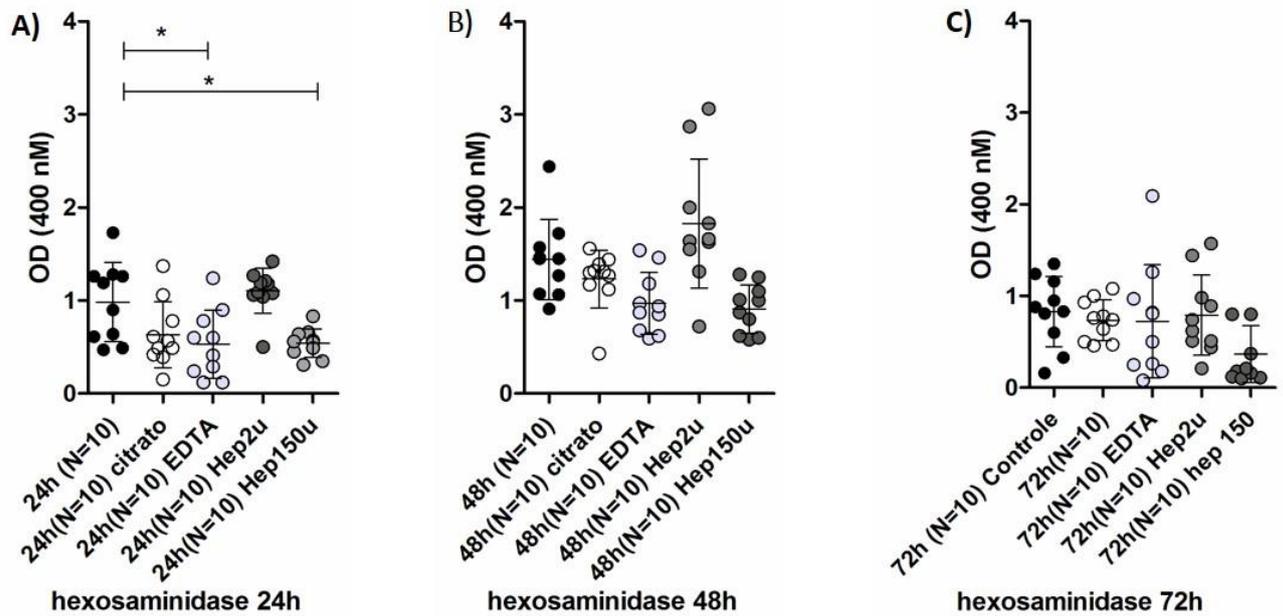
Neste conjunto de experimentos, observamos uma significativa influência da escolha do anticoagulante na atividade tripsinolítica no intestino de *L. longipalpis*. No grupo dissecado às 24h (FIGURA 15 A) após a alimentação, podemos observar uma diferença significativa se compararmos o grupo controle, ou seja, o grupo alimentado diretamente em hospedeiro humano, com o grupo que se alimentou com sangue suplementado com o anticoagulante EDTA. Já os outros grupos não mostraram influência para esse intervalo de tempo. Ao analisarmos a atividade tripsinolítica nos insetos que tiveram o intestino dissecado às 48h (FIGURA 15 B), é possível notar que o grupo tratado com citrato foi aquele que mostrou maior alteração em sua atividade. Já no intervalo de 72h, novamente o grupo tratado com EDTA se mostra com uma alteração significativa nos valores de atividade enzimática quando comparados ao grupo controle (FIGURA 15 C).



**FIGURA 15: ATIVIDADE DE tripsina em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO** A) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 24h após o repasto. B) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 48hh após o repasto. C) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 72h após o repasto. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

### **5.10 ATIVIDADE DE hexosaminidase em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO**

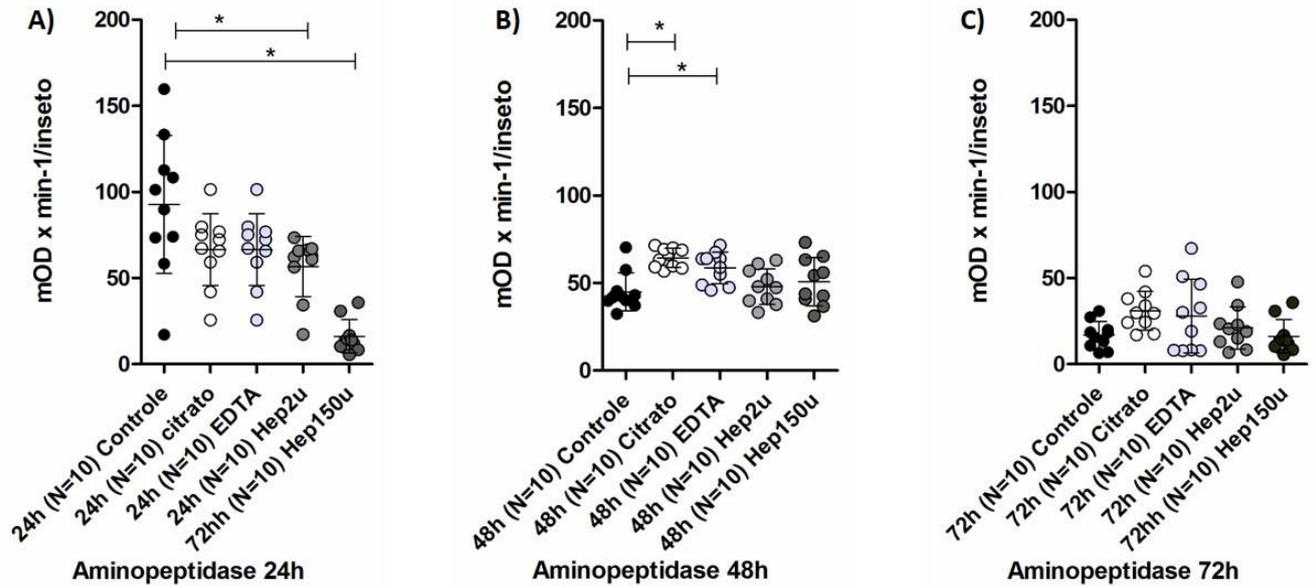
Os experimentos da atividade enzimática da hexosaminidase no intestino de *L. Longipalpis* em relação aos diferentes anticoagulantes mostrou que às 24 horas após o repasto sanguíneo, os grupos de insetos que se alimentaram com sangue contendo heparina na concentração de 150 unidades e também aqueles que se alimentaram de sangue suplementado com EDTA, foram os que mais tiveram diferenças significativas, em relação ao grupo que se alimentou diretamente em hospedeiro humano, na atividade da hexosaminidase (FIGURA 16A) mostrando uma diminuição na atividade da enzima no intestino médio dos flebotomíneos. Em relação a atividade enzimática nos grupos que tiveram seus intestinos dissecados às 48h após o repasto sanguíneo (FIGURA 16B), a escolha do anticoagulante não se mostrou importante, já que não houve uma alteração significativa em nenhum dos grupos. O mesmo padrão pode ser observado nos insetos dissecados às 72h (FIGURA 16C), em que não há diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos alimentados com sangue contendo anticoagulantes.



**FIGURA 16: ATIVIDADE DE hexosaminidase em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO** A) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 24h após o repasto. B) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 48h após o repasto. C) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 72h após o repasto. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

### **5.11 ATIVIDADE DE aminopeptidase em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO**

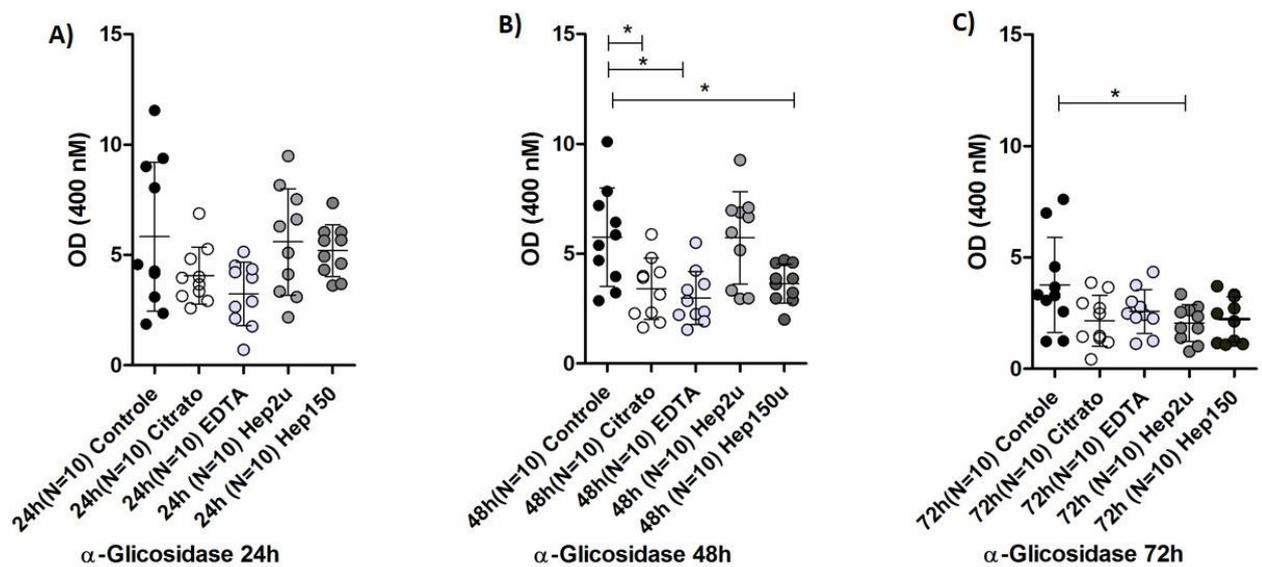
A atividade de aminopeptidase no intestino médio de *L. longipalpis* no grupo de insetos que foram dissecados às 24h após o repasto sanguíneo (FIGURA 17A), mostrou variação significativa nos grupos que se alimentaram com sangue contendo heparina, seja na concentração de 2U ou de 150U, quando comparados ao grupo controle. Ambos mostraram uma queda na atividade enzimática, principalmente o grupo tratado com heparina 150U. Já em relação ao grupos que tiveram seus intestinos dissecados às 48h (FIGURA 17B) após a refeição de sangue, podemos observar que a maior alteração na atividade de aminopeptidase ocorre nos insetos que realizaram repasto contendo citrato e EDTA, demonstrando um aumento nos valores de leitura. No horário das 72h nenhum anticoagulante impactou a atividade da aminopeptidase no intestino médio de *L. longipalpis* de uma maneira significativa, sendo os valores de leitura bastante semelhantes (FIGURA 17C).



**FIGURA 17: ATIVIDADE DE aminopeptidase em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO** A) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 24h após o repasto. B) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 48h após o repasto. C) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 72h após o repasto. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

### **5.12 ATIVIDADE DE $\alpha$ -glicosidase em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO**

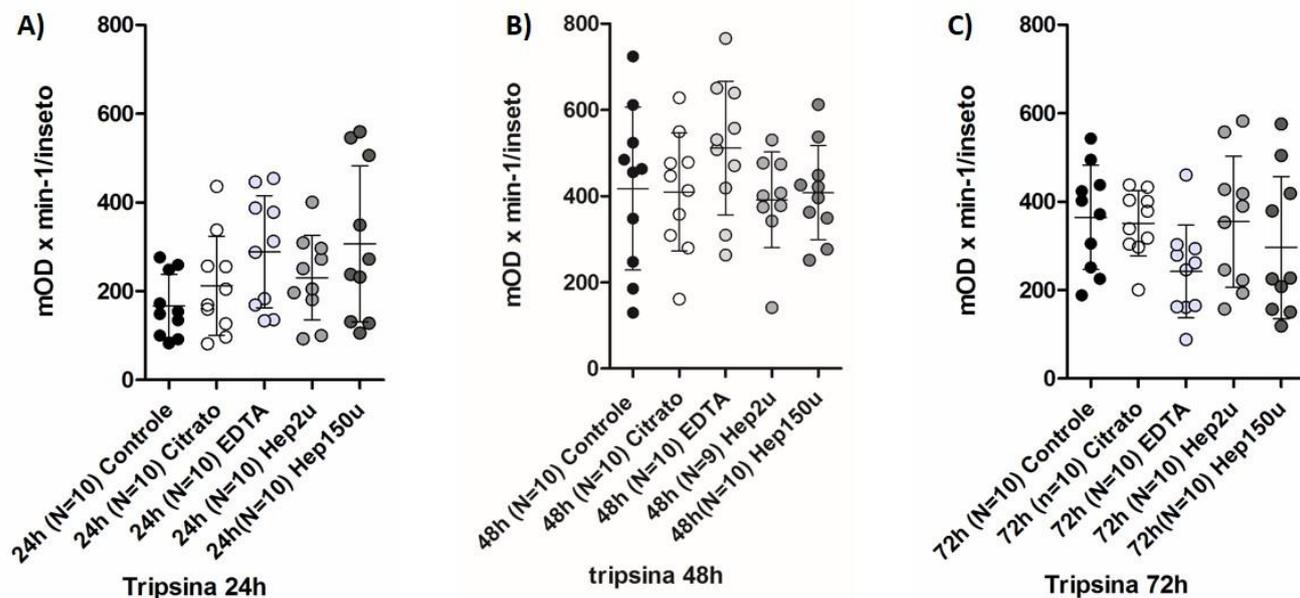
Em relação à atividade da enzima digestiva  $\alpha$ -glicosidase no intestino médio de *L. longipalpis* às 24h, os diferentes anticoagulantes usados na suplementação do sangue para repasto, não pareceram afetar os demais grupos testes ao compara-los com o grupo controle, mantendo o mesmo nível de atividade enzimática (FIGURA 18A). Contudo, o mesmo não pode ser observado em relação aos insetos que tiveram seus intestinos médios dissecados no intervalo das 48h (FIGURA 18B). Os grupos que se alimentaram com sangue contendo Heparina na concentração de 150 unidades, EDTA, e citrato, tiveram uma baixa na atividade de  $\alpha$ -glicosidase em relação ao grupo que se alimentou diretamente em humanos. Apenas o grupo tratado com heparina na concentração de 2U não mostrou uma alteração significativa na atividade da enzima. Curiosamente, nos grupos de flebotomíneos dissecados às 72h (FIGURA 18C), justamente os que se alimentaram com sangue contendo heparina 2U, foram os que mostraram alteração na atividade enzimática. Os outros grupos teste não tiveram mudanças significativas em relação ao grupo controle.



**FIGURA 18: ATIVIDADE DE  $\alpha$ -glicosidase em *L. longipalpis* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO** A) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 24h após o repasto. B) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 48h após o repasto. C) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 72h após o repasto. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

### **5.13 ATIVIDADE DE tripsina em *A. aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO**

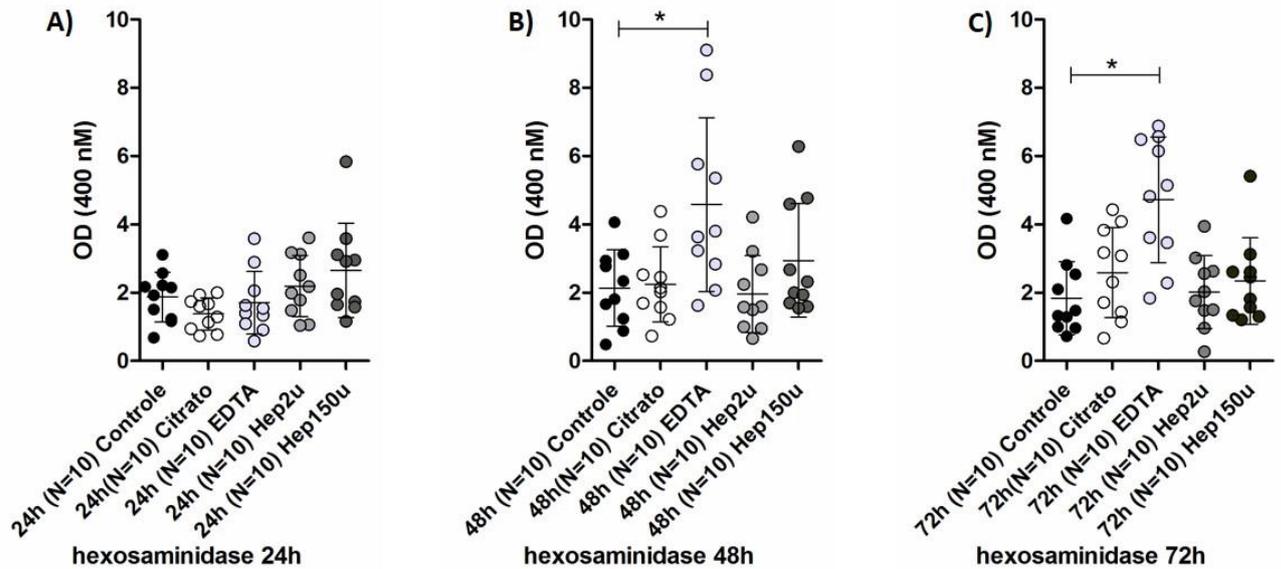
Para a avaliação a atividade da tripsina no intestino médio de *A. aegypti* observamos que não houve uma grande mudança nos níveis de leitura dos grupo testes, ou seja, os grupos de insetos que se alimentaram de sangue suplementado com anticoagulantes, através do aparelho artificial Hemotek, quando comparados com o grupo controle, insetos que se alimentaram de forma mais próxima a natural, realizando o repasto sanguíneo diretamente em hospedeiro humano. Não verificamos alguma alteração estatisticamente significativa em nenhum grupo, seja os intestinos dos mosquitos dissecados no intervalo de 24, 48, ou 72 horas (FIGURA 19).



**FIGURA 19: ATIVIDADE DE tripsina em *A. aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO** A) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 24h após o repasto. B) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 48hh após o repasto. C) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 72h após o repasto. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

#### **5.14 ATIVIDADE DE hexosaminidase em *A. aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO**

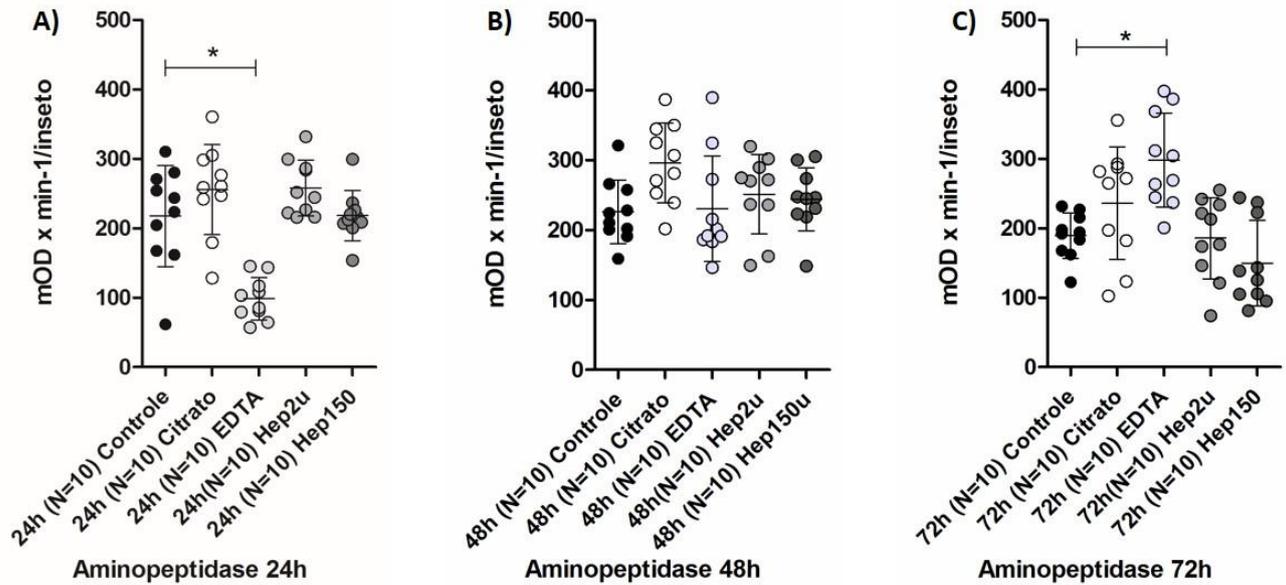
A atividade enzimática de hexosaminidase no intestino médio do grupo de *A. aegypti* dissecado um dia após o repasto sanguíneo (FIGURA 20A), mostrou-se sem grandes alterações quando comparamos as atividades entre os insetos, sendo o grupo alimentado com sangue heparinizado (heparina 150U) o que mostrou os maiores valores de leitura, ainda que sem qualquer diferença estatística entre o grupo controle. Observando os insetos dissecados no intervalo de 48 horas (FIGURA 20B), podemos afirmar que a maioria dos grupos, quando comparados ao grupo que se alimentou diretamente em hospedeiro humano, não tiveram grandes alterações na atividade de hexosaminidase, exceto pelo grupo que se alimentou com sangue suplementado pelo anticoagulante EDTA, que teve a média de valor de leitura praticamente o dobro do grupo controle. Em relação aos insetos dissecados às 72 horas após o repasto, novamente o grupo que se alimentou com sangue e EDTA foi o único apresentou uma alteração significativa quando comparado ao grupo de mosquitos que se alimentou diretamente em hospedeiro humano (FIGURA 20C).



**FIGURA 20: ATIVIDADE DE tripsina em *A. aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO** A) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 24h após o repasto. B) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 48h após o repasto. C) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 72h após o repasto. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

### **5.15 ATIVIDADE DE aminopeptidase em *A. aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO**

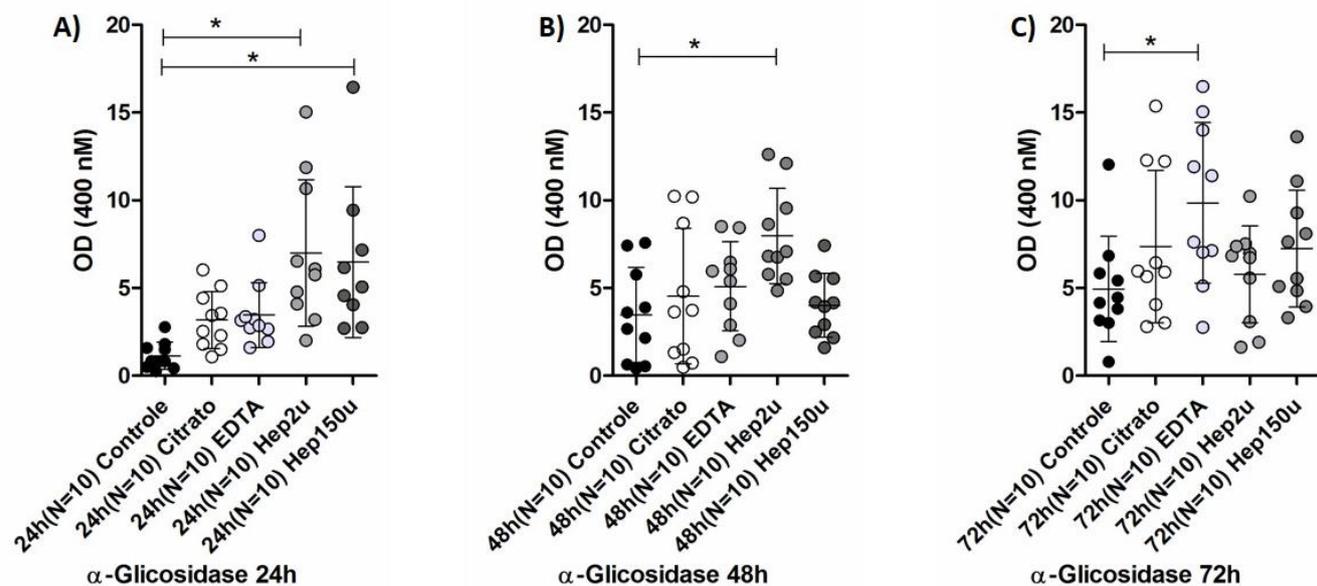
Em relação a atividade enzimática da aminopeptidase em *A. aegypti*, no intervalo das 24 horas (FIGURA 21A), o grupo de insetos que se alimentaram com o sangue que continha o anticoagulante EDTA, foi aquele que mostrou uma real diferença na atividade da enzima, tendo uma grande queda nos valores de leitura. Já os demais grupos não mostraram diferenças importantes para a atividade de aminopeptidase. Neste conjunto de experimentos, não observamos uma significativa influência da escolha do anticoagulante na atividade da aminopeptidase no intestino médio de *L. longipalpis* no grupo dissecado às 48h (FIGURA 21 B), sendo que nenhum grupo apresentou uma variação importante. Para os insetos que tiveram seus intestinos dissecados às 72 horas após o repasto sanguíneo, outra vez o grupo que realizou o repasto com sangue suplementado com EDTA, foi o que mostrou maior interferência na atividade enzimática, tendo uma maior expressão dos valores de leitura com uma diferença estatística quando comparado ao grupo controle (FIGURA 21 C).



**FIGURA 21: ATIVIDADE DE aminopeptidase em *A. aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO** A) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 24h após o repasto. B) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 48h após o repasto. C) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 72h após o repasto. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

### **5.16 ATIVIDADE DE $\alpha$ -glicosidase em *A. aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO**

A atividade de  $\alpha$ -glicosidase em *A. aegypti* mostrou alteração em todos os horários de dissecação pelo menos em um grupo teste se comparado ao grupo controle. O grupo mosquitos que tiveram os intestinos dissecados 24 horas após o repasto sanguíneo (FIGURA 22A) tiveram alteração estatisticamente significativa nos grupos que se alimentaram com sangue contendo heparina independente da sua concentração, 2 ou 150 unidades, mostrando valores bem mais altos de leitura. Em relação aos insetos dissecados às 48h (FIGURA 22B), o grupo que se alimentou novamente com sangue heparinizado, agora apenas na concentração de 2U, foi aquele que, quando comparado aos insetos que se alimentaram diretamente em hospedeiro humano, mostraram mudanças importante em relação a atividade de  $\alpha$ -glicosidase. E para o grupo de mosquitos avaliados no intervalo das 72 horas após se alimentarem, foi observada uma grande alteração na atividade de  $\alpha$ -glicosidase nos insetos que realizaram repasto com sangue contendo o EDTA como anticoagulante (FIGURA 22C).



**FIGURA 22: ATIVIDADE DE  $\alpha$ -glicosidase em *A. aegypti* utilizando-se os ANTICOAGULANTES heparina, citrato de sódio, e EDTA SEPARADOS POR TEMPO DE DISSECAÇÃO** A) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 24h após o repasto. B) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 48h após o repasto. C) Grupo controle; Grupos alimentado com Citrato de sódio; EDTA; heparina 2U/ml; heparina 150U/ml; com os intestinos dissecados às 72h após o repasto. Asteriscos significam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ) ANOVA seguido de teste Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

A classe Insecta possui mais de três quartos do número de espécies descritas de seres vivos até o momento (Grimaldi & Engel, 2005). Entretanto, apenas aproximadamente 14.000 espécies espalhadas em cerca de 400 gêneros se utilizam de sangue como fonte de alimento (Ribeiro, 1995). O hábito hematofágico colocou em contato estes artrópodes e uma gama de patógenos que são transmitidos aos seres humanos e aos animais pela a picada ou por meio de dejeções. Estes patógenos transmitidos por artrópodes responsáveis por doenças, geralmente têm uma permanência inicial, muitas vezes prolongada, no intestino médio do vetor, onde se desenvolvem e se multiplicam neste ambiente potencialmente hostil, devido a presença de enzimas digestivas e proteínas oriundas do sangue (Gass, 1977). O conhecimento dos eventos fisiológicos que ocorrem no intestino médio de artrópodes vetores é importante para entender as interações vetor-parasita necessárias para a transmissão de patógenos causadores de doenças. As vacinas que bloqueiam a transmissão de patógenos para hospedeiros vertebrados por insetos hematófagos também requerem conhecimento da sua fisiologia digestiva (Lehane, M., & Billingsley, P. 2012).

Os estudos de interação hospedeiro-patógeno em grande parte empregam a alimentação artificial para infectar os insetos. Estudos de interação entre espécies de flebotomíneos e espécies de *Leishmania* utilizam corriqueiramente infecções feitas em alimentadores artificiais, visando por exemplo esclarecer questões como a influência de vias do sistema imune inato do inseto no desenvolvimento de *Leishmania* no intestino de *L. longipalpis* (Telleria et al., 2012), a influência da microbiota no desenvolvimento de espécies de *Leishmania* no intestino de flebotomíneos (Sant'Anna et al., 2014) e o estudo de como compostos regurgitados durante a picada de flebotomíneos como o PSG exacerbam a infecção de hospedeiros vertebrados por *Leishmania* (Giraud et al., 2018). De forma semelhante, estudos utilizando-se de modelos de infecção artificial de mosquitos por arbovírus visam entender como ocorre a interação dos mesmos com seus insetos transmissores. Como exemplo, vários trabalhos realizados com *A. aegypti* que foram transfectados permanentemente com a bactéria intracelular *Wolbachia pipientis* (linhagem wMel) mostraram através de infecções artificiais que estes mosquitos com *Wolbachia* são extremamente resistentes à infecção por vírus Dengue, Chikungunya e *Plasmodium gallinaceum* (Moreira et al., 2009; Walker et al., 2011), vírus Zika (Caragata et al., 2016; Dutra et al., 2016) e vírus Mayaro (Pereira et al., 2018). Interessantemente, infecções artificiais de artrópodes vetores com diferentes patógenos necessitam da presença de anticoagulantes para possibilitar que o sangue permaneça fluido o suficiente para ser ingerido através das diferentes membranas utilizadas em alimentadores artificiais.

Estudos preliminares realizados em nosso laboratório mostraram que a escolha do anticoagulante tem influência na atividade tripsinolítica no intestino do flebotomíneo *L. longipalpis* (Silva, 2015). Este trabalho nos motivou a investigar mais a fundo a influência da escolha de anticoagulantes na atividade de tripsina e de outras enzimas intestinais dos insetos *L. longipalpis* e *A. aegypti*, vetores de importantes patógenos para seres humanos nas Américas. Neste trabalho, avaliamos o impacto de anticoagulantes comumente usados

em alimentações artificiais por membrana e a sua possível consequência para importantes proteases e carboidrases intestinais de *L. longipalpis* e *A. aegypti*. Os anticoagulantes são imprescindíveis para evitar a coagulação do sangue em experimentos cujos insetos hematófagos são alimentados em alimentadores artificiais. EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), Citrato de sódio e Heparina estão entre os mais usados em hematologia. A escolha de anticoagulantes em experimentos de atividade enzimática de insetos hematófagos é, até a data de hoje, puramente aleatória, muitas vezes optando-se pelos anticoagulantes corriqueiramente utilizados em laboratórios hematológicos. O EDTA e a heparina são anticoagulantes frequentemente utilizados na coleta de sangue, inclusive para alimentação artificial (WHO, 2012). Cada anticoagulante tem efeito diferente na cascata de coagulação. O EDTA e o citrato de sódio afetam a cascata de coagulação por quelação dos íons cálcio, necessários para a ativação do fator IX na via intrínseca e do complexo fator VII-Ca-Xa na via comum (Solart et al 2007; Patel N, 2009). A heparina liga-se à antitrombina, acelerando a inibição de proteases envolvidas na cascata da coagulação (Remaley AT, 2009)

Estudos já mostraram que flebotomíneos são capazes de selecionar e utilizar como fonte de energia alimentos com açúcar de diferentes fontes (Molyneux, D. H., & Killick-Kendrick, R. 1987) A existência de uma gama de glicosidases pode permitir que o inseto sobreviva digerindo carboidratos de diferentes espécies de plantas e possa influenciar a distribuição das populações de flebotomíneos. As  $\alpha$ -glicosidases são as glicosidases mais ativas no intestino de flebotomíneos (Dillon, R. J., & El Kordy, E. 1997). Glicosidases são as enzimas primárias para a digestão no inseto que se alimentam de plantas (Morgan, M. R. J. 1975) e a presença de atividades altas desta enzima em flebotomíneos sugere que as glicosidases também são importantes para a digestão de açúcar em outros insetos hematófagos que frequentemente se alimentam de plantas ricas em carboidratos. As  $\alpha$ -Glucosidases são encontradas em quantidades substanciais em *P. langeroni*, sendo induzida pela presença de sangue e de açúcar e provavelmente está associada à superfície microvilar do intestino médio.

Trabalhos anteriores mostraram que a atividade da  $\alpha$ -glicosidase em *Phlebotomus langeroni* alimentados com sangue humano heparinizado aumentou significativamente dentro de 1 hora após uma refeição sanguínea e foi mantida em atividades significativamente altas até 48 horas pós-alimentação, havendo queda nos os níveis de atividade basal (Dillon R. J. and El Kordy E., 1997). Nossos experimentos mostraram que *L. longipalpis* alimentados em voluntário humano (sem a presença de anticoagulantes), a atividade da  $\alpha$ -glicosidase manteve-se constante no período de 24h e 48h, decaindo às 72h após o repasto sanguíneo (figura 7). Os anticoagulantes citrato de sódio, EDTA e heparina na concentração utilizada não alteraram o perfil observado para insetos que se alimentaram diretamente no hospedeiro vertebrado, mostrando uma ligeira queda de atividade enzimática ao longo dos dias analisados, sem diferença estatística. Isto significa que a escolha de anticoagulante não exerce influência crítica na atividade de  $\alpha$ -glicosidase do intestino de *L. longipalpis*. Entretanto, como um perfil de atividade enzimática mais uniforme foi observado com o uso de heparina na concentração de 2U/mL, sugerindo-se que este anticoagulante seja o de escolha para o estudo da atividade de  $\alpha$ -glicosidase neste inseto.

A ingestão de carboidratos por flebotomíneos é muito importante para a transmissão de *Leishmania*, pois os carboidratos podem afetar o desenvolvimento da *Leishmania* no flebotomíneo e sua transmissão pela picada (Smith et al., 1941; Sherlock e Sherlock, 1961; Warburg e Schlein, 1986; Schlein et al., 1992). A absorção e metabolização de carboidratos por flebotomíneos e, eventualmente, pela infecção por *Leishmania*, demanda a digestão prévia de carboidratos para monossacarídeos (Gontijo et al. 1996). Para a atividade da glucosidase no intestino médio de *Phlebotomus langeronia*, é necessário um conjunto apropriado de glicosidases atuando dentro do tubo digestivo. Como descrito por Gontijo e colaboradores (1996), as glicosidases de *Leishmania* também podem participar na digestão de carboidratos dentro do intestino de flebotomíneos infectados.

A presença de uma  $\alpha$ -glucosidase em *L. Longipalpis* e uma sacarase em *Leishmania*, ambas especializadas na digestão de sacarose, concordam com a hipótese de que a sacarose pode ser o carboidrato principal, capaz de digestão, na dieta do flebotomíneo. O intestino médio é a única parte anatômica do tubo digestivo revestido com microvilosidades epiteliais (Billingsley, 1990) e é bastante provável que o  $\alpha$ -glucosidase do flebotomíneo seja uma enzima ligada à membrana ligada à sua superfície (Gontijo, N. F., et al., 1998).

A atividade da enzima  $\alpha$ -glucosidase observada para o mosquito *A. aegypti* foi diferente do observado para o flebotomíneo *L. longipalpis*. Billingsley, P. F., & Hecker, H. (1991) observaram em *A. aegypti* que a atividade intestinal de  $\alpha$ -glucosidase aumentou lentamente até 18h após a refeição de sangue, aumentando rapidamente até uma atividade máxima a 30 h após o repasto sanguíneo, com declínio subsequente da atividade enzimática. Neste trabalho, o perfil enzimático dos mosquitos alimentados em hospedeiros voluntários humanos mostrou um aumento progressivo na atividade ao longo do tempo, com pico de atividade a 72 horas após o repasto sanguíneo e diferença estatística entre os tempos 24 e 72 horas (Figura 11). Perfil semelhante a este pôde ser observado em mosquitos alimentados com sangue suplementado com o anticoagulante EDTA. Outro perfil semelhante mas sem diferença estatística entres os grupos foi observado em insetos alimentados artificialmente com sangue humano suplementado com citrato de sódio. Um maior desvio neste perfil enzimático foi observado em mosquitos alimentados com sangue suplementado com heparina, independentemente da concentração utilizada. Estes resultados apontam para o EDTA como o anticoagulante de escolha para o estudo da atividade de  $\alpha$ -glucosidase em *A. aegypti*.

O papel da N-acetil- $\beta$ -D-hexosaminidase é o de finalizar a digestão de quitina, atuando nos oligossacárides gerados pela quitinase. Semelhante à  $\alpha$ -glucosidase e trealase, a N-acetil- $\beta$ -D-hexosaminidase também se encontra presente em microviloidades purificadas de larvas de *L. longipalpis*, estando envolvida na digestão de glicoproteínas (Vale, V. F et al 2012). A N-acetil- $\beta$ -D-hexosaminidase, um membro da família das glicosil hidrolases, é uma enzima que participa da quebra de ligações glicosídicas de glicanos, glicoproteínas e glicolipídios (Intra, J. et al, 2008). Os insetos evoluíram para ter mais de uma  $\beta$ -N-acetil-D-hexosaminidase, como revelado por análise genica de

vários insetos, incluindo Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Phthiraptera e Hemiptera. As atividades de  $\beta$ -N-acetil-D-hexosaminidases de inseto não estão restritas à degradação de quitina, mas também estão associadas à modificação pós-traducional de N-glicanos, degradação de glicoconjugados e reconhecimento óvulo-espermatozóide, sugerindo que essas enzimas são bastante versáteis em suas funções fisiológicas no crescimento e desenvolvimento de insetos (Yang, Q., et al 2008).

Algumas dessas funções fisiológicas podem se sobrepor às mesmas enzimas encontradas em organismos superiores. As  $\beta$ -N-acetil-D-hexosaminidases lisossômicas de mamíferos são as principais responsáveis pela degradação do glicoconjugado no lisossomo (Mahuran, D. J. 1999). Da mesma forma, as  $\beta$ -N-acetil-D-hexosaminidases dos insetos *Bombyx mori* (Okada, T. et al., 2007) e *Spodoptera frugiperda* (Aumiller, J. et al., 2006) têm ampla especificidade de substrato, variando de N-glicanos a quitooligossacarídeos, sugerindo que eles têm a mesma função que seus equivalentes mamíferos. Mostrou-se que as  $\beta$ -N-acetil-D hexosaminidases de mamíferos são importantes para o reconhecimento de espermatozoides em ovo (Miranda, P. V., et al., 2000) e as enzimas da membrana de espermatozoides de *Drosophila melanogaster* também participam no mesmo processo (Cattaneo, F., et al 2006).

Em nossos estudos, observamos diferenças estatisticamente significativas de atividade enzimática de hexosaminidase a 48 horas após o repasto sanguíneo em flebotômicos alimentados em voluntário humano, com queda de atividade estatisticamente significativa a 72 horas após o repasto (figura 8). Os insetos alimentados com sangue humano suplementado com os anticoagulantes citrato de sódio e heparina na concentração de 2U/mL tiveram um perfil semelhante ao observado para insetos alimentados em voluntário humano. Para os anticoagulantes EDTA e heparina na concentração de 150 U/mL, embora o perfil enzimático tenha sido semelhante aos anteriores, não observamos diferença estatística entre os grupos. Para o mosquito *A. aegypti*, diferentes anticoagulantes não influenciaram significativamente a atividade de hexosaminidase no intestino de mosquitos fêmeas (figura 12).

Em insetos hematófagos, as atividades de aminopeptidase têm sido descritas em *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans* (Hori, K. et al., 1983), na mosca tsé-tsé (Cheeseman, M. T., & Gooding, R. H. 1985) e no intestino médio de flebotômicos, onde a atividade da aminopeptidase foi detectada após a alimentação do sangue, associada à parede do intestino médio (Dillon R. J. & Lane R. P. 1993). Embora a tripsina seja a principal protease hidrolítica primária no intestino médio de mosquitos (Briegel & Lea 1975), aminopeptidases no intestino médio de *Anopheles stephensi* (Billingsley 1990) e *Aedes aegypti* (Graf, R. & Briegel, H. 1982) também desempenham papéis importantes nos processos de digestão sanguínea. A atividade de aminopeptidases foi estudada principalmente no mosquito *Aedes aegypti*, onde a atividade desta enzima é detectável em vários níveis durante todas as fases do ciclo vital, e no intestino médio adulto, é estimulada pela presença de sangue, sendo igualmente associada com o epitélio do intestino médio e o espaço ectoperitrófico (Graf, R. & Briegel, H. 1982).

Em *L. longipalpis*, observamos a atividade de aminopeptidase semelhante para o grupo controle e o grupo alimentado com sangue suplementado com heparina a 2U/mL,

observando-se um pico de atividade a 24 horas após o repasto, com queda progressiva a 48 e 72 horas após a alimentação, observando-se diferença estatística entre todos os tempos estudados (Figura 9). Para os grupos alimentados com sangue citratado ou suplementado com heparina a 150U/mL, não conseguimos observar uma queda estatisticamente significativa de atividade enzimática entre os tempos de 24 e 48 horas após o repasto sanguíneo. No entanto, a utilização do anticoagulante EDTA causou um desvio significativo da atividade de aminopeptidase no intestino de *L. longipalpis*, com pico de atividade observado a 48 horas após o repasto, embora não estatisticamente significativo. O estudo da atividade de aminopeptidase no intestino de fêmeas de *A. aegypti* mostrou uma tendência de queda de atividade enzimática a 72 horas após o repasto em hospedeiro humano (grupo controle) e nos demais grupos utilizando-se anticoagulantes em alimentações artificiais (Figura 13). Quando os mosquitos se alimentaram com sangue contendo EDTA pudemos observar uma tendência de aumento de atividade enzimática ao longo do tempo estudado, com pico em 48 horas após o repasto. O anticoagulante heparina em ambas concentrações estudadas mostrou um perfil enzimático mais semelhante ao grupo controle (Figura 13 D e E).

As serino proteases, como as tripsinas, são as enzimas digestivas mais abundantes no intestino médio dos insetos hematófagos. Além de seu papel na digestão, essas proteases têm sido implicadas no estabelecimento de infecção de vários patógenos em seus respectivos vetores de insetos. Para o sucesso da infecção pelo *Aedes aegypti* por *Plasmodium gallinaceum*, a tripsina do intestino médio do mosquito é essencial para a ativação de uma quitinase secretada pelo parasita e necessária para o oocineto escapar da matriz peritrófica (Shahabuddin et al., 1996). Além disso, inibidores de tripsina diminuem a carga do vírus da dengue em *A. aegypti*, indicando uma relação entre infecção, digestão sanguínea e possivelmente processamento proteolítico de proteínas virais realizado por proteases do inseto (Gorochotegui-Escalante, N et al., 2005).

Em *Aedes aegypti*, Graf e Briegel (1989) mostraram, usando técnicas in vivo e in vitro, que a tripsina é sintetizada em duas formas distintas - tripsina precoce e tripsina tardia. A tripsina tardia aparece cerca de 6 a 8 horas após a alimentação e é responsável pela maior parte da atividade enzimática encontrada durante o período de pico da digestão, 20-30 horas após a alimentação. Estudos anteriores, nos quais a atividade da enzima tripsina foi medida, sugeriram que a síntese e a secreção do mosquito tripsina são reguladas por fatores associados à refeição, bem como por fatores endócrinos (Downe, 1975; Briegel e Lea 1979). Assim, Gooding (1973) mostrou que os níveis de tripsina do intestino médio são diretamente proporcionais ao tamanho da refeição sanguínea. Briegel (1975) mostrou que o tipo de proteína na refeição também desempenha um papel na determinação da quantidade de atividade de tripsina sintetizada no intestino médio. Algumas refeições proteicas, como lactalbumina, albumina de ovo e plasma sanguíneo, induziram um aumento significativo na atividade da tripsina, enquanto outras, como gelatina e histona, ou soluções salinas simples, eram indutores muito pobres. Também foi determinado que a quantidade de proteína, não o volume da refeição, controlava a quantidade de tripsina sintetizada.

De forma interessante e corroborando os achados preliminares de Silva (2015), a escolha do anticoagulante foi bastante importante para estudar a atividade tripsinolítica

no intestino de *L. longipalpis*. Em nosso estudo para *L. longipalpis*, a heparina, tanto na concentração de 2U/mg quanto na de 150u/mg, não provocou alterações significativas na atividade da tripsina comparadas ao grupo controle. Em todos estes grupos mencionados anteriormente, observamos um pico de atividade tripsinolítica a 48h após o repasto, com diferenças estatisticamente significativas entre todos os tempos de alimentação. Entretanto, a escolha de citrato de sódio e EDTA provocaram mudanças consideráveis no perfil de atividade tripsinolítica de *L. longipalpis*. Ambos anticoagulantes causaram um desvio na atividade tripsinolítica, não sendo possível observar o pico de atividade enzimática que ocorre a 48 horas após o repasto sanguíneo, como foi observado para os grupos controle e heparina (2 e 150U/mL) e como já foi anteriormente relatado na literatura para esta espécie de flebotômico (Sant'Anna et al., 2009; Santos et al., 2014). Outros desvios também puderam ser observados, como a atividade tripsinolítica em média mais reduzida em insetos alimentados com sangue suplementado com citrato de sódio e uma maior dispersão dos dados de atividade enzimática em insetos alimentados com sangue suplementado com EDTA. Interessantemente, para o mosquito *Aedes aegypti*, os grupos experimentais de mosquitos alimentados com sangue suplementado com citrato de sódio, EDTA, e heparina na concentração de 2U/mL mostraram atividade enzimática semelhante ao grupo controle alimentado em hospedeiro, sendo a atividade em torno de 48 horas após o repasto sanguíneo, o seu valor máximo. Os insetos alimentados com sangue humano heparinizado na concentração de 150U/mL obtiveram o maior desvio de atividade enzimática em comparação com o grupo controle alimentado em hospedeiro humano (Figura 14).

Helena & Garcia (1995) mostraram que a heparina apresentou menor interferência no desenvolvimento de triatomíneos e na replicação de *Trypanosoma cruzi* no intestino do inseto vetor. A heparina é comumente usada como um anticoagulante para prevenir a coagulação do sangue quando flebotômicos são alimentados com sangue via membrana (Harre et al., 2001). No entanto, para Volf (2011), heparina afeta proteases, diminuindo a atividade da tripsina 12 e 72 horas pós-alimentação em *Phlebotomus duboscqi*. Da mesma forma, Schlein e Jacobson (1998) observaram uma redução de cerca de 30% nas atividades de protease em fêmeas alimentadas com sangue heparinizado. Outros estudos mostraram o efeito inibitório da heparina em serino proteases de mamíferos (Wu et al., 1994; Finotti & Manente, 1994).

Coletivamente, nossos dados mostram que a escolha do anticoagulante é particularmente importante para o estudo de proteases intestinais de fêmeas de insetos nematóceros como a *L. longipalpis* e *A. aegypti*.

## 7 PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados nesta dissertação são de interesse direto para pesquisadores que estudam enzimas digestivas em artrópodes hematófagos. Em vários experimentos de fisiologia intestinal, compostos que supostamente alteram metabolicamente o intestino destes artrópodes são administrados através de experimentos de repasto artificial. Para manter o sangue fluido o suficiente para que o mesmo seja ingerido com sucesso, o uso de um anticoagulante é essencial. Até o momento, a escolha de anticoagulantes é feita de maneira aleatória, sem considerar a influência destes compostos na atividade enzimática que está sendo estudada. Nossos resultados mostraram que a escolha do anticoagulante em repastos artificiais influenciam principalmente a atividade proteolítica nos intestinos dos insetos hematófagos *L. longipalpis* (vetor urbano de *L. infantum* nas Américas) e *A. aegypti* (principal vetor urbano de arboviroses a humanos nas Américas). A atividade tripsinolítica em *L. longipalpis* foi a que sofreu a maior influência da escolha do anticoagulante. O uso de heparina na concentração de 2U/mL foi a que causou menos desvio da atividade observada para insetos alimentados em hospedeiro humano sem a presença de anticoagulantes. Estes resultados serão importantes para alertar pesquisadores da área de fisiologia intestinal de insetos hematófagos quanto à importância da escolha de anticoagulantes nos estudos de atividade enzimática intestinal. Além disso, infecções artificiais são feitas com a presença de anticoagulantes suplementados ao sangue e parasitos. O estudo da influência da escolha de anticoagulantes no desenvolvimento de patógenos no intestino destes insetos torna-se importante para que conclusões experimentais não sejam mascaradas pela influência direta da ação de um anticoagulante em experimentos de fisiologia intestinal de insetos hematófagos ou de interação vetor-patógeno.

## 8 CONCLUSÕES

- A utilização do anticoagulante heparina na concentração de 2U/mL resultou em uma atividade de  $\alpha$ -glicosidase estatisticamente mais baixa a 72 horas após o repasto sanguíneo, com perfil de atividade enzimática mais uniforme, sugerindo este ser o anticoagulante de escolha para o estudo da atividade de  $\alpha$ -glicosidase em *L. longipalpis*.
- Nossos experimentos apontam para o EDTA como o anticoagulante de escolha para o estudo da atividade de  $\alpha$ -glicosidase intestinal de *A. aegypti*, uma vez que o perfil enzimático observado para este coagulante se assemelha ao perfil observado para insetos alimentados em hospedeiro humano.
- Nossos experimentos apontam para o citrato de sódio e heparina (2U/mL) como os anticoagulantes de escolha para o estudo da atividade de hexosaminidase intestinal de *L. longipalpis*, uma vez que o perfil enzimático observado para este coagulante se assemelha ao perfil observado para insetos alimentados em hospedeiro humano.
- A escolha de um anticoagulante parece não influenciar a atividade de hexosaminidase intestinal de *A. aegypti*.
- Nossos experimentos apontam para a heparina (2U/mL) como o anticoagulante de escolha para o estudo da atividade de aminopeptidase intestinal de *L. longipalpis* e *A. aegypti*.
- A escolha do anticoagulante causou um grande impacto na atividade tripsinolítica intestinal de *L. longipalpis*, sendo que heparina (nas concentrações de 2U/mL e 150U/mL) é o anticoagulante de escolha para estudo desta atividade nesta espécie de flebotomíneo.
- Nossos experimentos apontam para o citrato de sódio e EDTA como os anticoagulantes de escolha para o estudo da atividade tripsinolítica intestinal de *A. aegypti*.

## 9 REFERÊNCIAS

- Abubakar, A., Ruiz-Postigo, J. A., Pita, J., Lado, M., Ben-Ismael, R., Argaw, D., & Alvar, J. (2014). Visceral leishmaniasis outbreak in South Sudan 2009–2012: epidemiological assessment and impact of a multisectoral response. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(3), e2720
- Aguiar, G. M. D., & Medeiros, W. M. D. (2003). Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In *Flebotomíneos no Brasil* (pp. 207-255).
- Aguiar, G. M. D., Vilela, M. L., & Lima, R. B. (1987). Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro: food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82(4), 583-584
- Alexander, B. (2000). Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(2), 109-122
- Almeida, P. S. D., Minzão, E. R., Minzão, L. D., Silva, S. R. D., Ferreira, A. D., Faccenda, O., & Andrade Filho, J. D. (2010). Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. ALVAR, J. et al. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*. v. 31. 2013.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M de 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7.
- Andrade, A. (2010). *Ecologia química de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies* (Doctoral dissertation, PhD thesis. Brazil: Universidade Federal de Minas Gerais).
- Applebaum S. W. (1985) Biochemistry of digestion. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. I.)
- Attardo, G.M.; Hansen, I.A.; Raikhel, A.S. 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 661 – 675.
- Aumiller, J. J., Hollister, J. R., & Jarvis, D. L. (2006). Molecular cloning and functional characterization of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase genes from Sf9 cells. *Protein expression and purification*, 47(2), 571-590.
- Azevedo, P. C. B., Lopes, G. N., Fonteles, R. S., Vasconcelos, G. C., Moraes, J. L. P., & Rebêlo, J. M. M. (2011). The effect of fragmentation on phlebotomine communities (Diptera: Psychodidae) in areas of ombrophilous forest in São Luís, state of Maranhão, Brazil. *Neotropical entomology*, 40(2), 271-277.
- BARBOSA, G. L.; LOURENÇO, R. W. Análise da distribuição espaço-temporal de dengue e da infestação larvária no município de Tupã, Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 43, n. 2, mar. 2010.

Barillas-Mury CV, Noriega FG, Wells MA. 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*. 1995 Feb;25(2):241-6.

Barillas-Mury, C. V., Noriega, F. G., & Wells, M. A. (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 Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2), 241-246.

Barillas-Mury, C., Graf, R., Hagedorn, H. H., & Wells, M. A. (1991). cDNA and deduced amino acid sequence of a blood meal-induced trypsin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry*, 21(8), 825-831.

Billingsley, P. F., & Lehane, M. J. (1996). Structure and ultrastructure of the insect midgut. In *Biology of the insect midgut* (pp. 3-30). Springer, Dordrecht.

Brandon MC, Pennington JE, Isoe J, Zamora J, Schillinger AS, Miesfeld RL. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008 Oct;38(10):916-22.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças Infecciosas e Parasitárias:Guia de Bolso. 8ª ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010a.

Briegel, H. (1975). Excretion of proteolytic enzymes by *Aedes aegypti* after a blood meal. *Journal of insect physiology*, 21(10), 1681-1684.

Briegel, H., & Lea, A. O. (1975). Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 21(9), 1597-1604.

Briegel, H., & Lea, A. O. (1979). Influence of the endocrine system on tryptic activity in female *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 25(3), 227-230.

Briegel, H., & Lea, A. O. (1979). Influence of the endocrine system on tryptic activity in female *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 25(3), 227-230.

Caragata, E. P., Dutra, H. L. C., & Moreira, L. A. (2016). Inhibition of Zika virus by *Wolbachia* in *Aedes aegypti*. *Microbial cell*, 3(7), 293.

Cattaneo, F., Pasini, M. E., Intra, J., Matsumoto, M., Briani, F., Hoshi, M., & Perotti, M. E. (2006). Identification and expression analysis of *Drosophila melanogaster* genes encoding  $\beta$ -hexosaminidases of the sperm plasma membrane. *Glycobiology*, 16(9), 786-800.

Chanotis, B. N. (1974). Sugar-feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *Journal of Medical Entomology*, 11(1), 73-79.

Cheeseman, M. T., & Gooding, R. H. (1985). Proteolytic enzymes from tsetse flies, *Glossina morsitans* and *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochemistry*, 15(6), 677-680.

- Consoli, R. A., & de Oliveira, R. L. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. SciELO-Editora FIOCRUZ.
- Cotton JA. The Expanding World of Human Leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2017 May;33(5):341-344. doi: 10.1016/j.pt.2017.02.002. Epub 2017 Mar 17. PubMed PMID: 28319012.
- Deng, L., Koou, S. Y., Png, A. B., Ng, L. C., & Lam-Phua, S. G. (2012). A novel mosquito feeding system for routine blood-feeding of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Trop Biomed*, 29(1), 169-74.
- Deng, L., Koou, S. Y., Png, A. B., Ng, L. C., & Lam-Phua, S. G. (2012). A novel mosquito feeding system for routine blood-feeding of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Trop Biomed*, 29(1), 169-74.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(5), 305-318.
- Diaz-Albiter, H., Sant'Anna, M. R., Genta, F. A., & Dillon, R. J. (2012). Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23995-24003.
- Dillon, R. J., & El Kordy, E. (1997). Carbohydrate digestion in sandflies:  $\alpha$ -glucosidase activity in the midgut of *Phlebotomus langeroni*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 116(1), 35-40.
- Dillon, R. J., & El Kordy, E. (1997). Carbohydrate digestion in sandflies:  $\alpha$ -glucosidase activity in the midgut of *Phlebotomus langeroni*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 116(1), 35-40.
- Dillon, R. J., & Lane, R. P. (1993). Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitology research*, 79(6), 492-496.
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, 5(1), 276.
- Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol.* 2011 Apr;41(5):571-9. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.12.008. Epub 2011 Jan 18. PubMed PMID: 21251914.
- Downe, A. E. R. (1975). Internal regulation of rate of digestion of blood meals in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of insect physiology*, 21(11), 1835-1839.
- Dutra, H. L. C., Rocha, M. N., Dias, F. B. S., Mansur, S. B., Caragata, E. P., & Moreira, L. A. (2016). *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell host & microbe*, 19(6), 771-774.
- Edwards, M. J., Moskalyk, L. A., Donnelly-Doman, M., Vlaskova, M., Noriega, F. G., Walker, V. K., & Jacobs-Lorena, M. (2000). Characterization of a carboxypeptidase A gene from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*, 9(1), 33-38.

- Ferdowsian, H. R., & Beck, N. (2011). Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. *PloS one*, 6(9), e24059.
- Ferro, C., Cárdenas, E., Corredor, D., Morales, A., & Munstermann, L. E. (1998). Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar)(Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(2), 195-199.
- Finotti, P., & Manente, S. (1994). Heparin-induced structural and functional alterations of bovine trypsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1207(1), 80-87.
- Fisk, F. W. (1950). Studies on proteolytic digestion in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Annals of the Entomological Society of America*, 43(4), 555-572.
- Fisk, F. W., & Shambaugh, G. F. (1952). Protease activity in adult *Aedes aegypti* mosquitoes as related to feeding.
- Galati, E. A., Nunes, V. L., Rego Jr, F. D. A., Oshiro, E. T., & Rodrigues Chang, M. (1997). Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 31, 378-390
- Gass, R. F. (1977). *Einfluss der Blutverdauung auf die Entwicklung von 'Plasmodium gallinaceum'(Brumpt) im Mitteldarm von 'Aedes aegypti'(L.)* (Doctoral dissertation, Verlag nicht ermittelbar).
- Giraud, E., Lestinova, T., Derrick, T., Martin, O., Dillon, R. J., Volf, P., ... & Rogers, M. E. (2018). *Leishmania proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling. PLoS pathogens*, 14(1), e1006794.
- Gloria-Soria, A., Ayala, D., Bheecarry, A., Calderon-Arguedas, O., Chadee, D. D., Chiappero, M., ... & Kamgang, B. (2016). Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Molecular ecology*, 25(21), 5377-5395.
- Gontijo, N. F., Almeida-Silva, S., Costa, F. F., Mares-Guia, M. L., Williams, P., & Melo, M. N. (1998). *Lutzomyia longipalpis*: pH in the Gut, Digestive Glycosidases, and Some Speculations upon *Leishmania* Development. *Experimental parasitology*, 90(3), 212-219.
- Gontijo, N. F., Almeida-Silva, S., Costa, F. F., Mares-Guia, M. L., Williams, P., & Melo, M. N. (1998). *Lutzomyia longipalpis*: pH in the Gut, Digestive Glycosidases, and Some Speculations upon *Leishmania* Development. *Experimental parasitology*, 90(3), 212-219.
- Gooding, R. H. (1966). Physiological aspects of digestion of the blood meal by *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex fatigans* Wiedemann. *Journal of medical entomology*, 3(1), 53-60.
- Gooding, R. H. (1969). *Studies on proteinases from some blood-sucking insects*. ALBERTA UNIV EDMONTON DEPT OF ENTOMOLOGY
- Gooding, R. H. (1973). The digestive processes of haematophagous insects: IV. Secretion of trypsin by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *The Canadian Entomologist*, 105(4), 599-603.

- Gorrochotegui-Escalante, N., Lozano-Fuentes, S., Bennett, K. E., Molina-Cruz, A., Beaty, B. J., & BlackIV, W. C. (2005). Association mapping of segregating sites in the early trypsin gene and susceptibility to dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(7), 771-788.
- Graça-Souza, A. V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G. O., Braz, G. R., Paes, M. C., Sorgine, M. H., ... & Oliveira, P. L. (2006). Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(4), 322-335.
- Graf, R., & Briegel, H. (1989). The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) and in vitro stimulation in isolated midguts. *Insect Biochemistry*, 19(2), 129-137.
- Graf, R., Binz, H., & Briegel, H. (1988). Monoclonal antibodies as probes for *Aedes aegypti* trypsin. *Insect biochemistry*, 18(5), 463-470.
- Graf, R., Raikhel, A. S., Brown, M. R., Lea, A. O., & Briegel, H. (1986). Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). *Cell and tissue research*, 245(1), 19-27.
- Grimaldi, D., Engel, M. S., & Engel, M. S. (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
- Harre, J. G., Dorsey, K. M., Armstrong, K. L., Burge, J. R., & Kinnamon, K. E. (2001). Comparative fecundity and survival rates of *Phlebotomus papatasi* sandflies membrane fed on blood from eight mammal species. *Medical and Veterinary Entomology*, 15(2), 189-196.
- HAYES, E. B. Zika Virus Outside Africa. **Emerg Infect Dis**, v.15, n. 9, p.1347–50, set. 2009.
- Helena A, Garcia I (1995). Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial, em chagásicos crônicos. 28: 367–373.
- HORI, K., HORI, Y., & KURAMOCHI, K. (1983). DEAE-cellulose chromatography of trypsin-like enzyme and aminopeptidase in the midgut of the adult horn fly, *Haematobia irritans* (L.)(Diptera: Muscidae) and the adult stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L.)(Diptera: Muscidae). *Applied entomology and zoology*, 18(3), 432-435.
- Intra, J., Pavesi, G., & Horner, D. S. (2008). Phylogenetic analyses suggest multiple changes of substrate specificity within the glycosyl hydrolase 20 family. *BMC evolutionary biology*, 8(1), 214.
- Jiang, Q., Hall, M., Noriega, F. G., & Wells, M. (1997). cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(4), 283-289.
- Kalhok, S. E., Tabak, L. M., Prosser, D. E., Brook, W., Downe, A. E. R., & White, B. N. (1993). Isolation, sequencing and characterization of two cDNA clones coding for trypsin-like enzymes from the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*, 2(2), 71-79.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990 Jan;4(1):1-24. Review. PubMed PMID: 2132963.

Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990;65 Suppl 1:37-42. Review. PubMed PMID: 2264679.

Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*, 4(1), 1-24.

Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Bortel W Van, Hendrickx G, Schaffner F, Elyazar IR, Teng HJ, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL, William Wint GR, Golding N, Hay SI 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife* 4: 1–18.

Lawyer, P. G., Ngumbi, P. M., Anjili, C. O., Odongo, S. O., Mebrahtu, Y. B., Githure, J. I., ... & Roberts, C. R. (1990). Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 43(1), 31-43

Lehane, M. J. (1991). Biology of blood sucking insects. *Harper Collins Academy*

Lehane, M., & Billingsley, P. (Eds.). (2012). *Biology of the insect midgut*. Springer Science & Business Media.

Leite, A. C. R.; Williams, P. (1997). The First Instar larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 2, p. 197-203.

Leta, S., Beyene, T. J., De Clercq, E. M., Amenu, K., Kraemer, M. U., & Revie, C. W. (2018). Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases*, 67, 25-35.

Lusiyana, N., Mulyaningsih, B., & Umniyati, S. R. (2015). The effect of anticoagulant in blood meal source on the *Aedes aegypti* reproductive ability in laboratory. *Tropical Medicine Journal*, 3(2).

Mahuran, D. J. (1999). Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1455(2-3), 105-138.

Maia-Elkhoury, A. N. S., Carmo, E. H., Sousa-Gomes, M. L., & Mota, E. (2007). Análise dos registros de leishmaniose visceral pelo método de captura-recaptura. *Revista de Saúde Pública*, 41(6), 931-937.

Miranda, P. V., González-Echeverría, F., Blaquier, J. A., Mahuran, D. J., & Tezón, J. G. (2000). Evidence for the participation of  $\beta$ -hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction in vitro. *Molecular human reproduction*, 6(8), 699-706.

Modi, G. B. (1997). Care and maintenance of phlebotomine sandfly colonies. In *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors* (pp. 21-30). Springer, Dordrecht.

- Molyneux, D. H., & Killick-Kendrick, R. (1987). Morphology, ultrastructure and life cycles. *The leishmaniasis in biology and medicine*, 1, 121-176.
- Mondal, F. (2012) Leishmaniasis vector control in Bangladesh: Durable effect on sand fly density. *Public Health Journal* V.23, P. 31-35.
- Monteiro, C. C. (2012). O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada (Doctoral dissertation).
- Moraes, A. M., Jorge, S. A., Astray, R. M., Suazo, C. A., Riquelme, C. E. C., Augusto, E. F., ... & Pereira, C. A. (2012). *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: from gene cloning to bioprocess development. *Biotechnology advances*, 30(3), 613-628.
- Morales, A., Bello, F., Cárdenas, E.;(2005). Establecimiento, mantenimiento y productividad de una colonia de laboratorio de *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno y Hoyos, 1969 (Diptera: Psychodidae) en Colombia. *Revista Ciencias de la Salud*, 3(2).
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., ... & Hugo, L. E. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268-1278.
- Morgan, M. R. J. (1975). Relationship between gut cellobiase, lactase, aryl  $\beta$ -glucosidase, and aryl  $\beta$ -galactosidase activities of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry*, 5(5), 609-617.
- Naksathit, A. T., Edman, J. D., & Scott, T. W. (1999). Amounts of glycogen, lipid, and sugar in adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fed sucrose. *Journal of medical entomology*, 36(1), 8-12.
- Natal D 2002. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico* 64: 205–207
- Noriega FG, Barillas-Mury C, Wells MA. Dietary control of late trypsin gene transcription in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 1994 Jun;24(6):627-31.
- Noriega FG, Colonna AE, Wells MA. Increase in the size of the amino acid pool is sufficient to activate translation of early trypsin mRNA in *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochem Mol Biol*. 1999 Mar;29(3):243-7.
- Noriega FG, Edgar KA, Bechet R, Wells MA. Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. *J Insect Physiol*. 2002 Feb;48(2):205-212.
- Noriega FG, Pennington JE, Barillas-Mury C, Wang XY, Wells MA. *Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding. *Insect Mol Biol*. 1996 Feb;5(1):25-9.
- Noriega FG, Wang XY, Pennington JE, Barillas-Mury CV, Wells MA. Early trypsin, a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, aminoterminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. *Insect Biochem Mol Biol*. 1996 Feb;26(2):119-26.

- Noriega FG, Wells MA. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 1999 Jul;45(7):613-620.
- Noriega, F. G., Barillas-Mury, C., & Wells, M. A. (1994). Dietary control of late trypsin gene transcription in *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 24(6), 627-631.
- Noriega, F. G., Edgar, K. A., Bechet, R., & Wells, M. A. (2002). Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. *Journal of insect physiology*, 48(2), 205-212.
- Noriega, F. G., Edgar, K. A., Goodman, W. G., Shah, D. K., & Wells, M. A. (2001). Neuroendocrine factors affecting the steady-state levels of early trypsin mRNA in *Aedes aegypti*. *Journal of insect physiology*, 47(4-5), 515-522.
- Noriega, F. G., Wang, X. Y., Pennington, J. E., Barillas-Mury, C. V., & Wells, M. A. (1996). Early trypsin, a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, amino-terminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. *Insect biochemistry and molecular biology*, 26(2), 119-126.
- Okada T., Ishiyama S., Sezutsu H., Usami A., Tamura T., Mita K., Fujiyama K., Seki T. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1626–1635
- Oliveira, A. G. D., Andrade Filho, J. D., Falcão, A. L., & Brazil, R. P. (2003). Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cadernos de Saúde Pública*, 19, 933-944.
- Patel N. Why is EDTA the anticoagulant of choice for haematology use. Tech Talk, 2009; 7(1).
- Pereira, H. W. B. (2018). *Caracterização genética do vírus Chikungunya circulante no Estado do Rio Grande do Norte* (Master's thesis, Brasil).
- Pimenta, P. F. P., Modi, G. B., Pereira, S. T., Shahabuddin, M., & Sacks, D. L. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 115(4), 359-369.
- POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **J Gen Virol**, v.88, n. 9, p. 2363–77, set.2007.
- Pruzinova, K., Sadlova, J., Myskova, J., Lestinova, T., Janda, J., & Volf, P. (2018). *Leishmania* mortality in sand fly blood meal is not species-specific and does not result from direct effect of proteinases. *Parasites & vectors*, 11(1), 37.
- Raikhel, A.S.; Kokoza, V.A.; Zhu, J.; Martin, D.; Wang, S.F.; Li, C.; Sun, G.; Ahmed, A.; Dittmer, N.; Attardo, G. 2002. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:1275-86.
- Ribeiro, J. M. C. (1995). Insect saliva: function, biochemistry, and physiology. In *Regulatory mechanisms in insect feeding* (pp. 74-97). Springer, Boston, MA.

- Samie, M., Wallbanks, K. R., Moore, J. S., & Molyneux, D. H. (1990). Glycosidase activity in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 96(3), 577-579.
- Sant'Anna, M. R., Darby, A. C., Brazil, R. P., Montoya-Lerma, J., Dillon, V. M., Bates, P. A., & Dillon, R. J. (2012). Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. *Plos one*, 7(8), e42531.
- Sant'Anna, M. R., Diaz-Albiter, H., Aguiar-Martins, K., Al Salem, W. S., Cavalcante, R. R., Dillon, V. M., ... & Dillon, R. J. (2014). Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasites & vectors*, 7(1), 329.
- Sant'Anna, M. R., Diaz-Albiter, H., Mubarak, M., Dillon, R. J., & Bates, P. A. (2009). Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasites & vectors*, 2(1), 62.
- Santos, V. C., Vale, V. F., Silva, S. M., Nascimento, A. A. S., Saab, N. A. A., Soares, R. P. P., ... & Gontijo, N. F. (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.
- Schlein, Y., & Jacobson, R. L. (1998). Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology*, 117(5), 467-473.
- Schlein, Y., & Jacobson, R. L. (1998). Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology*, 117(5), 467-473.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., & Messer, G. (1992). *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), 9944-9948.
- Seblova V, Sadlova J, Vojtkova B, Votypka J, Carpenter S, Bates PA, Volf P. The Biting Midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) Is Capable of Developing Late Stage Infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Sep 14;9(9):e0004060. doi: 10.1371/journal.pntd.0004060. eCollection 2015.
- Shahabuddin, M. (1998). Plasmodium ookinete development in the mosquito midgut: a case of reciprocal manipulation. *Parasitology*, 116(S1), S83-S93.
- Sherlock, I. A., & Sherlock, V. A. (1961). On the experimental infection of " *Phlebotomus longipalpis*" by " *Leishmania donovani*". *Revista brasileira de biologia*, 21(4).
- Silva, C. P., Lemos, F. J. A., & da Silva, J. R. (2012). CAPÍTULO 5 Digestão em Insetos. —
- SILVA, D. A. D., Madeira, M. D. F., & Figueiredo, F. B. (2015). Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(5), 435-438.

- SIMMONS, C. P. et al. Dengue. *New England Journal of Medicine.*, v. 366, n. 15, p. 1423–32, abr. 2012.
- Smith, R. O. A., Halder, K. C., & Ahmed, I. (1941). Further Investigations on the Transmission of Kala-azar. Part VI. A second Series of Transmissions of *L. donovani* by *P. argentipes*. *Indian Journal of Medical Research*, 29(4).
- Solarte, Y., del Rosario Manzano, M., Rocha, L., Castillo, Z., James, M. A., Herrera, S., & Arévalo-Herrera, M. (2007). Effects of anticoagulants on *Plasmodium vivax* oocyst development in *Anopheles albimanus* mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(2), 242-245.
- STAPLES, J. E.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. **Clin Infect Dis.**, v.49, n. 6, p. 942–8, set. 2009.
- Telleria, E. L. (2007). Caracterização de tripsinas em *Lutzomyia longipalpis*: principal vetor da leishmaniose visceral no Brasil.
- Telleria, E. L., de Araújo, A. P. O., Secundino, N. F., d'Avila-Levy, C. M., & Traub-Csekö, Y. M. (2010). Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*—expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. *PLoS One*, 5(5), e10697.
- Telleria, E. L., Sant'Anna, M. R., Ortigão-Farias, J. R., Pitaluga, A. N., Dillon, V. M., Bates, P. A., ... & Dillon, R. J. (2012). Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in sand fly host *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16), 12985-12993.
- Terra, W. R., & Ferreira, C. (1983). Further evidence that enzymes involved in the final stages of digestion by *Rhynchosciara* do not enter the endoperitrophic space. *Insect Biochemistry*, 13(2), 143-150.
- Terra, W. R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 109(1), 1-62.
- Terra, W. R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 109(1), 1-62.
- Tesh, R. B. (1988). The genus *Phlebovirus* and its vectors. *Annual review of entomology*, 33(1), 169-181
- Vale, V. F., Moreira, B. H., Moraes, C. S., Pereira, M. H., Genta, F. A., & Gontijo, N. F. (2012). Carbohydrate digestion in *Lutzomyia longipalpis*' larvae (Diptera–Psychodidae). *Journal of insect physiology*, 58(10), 1314-1324.
- Volf, P., & Volfova, V. (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36, S1-S9.
- Volf, P., & Volfova, V. (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36, S1-S9.

- Walker, T., & Moreira, L. A. (2011). Can Wolbachia be used to control malaria?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 212-217.
- Warburg, A., & Schlein, Y. (1986). The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 35(5), 926-930.
- WHO 2014. Leishmaniasis.
- Wu, Y. I., Sheffield, W. P., & Blajchman, M. A. (1994). Defining the heparin-binding domain of antithrombin. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, 5(1), 83-95.
- Y.J. Yang, D.M. Davis Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin *J. Insect Physiol.*, 17 (1971), pp. 117-131
- Yang, Q., Liu, T., Liu, F., Qu, M., & Qian, X. (2008). A novel  $\beta$ -N-acetyl-d-hexosaminidase from the insect *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *The FEBS journal*, 275(22), 5690-5702.
- Zara AL de SA, Santos SM dos, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE 2016. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol. e Serviços Saúde* 25: 1–2
- Zhou, G., Pennington, J. E., & Wells, M. A. (2004). Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(9), 919-925.
- Ziegler, R., & Ibrahim, M. M. (2001). Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of insect physiology*, 47(6), 623-627.