

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

LUCCAS GABRIEL FERREIRA MALTA

"MECANISMOS DE ALCALINIZAÇÃO INTESTINAL DE *Lutzomyia longipalpis*: VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E MECANISMOS INDUTORES DE ALCALINIZAÇÃO"

Belo Horizonte

2025

LUCCAS GABRIEL FERREIRA MALTA

"MECANISMOS DE ALCALINIZAÇÃO INTESINAL DE *Lutzomyia longipalpis*: VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E MECANISMOS INDUTORES DE ALCALINIZAÇÃO"

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

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Coorientador: Dr. Maurício Roberto Viana
Sant'anna

Belo Horizonte

2025

043

Malta, Luccas Gabriel Ferreira.

Mecanismos de alcalinização intestinal de *Lutzomyia longipalpis*: vias de sinalização celular e mecanismos indutores de alcalinização [manuscrito] / Luccas Gabriel Ferreira Malta. – 2025.

194 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo. Coorientador: Dr. Maurício Roberto Viana Sant'anna.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Psychodidae. 3. Intestinos. 4. Alcalinização. 5. Polietilenoglicóis. I. Gontijo, Nelder de Figueiredo. II. Sant'anna, Maurício Roberto Viana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

TÍTULO DA TESE:

**"MECANISMOS DE ALCALINIZAÇÃO INTestinal DE LUTZOMYIA LONGIPALPIS:
VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E MECANISMOS INDUTORES DE
ALCALINIZAÇÃO"**

ALUNO: LUCCAS GABRIEL FERREIRA MALTA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENTOMOLOGIA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **onze de abril de 2025**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Alessandra Aparecida Guarneri

Membro externo - IRR/FIOCRUZ

Pedro Lagerblad de Oliveira

Membro externo - UFRJ

Theo Rolla Paula Mota

Membro interno - UFMG

Thiago de Castro Gomes

Membro interno - UFMG

Mauricio Roberto Viana Sant'Anna

Coorientador - UFMG

Nelder de Figueiredo Gontijo

Orientador - UFMG

Belo Horizonte, 11 de abril de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Nelder de Figueiredo Gontijo, Professor do Magistério Superior**, em 17/04/2025, às 08:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauricio Roberto Viana Sant Anna, Membro de comissão**, em 23/04/2025, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Lagerblad De Oliveira, Usuário Externo**, em 23/04/2025, às 20:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Aparecida Guarnieri, Usuária Externa**, em 24/04/2025, às 15:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Theo Rolla Paula Mota, Professor do Magistério Superior**, em 15/05/2025, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago de Castro Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 23/05/2025, às 10:46, 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, informando o código verificador **4057061** e o código CRC **654AC571**.

Aos meus pais, Silvio e Isabel

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A **Deus**, por tudo que sou, por tudo que tenho, e por sempre me conceder suas bênçãos e dons.

Aos meus pais, **Silvio e Isabel**, a quem dedico com muito amor e carinho esta tese. Vocês nunca mediram esforços para me proporcionar tudo o que de melhor conseguissem. Dentre tantas dificuldades inerentes à vida, sempre priorizaram acima de tudo minha educação, se hoje estou aqui, em uma das melhores universidades do país, em um dos melhores e maiores centros de pesquisa da América Latina, é porque vocês sempre acreditaram que a educação transforma, e acreditaram que ela podia me fazer maior e melhor. Agradeço por seus ensinamentos, pelos valores transmitidos, por sempre apoiarem e acreditarem em meus sonhos, por todo amor incondicional. Embora nem sempre consiga transmitir meu dia-a-dia, saibam que toda minha realização profissional se deve a vocês. Amo vocês!!!

À minha família, a todos os **tios (as) e primos (as)**, que desde o início de minha vida acadêmica, mesmo com a distância, sempre encontraram uma forma de se tornarem presentes. Em especial agradeço ao primo **Alysson Malta**, por diversos motivos, mas principalmente por se mostrar tão presente na vida de meus pais na minha ausência.

À minha namorada, **Miriam Alves**, por todo apoio e amor. Você esteve ao meu lado durante os quatro anos de realização deste trabalho, sempre acreditando em mim, no meu potencial, me incentivando a voar cada vez mais alto, acreditando incondicionalmente nos meus sonhos. Nos dias de cansaço você foi carinho e alento. Também gostaria de te agradecer por ser tão presente na vida de meus pais, muitas vezes fazendo um papel que deveria ser meu, nunca vou conseguir colocar em palavras minha gratidão por tantas atitudes abnegadas que você tem para comigo e para com eles. Muito obrigado por tornar essa trajetória mais calma, amena e alegre. Amo muito você!

Aos amigos de apartamento, que aqui se tornaram uma família. **Matheus, Pedro, Rhuan, Lucas e Shoske**, a amizade e companheirismo de vocês foi de extrema importância para a realização pessoal do Luccas profissional, porque saber que chegaria em casa e teria um ambiente tranquilo, com boas conversas, com uma amizade verdadeira, fazia toda diferença ao final de um dia cansativo. Muito obrigado pela amizade e por se tornarem parte da minha família.

Aos amigos de toda hora, o grupo dos casais, aqueles que sempre reclamam, mas sempre estão presentes: **Artur, Isabela, Livia e Pedro**. Embora vocês não tenham participado diretamente das questões científicas dessa tese, participaram enormemente das questões pessoais da pessoa responsável por ela responsável. Ter amigos que te tirem da rotina, que te fazem rir e que vibrem com suas conquistas é uma dádiva de poucos, dos quais tenho o maior orgulho de falar que faço parte. Muito obrigado por tudo.

Ao meu orientador, **Nelder Gontijo**, por acreditar no sonho de um menino de 17 anos, que vinha do interior sem nada entender sobre pesquisa, sobre academia, sobre muitos dos aspectos relacionados à vida científica. O senhor nutriu nesse menino o sonho de se tornar professor, de se tornar pesquisador, o sonho de transformar o mundo e as pessoas no simples ato de ensinar. O seu amor e dedicação em ensinar foi o que me cativou ainda no primeiro semestre de biologia, e com certeza é o que eu espero um dia conseguir transmitir para meus alunos. Fazem dez anos que o senhor abriu as portas do seu laboratório para um aluno inexperiente e perdido em um mundo completamente novo, e com todo cuidado e atenção, me guiou pelo caminho da ciência, fazendo com que eu me apaixonasse cada vez mais pela arte de pesquisar e ensinar. Obrigado pela confiança e por todos os ensinamentos. Reforço o que disse na minha dissertação de mestrado: professor é quem demonstra tamanha paixão pelo que faz, que cativa todos aqueles ao seu redor, o que o senhor faz de maneira excepcional.

Aos demais professores do LFIH, em especial ao **Maurício**, que ao longo destes dez anos foi meu co-orientador, e a exemplo do professor Nelder, sempre confiou no meu trabalho, na minha pessoa e sempre me incentivou a buscar sempre mais. Lembro com muita alegria do meu primeiro trabalho como coautor, trabalho este que só tive a oportunidade de participar graças ao seu incentivo e confiança.

Ao **César Nonato**, são dez anos de convivência, e dez anos de uma amizade sem igual. César com seu jeito carinhoso, atencioso e acima de tudo resiliente, é aquela pessoa com quem você pode contar para todas as horas. Muito obrigado por fazer parte dessa minha formação acadêmica, mas acima de tudo, por participar e contribuir de uma forma imensurável da minha formação pessoal.

A toda equipe do **LFIH** que, nas mais diferentes pessoas que por aqui passaram ao longo desses dez anos, se tornou minha família. Foram vários os ensinamentos, tanto científicos quanto pessoais. Muito obrigado a cada um que, nas suas particularidades e singularidades, deixaram

marcas e ensinamento que levarei pra vida toda. Ressalto aqui que ter um ambiente leve e tranquilo como o LFIH faz toda diferença durante o processo de doutoramento. Gostaria, porém, de deixar um agradecimento especial a algumas pessoas que tonaram a caminha menos árdua e cansativa: **Natália, Luiza, Luísa e Daniel**, embora já não estejam mais aqui no laboratório, assim como eu, fazem parte da velha guarda, a amizade e companheirismo de vocês sempre tornou tudo mais leve e divertido; **Davi, Letícia e Isabella**, ainda presentes no laboratório fazem parte da bagunça minha bagunça diária, do café ao almoço, as risadas e palhaçadas com vocês é um respiro de alívio; e por fim a **Bianca Stacanelli**, que durante meu doutorado participou ativamente da minha pesquisa como aluna de iniciação científica. Muito obrigado por todo apoio nos experimentos, por confiar na minha orientação e por acreditar neste trabalho. Este trabalho também é seu. MUITÍSSIMO obrigado a todos vocês!

Ao **Laboratório Multiusuários de Proteômica – LMProt**, pela disponibilização da plataforma para as análises de espectrometria de massa. Agradeço também a técnica **Adriana Raabe** e ao técnico **Jamil Silvano**, que com muita atenção e carinho me auxiliaram na execução de técnicas essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

As secretárias do PPG-Parasitologia, **Sumara e Sibeles**, que sempre me trataram com tanto amor e carinho. Vocês são o coração do nosso programa, agradeço a vocês em nome de todos os alunos do PPG.

Ao Programa de **Pós-Graduação em Parasitologia (PPG-Par)**, pela oportunidade e pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de fomento **CNPq, FAPEMIG e CAPES**, bem como ao **INCT-EM**, pelo suporte financeiro garantido à execução desta tese.

A todos que de alguma maneira se fizeram presentes na minha vida ao longo destes quatro anos de doutoramento, nas mais simples palavras, nos mais simples gestos, se cheguei onde estou, foi graças ao apoio de vocês. Meu muito obrigado!

“O senhor saiba: eu toda a minha vida pensei por mim, sou nascido diferente. Eu sou é eu mesmo. Diverjo de todo o mundo”.

(ROSA, Guimarães: O Grande Sertão: Veredas)

RESUMO

Lutzomyia longipalpis, é o principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas, os adultos alimentam-se em grande parte de sua vida de soluções açucaradas, embora as fêmeas necessitem de sangue para o desenvolvimento ovariano. A ingestão de sangue provoca alterações fisiológicas no intestino médio, especialmente na regulação do pH luminal, que passa de 6,0 (em dieta de sacarose, mantido ativamente por V-ATPases) para cerca de 8,1, quando ingerem sangue ou soluções contendo proteínas. Essa alcalinização intestinal influencia a atividade enzimática e o desenvolvimento de *Leishmania*, envolvendo três mecanismos principais: liberação de CO₂ do sangue ingerido; sinalização hormonal por células endócrinas intestinais; e o transporte de aminoácidos acoplado à entrada de íons H⁺ nos enterócitos. Os experimentos realizados neste trabalho indicam que a alcalinização intestinal em fêmeas de *L. longipalpis* depende do aumento da pressão osmótica no lúmen intestinal. A alimentação dos insetos com solução contendo PEG 8.000 promoveu alcalinização de forma concentração-dependente, sendo mais intensa com soluções mais concentradas ou ricas em sais. A sacarose, misturada à solução de PEG, também potencializou esse efeito. Outras moléculas, como Dextran, Celobiose e PEG 100.000, utilizadas em outros experimentos de alimentação, induziram respostas semelhantes. Além disso, verificou-se que a aplicação de soluções hiperosmóticas na superfície basolateral de intestinos isolados não induz alcalinização, sugerindo que o desbalanço osmótico responsável por esse processo ocorre entre o lúmen intestinal e a região apical dos enterócitos. Ficou claro também que a inibição de aquaporinas interfere significativamente na alcalinização intestinal em *L. longipalpis*. Demonstrou-se que nem a ingestão de microesferas de látex nem o estiramento mecânico do intestino são capazes de induzir alcalinização, descartando a hipótese de que a distensão intestinal durante o repasto sanguíneo seja um gatilho para esse processo. Diferente da hemolinfa de fêmeas alimentadas com sangue, que induz alcalinização em intestinos isolados, a hemolinfa de fêmeas alimentadas com PEG 8.000 não apresenta esse efeito. Além disso, não foram observadas diferenças nas concentrações de aminoácidos na hemolinfa entre os dois grupos, o que exclui esses compostos como adjuvantes da alcalinização. Por fim, foi possível recuperar a molécula alcalinizante liberada pelos intestinos através de experimento que induz o influxo de Ca²⁺ em células enteroendócrinas. Testes com aplicação de insulina e serotonina em intestinos isolados de *L. longipalpis* demonstraram que apenas a insulina foi capaz de induzir a alcalinização intestinal. Através de espectrometria de massa (MALDI/TOF), com o sobrenadante proveniente de estimulação de intestinos com ionóforo de Ca²⁺, foram identificados dois peptídeos cuja massa é compatível com insulinas conhecidas, como a humana e a bovina. Análises de expressão gênica confirmaram a presença de transcritos de peptídeos semelhantes à insulina (ILPs) e de seus receptores (ILRs) no intestino médio de fêmeas. Para investigar as vias de sinalização intracelular associadas à alcalinização induzida por PEG 8.000, foram realizados ensaios com inibidores da via TOR (rapamicina e galactosamina), que resultaram na inibição do processo de alcalinização disparado pela alimentação com PEG 8.000, sugerindo a participação dessa via sinalizadora no processo disparado pelo desbalanço osmótico. Uma vez demonstrado que a alcalinização intestinal induzida por PEG 8.000 envolve a ativação da via TOR, foram realizados experimentos com inibidores dos transportadores HCO₃⁻/Cl⁻ (DIDS e NPPB, ambos a 0,1 mM), os quais bloquearam completamente o processo de alcalinização. A utilização de H89 (10 µM), um inibidor de PKA, evidenciou que a fosforilação desses transportadores é essencial para o processo. Além disso, verificou-se a participação da adenilato ciclase e do cAMP: a administração de um análogo permeável de cAMP (2,8 mM) foi capaz de reverter o bloqueio promovido por rapamicina, enquanto a administração de DDA, um inibidor da adenilato ciclase, aboliu a alcalinização, confirmando o envolvimento da via cAMP/PKA no mecanismo de ação de PEG 8.000. Por fim, através de ensaios de cinética enzimática utilizando

o substrato BApNA (1 mM), demonstrou-se que a alimentação com PEG 8.000 aumenta a atividade tripsinolítica em fêmeas de *L. longipalpis*. Ficou evidenciado que o início da alcalinização intestinal não depende da natureza química da molécula ingerida, mas sim de sua concentração no bolo alimentar, que gera um desbalanço osmótico suficiente para ativar o processo. De forma inédita, demonstrou-se a participação de peptídeos semelhantes à insulina (ILPs) e seus receptores (ILRs) nesse mecanismo. Esses achados, integrados ao conhecimento pré-existente, permitirão a formulação de um modelo descritivo abrangente dos processos de alcalinização intestinal em *L. longipalpis*.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*; pH intestinal; Alcalinização intestinal; PEG 8.000; *Insulin-like peptides*

ABSTRACT

Lutzomyia longipalpis is the main vector of *Leishmania infantum* in the Americas. Adults feed on sugar solutions for most of their lives, although females require blood for ovarian development. Blood ingestion causes physiological changes in the midgut, especially in the regulation of luminal pH, which increases from 6.0 (in a sucrose diet, actively maintained by V-ATPases) to approximately 8.1 when they ingest blood or solutions containing proteins. This intestinal alkalization influences the enzymatic activity and development of *Leishmania*, involving three main mechanisms: release of CO₂ from ingested blood; hormonal signaling by intestinal endocrine cells; and the transport of amino acids coupled to the entry of H⁺ ions into enterocytes. The experiments performed in this work indicate that intestinal alkalization in female *L. longipalpis* depends on the increase in osmotic pressure in the intestinal lumen. Feeding the insects with a solution containing PEG 8,000 promoted alkalization in a concentration-dependent manner, being more intense with more concentrated or salt-rich solutions. Sucrose, mixed with the PEG solution, also potentiated this effect. Other molecules, such as Dextran, Cellobiose and PEG 100,000, used in other feeding experiments, induced similar responses. Furthermore, it was found that the application of hyperosmotic solutions on the basolateral surface of isolated intestines does not induce alkalization, suggesting that the osmotic imbalance responsible for this process occurs between the intestinal lumen and the apical region of the enterocytes. It was also clear that the inhibition of aquaporins significantly interferes with intestinal alkalization in *L. longipalpis*. It was demonstrated that neither the ingestion of latex microspheres nor mechanical stretching of the intestine are capable of inducing alkalization, ruling out the hypothesis that intestinal distension during blood feeding is a trigger for this process. Unlike the hemolymph of blood-fed females, which induces alkalization in isolated intestines, the hemolymph of females fed with PEG 8,000 does not present this effect. Furthermore, no differences in the concentrations of amino acids in the hemolymph were observed between the two groups, which excludes these compounds as adjuvants of alkalization. Finally, it was possible to recover the alkalizing molecule released by the intestines through an experiment that induces the influx of Ca²⁺ in enteroendocrine cells. Tests with application of insulin and serotonin in isolated intestines of *L. longipalpis* demonstrated that only insulin was capable of inducing intestinal alkalization. Using mass spectrometry (MALDI/TOF) with the supernatant from intestinal stimulation with Ca²⁺ ionophore, two peptides were identified whose mass is compatible with known insulins, such as human and bovine insulin. Gene expression analyses confirmed the presence of transcripts of insulin-like peptides (ILPs) and their receptors (ILRs) in the midgut of females. To investigate the intracellular signaling pathways associated with PEG 8,000-induced alkalization, assays were performed with TOR pathway inhibitors (rapamycin and galactosamine), which resulted in inhibition of the alkalization process triggered by PEG 8,000 feeding, suggesting the participation of this signaling pathway in the process triggered by osmotic imbalance. Once it was demonstrated that intestinal alkalization induced by PEG 8,000 involves activation of the TOR pathway, experiments were performed with inhibitors of the HCO₃⁻/Cl⁻ transporters (DIDS and NPPB, both at 0.1 mM), which completely blocked the alkalization process. The use of H89 (10 μM), a PKA inhibitor, demonstrated that phosphorylation of these transporters is essential for the process. Furthermore, the participation of adenylate cyclase and cAMP was verified: the administration of a permeable cAMP analogue (2.8 mM) was able to reverse the blockade promoted by rapamycin, while the administration of DDA, an adenylate cyclase inhibitor, abolished the alkalization, confirming the involvement

of the cAMP/PKA pathway in the mechanism of action of PEG 8,000. Finally, through enzyme kinetics assays using the substrate BApNA (1 mM), it was demonstrated that feeding with PEG 8,000 increases the trypsinolytic activity in female *L. longipalpis*. It was evident that the onset of intestinal alkalization does not depend on the chemical nature of the ingested molecule, but rather on its concentration in the food bolus, which generates an osmotic imbalance sufficient to activate the process. In an unprecedented way, the participation of insulin-like peptides (ILPs) and their receptors (ILRs) in this mechanism was demonstrated. These findings, integrated with pre-existing knowledge, will allow the formulation of a comprehensive descriptive model of intestinal alkalization processes in *L. longipalpis*.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis*; Intestinal pH; Intestinal alkalization; PEG 8,000; Insulin-like peptides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	26
Figura 2 - Distribuição geográfica de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e sua correlação com casos humanos e caninos de leishmaniose visceral.....	27
Figura 3 - Sistema digestivo de flebotomíneo.....	28
Figura 4 – Estrutura geral das Aquaporinas..	36
Figura 5 - Via TOR de sinalização celular.	39
Figura 6 – Ligação entre Insulina e a ativação de via TOR..	42
Figura 7 - Molécula de Polietilenoglicol.	43
Figura 8 - Escala padrão de indicação para Azul de Bromotimol.....	50
Figura 9 - Análise de proporção de alcalinização intestinal.....	67
Figura 10 - Determinação do pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com solução contendo PEG 8.000 em diferentes concentrações, em água	69
Figura 11 – Determinação do pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com solução contendo PEG 8.000 em diferentes concentrações, em IS	71
Figura 12 - Determinação do pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com solução contendo PEG 8.000 à 10 mM na ausência de sacarose 15%.	73
Figura 13 – Determinação do pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com solução contendo Dextran 10.000 à 10 mM.	75
Figura 14 – Determinação do pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com solução contendo PEG 100.000 à 1 mM.	77
Figura 15 – Determinação do pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com solução contendo Celobiose à 10 mM.....	78
Figura 16 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> que sofreram alteração de pH após alimentação com Bumetanide (BMT).	81
Figura 17 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> que sofreram alteração de pH após aplicação de hemolinfa.....	83
Figura 18 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> que sofreram alteração de pH após aplicação de estímulo mecânico por estiramento.	85
Figura 19 – Análise do efeito da dilatação provocada pela ingestão de microesferas de látex por fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	86

Figura 20 – Análise da concentração de aminoácidos (aminoácidos) livres na hemolinfa recuperada de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	89
Figura 21 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> que sofreram alteração de pH após aplicação de sobrenadante de intestinos estimulados com A23187.....	92
Figura 22 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> que sofreram alteração de pH após aplicação de sobrenadante de intestinos não estimulados com A23187.	93
Figura 23 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> que sofreram alteração de pH após aplicação de sobrenadante de intestinos estimulados com A23187 na presença de EDTA 2 mM.	94
Figura 24 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> que sofreram alteração de pH após aplicação de insulina bovina.	96
Figura 25 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> que sofreram alteração de pH após aplicação de solução IS..	97
Figura 26 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> que sofreram alteração de pH após aplicação de solução contendo serotonina.	98
Figura 27 – Análise do perfil peptídico de amostras provenientes do sobrenadante de intestinos de <i>L. longipalpis</i> estimulados ou não com ionóforo de cálcio (0 a 8.000).....	100
Figura 28 – Análise do perfil peptídico de amostras provenientes do sobrenadante de intestinos de <i>L. longipalpis</i> estimulados ou não com ionóforo de cálcio (4.000 a 6.000).....	102
Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose.	103
Figura 30 – RT-qPCR de ILR do intestino médio de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	105
Figura 31 – Esquema ilustrativo dos mecanismos de alcalinização intestinal.	106
Figura 32 – Esquema ilustrativo das vias de alcalinização intestinal de <i>L. longipalpis</i>	107
Figura 33 – Análise da proporção de intestinos de <i>L. longipalpis</i> fêmeas que sofreram alteração de pH quando alimentadas com Rapamicina à 20 μ M.	108
Figura 34 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular relacionadas com a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal com destaque para a via TOR.	109
Figura 35 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular relacionadas com a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal com destaque para o transportador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$	111
Figura 36 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular relacionadas com a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal com destaque para a participação de PKA	113

Figura 37 – Análise da proporção de reversão do processo inibitório de alcalinização ocasionado por Rapamicina frente suplementação com cAMP.	115
Figura 38 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular relacionadas com a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal com destaque para a participação da Adenilil Ciclase e de cAMP	117
Figura 39 – Atividade de Tripsina no intestino médio de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> ...	120
Figura 40 – Esquema ilustrativo evidenciando a descoberta de novos passos de sinalização nos mecanismos de alcalinização intestinal de <i>L. longipalpis</i>	121
Figura 41 – Análise das prováveis cadeias A e B do ILP de <i>L. longipalpis</i>	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resposta de alcalinização intestinal frente à estímulos hiperosmóticos aplicados pela região basolateral do intestino médio	80
Tabela 2 - Valores de pH intestinal de insetos alimentados com DIDS/NPPB.....	110
Tabela 3 - Valores de pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentados H89	112
Tabela 4 - Valores de pH intestinal de insetos alimentados com DDA.....	116
Tabela 5 - Valores de pH intestinal de insetos alimentados com Galactosamina	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Identificação dos genes e das sequências de iniciadores.	60
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromolar

4E-BP - *Eukariotic Translation Initiation Factor 4E-binding Protein*

Aminoácidos - aminoácidos

ARS – Após Repasto Sanguíneo

ATP – trifosfato de adenosina

BAPNA – N-Benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride

BMT - Bumetanide

cAMP – monofosfato cíclico de adenina

CAT - *Cationic Amino acid Transporter*

cDNA – DNA complementar

cGMP – monofosfato cíclico de guanosina

DDA – 2',3' - Dideoxyadenosine

DIDS – 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

h – horas

ILPs – *Insulin-like peptides*

ILRs – *Insulin-like receptors*

IS – *Insect saline* (sinônimo para SFI)

HAT - *Heterodimeric Amino acid Transporter*

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

LFIH – Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos

MALDI/TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*

mg - miligramas

mL - mililitros

mM – milimolar

mOD – milidensidade óptica

MEM – *Minimum Essential Medium*

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

MS – *Mass spectrometry*

m/z – massa carga

NAT – *Nutrient Amino acid Transporters*

NPPB – *5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid*

nm – nanômetro

PAT – *Proton Amino acid transporter*

PEG - Polietilenoglicol

pH - potencial hidrogeniônico

PKA – *Protein Kinase A*

POE - polioxietileno

SFI – Solução Fisiológica de Insetos

SLC – *Solute Carrier Family*

TOR – *Target of Rapamycin*

TRIS – Tris hidroximetil aminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	25
1.2 Mecanismos de alcalinização intestinal.....	30
1.3 Transportadores intestinais de aminoácidos e íons	31
1.4 Aquaporinas.....	35
1.5 Via TOR	37
1.6 Insulina	40
1.7 Polietilenoglicol (PEG)	43
2. JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4. METODOLOGIA.....	49
4.1 Comitê de ética	49
4.2 Material Biológico.....	49
4.3 Ensaio para determinação de pH intestinal a partir de alimentação com Azul de Bromotimol.....	49
4.4 Ensaio de alimentação com PEG 8.000.....	50
4.5 Ensaio de alimentação para verificar a capacidade de alcalinização de DEXTRAN, PEG 100.000 e Celobiose	51
4.6 Ensaio para verificar a capacidade de estímulos osmóticos ou mecânicos no processo de alcalinização	52
4.7 Ensaio para verificar a capacidade alcalinizante da hemolinfa de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com PEG 8.000.....	53
4.8 Ensaio para determinação da concentração relativa de aminoácidos na hemolinfa extraída de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	54
4.9 Alimentação de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> com diferentes inibidores de transporte iônico e de sinalização intracelular.....	55

4.10 Ensaio para determinação do potencial alcalinizante de insulina e serotonina sobre o intestino médio de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> .	57
4.11 Análise da expressão de insulina e seu receptor em fêmeas de <i>L. longipalpis</i> .	58
4.12 Ensaio de inibição da atividade de aquaporinas no intestino médio de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> .	61
4.13 Ensaio de atividade tripsinolítica em intestinos de <i>L. longipalpis</i> alimentados com PEG 8.000	61
4.14 Ensaio para verificar a participação de Ca^{+2} no processo de alcalinização intestinal	62
4.15 Análises de espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS)	63
4.16 Análises estatísticas	64
5. RESULTADOS	65
5.1 Efeito da alimentação com PEG 8.000 no pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	65
5.2 Efeito da concentração de PEG 8.000 no processo de alcalinização de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	68
5.3 Influência de sais no processo de alcalinização disparado por PEG 8.000	70
5.4 Efeito da presença de sacarose 15% no processo de alcalinização de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com solução contendo PEG 8.000.	72
5.5 Efeito sobre o pH intestinal da alimentação de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> com DEXTRAN	74
5.6 Efeito da alimentação com PEG 100.000 e Celobiose sobre o pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	76
5.7 Análise da capacidade de alcalinização intestinal de choques osmóticos aplicados à superfície basolateral de intestinos médios de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	79
5.8 Influência da alimentação com Bumetanide sobre o pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	80
5.9 Análise da capacidade de alcalinização da hemolinfa de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com PEG 8.000.	82
5.10 A influência da distensão mecânica do intestino médio de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> no processo de alcalinização intestinal	84

5.11 Determinação da concentração relativa de aminoácidos da hemolinfa de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas e não alimentadas com sangue	88
5.12 Influência do influxo de Ca^{+2} na liberação de moléculas alcalinizantes presentes no intestino médio de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	90
5.13 Efeito da aplicação de insulina bovina e serotonina no pH intestinal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	95
5.14 A análise, por MALDI/TOF-MS, do sobrenadante de intestinos estimulados com ionóforo de cálcio	99
5.15 Análise qualitativa da expressão gênica de ILP e IRP no intestino médio de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	102
5.16 Análise quantitativa da expressão gênica de ILR no intestino médio de fêmeas de <i>L. longipalpis</i>	104
5.17 Efeito da alimentação com rapamicina na alcalinização intestinal disparada por PEG 8.000	108
5.18 Efeito da alimentação com DIDS, NPPB e H89 no processo de alcalinização intestinal disparado por PEG 8.000.....	110
5.19 Avaliação da capacidade de reversão do bloqueio de alcalinização intestinal através da alimentação com cAMP-análogo	114
5.20 Efeito da alimentação com Galactosamina no processo de alcalinização intestinal disparado pela alimentação com PEG 8.000	118
5.21 Avaliação da atividade tripsinolítica em intestinos de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com PEG 8.000.....	119
6. DISCUSSÃO	122
7. CONCLUSÕES.....	146
PERSPECTIVAS.....	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
ANEXOS	174

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Lutzomyia longipalpis*

Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) é um inseto pertencente a ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (FORATTINI, 1973). Essa espécie caracteriza-se por ser dividida em pelo menos quatro espécies crípticas (VIGODER et al., 2010). Devido a sua ampla distribuição, que vai do sul do México ao norte da Argentina, apresenta inúmeros nomes populares, dentre os quais podemos destacar: mosquito-palha, biriguí, asa-caída, asa-branca, dentre outros (YOUNG; DUNCAN, 1994).

Apresenta um ciclo de vida holometábolo, passando pelas fases de ovo, larvas (com quatro estádios larvais), pupa e adultos (**Figura 1**) (FORATTINI, 1973; SHERLOCK, 2003; SOARES; TURCO, 2003). As larvas se desenvolvem em locais como serapilheiras, troncos de árvores em decomposição, fendas de rochas e cavernas; em ambiente urbano destacam-se jardins e quintais arborizados, nos quais são frequentes a utilização de adubos orgânicos. Essas mesmas larvas se alimentam nestes locais de qualquer matéria orgânica de origem vegetal em decomposição, bem como de fezes de animais (FERRO et al., 1997; FORATTINI, 1973; YOUNG; DUNCAN, 1994).

Os adultos alimentam-se de soluções açucaradas durante grande parte de sua vida, como néctar, seiva de plantas, e secreções de afídeos (CHANIOTIS, 1974; RIBEIRO; ROWTON; CHARLAB, 2000; WALLBANKS et al., 1991). Contudo, as fêmeas necessitam realizar alimentação sanguínea, algo essencial ao seu desenvolvimento ovariano. *L. longipalpis* é um inseto eclético, alimentando-se de diversos hospedeiros, dentre os quais os canídeos e o próprio homem. Após a alimentação sanguínea, as fêmeas realizam a postura dos ovos nos mesmos ambientes nos quais encontram-se as larvas (FERRO et al., 1997; FORATTINI, 1973; SOARES; TURCO, 2003; YOUNG; DUNCAN, 1994).

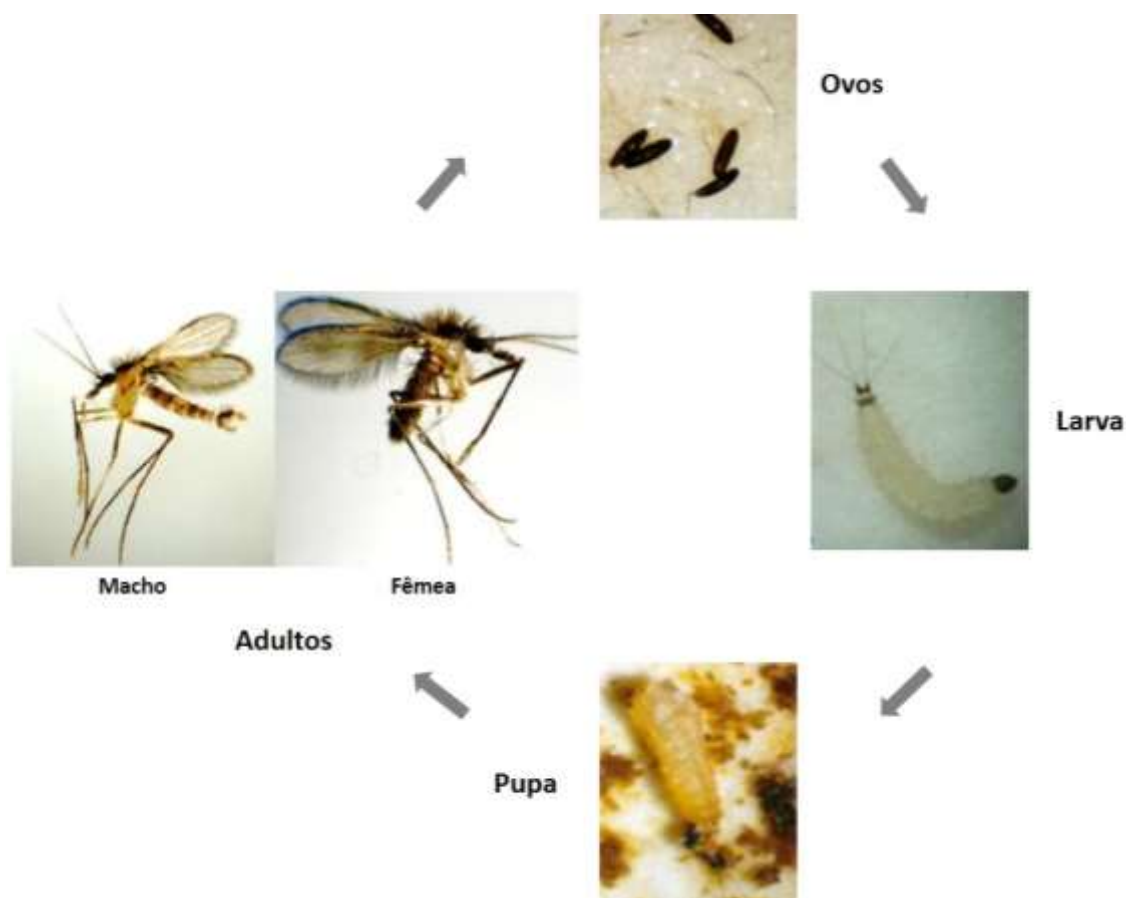


Figura 1 - Ciclo biológico de *Lutzomyia longipalpis*. Ciclo biológico de *L. longipalpis* onde se observam-se as fases de desenvolvimento do inseto: ovos, quatro estádios larvais (L1 – L4), pupa e adultos. (Fotos por Nelder Gontijo).

L. longipalpis é o principal vetor de *Leishmania infantum* (Ross, 1903) nas Américas, o agente etiológico da leishmaniose visceral americana (SOARES; TURCO, 2003). Destaca-se o fato de que existe uma forte correlação entre as distribuições dos casos de leishmaniose visceral e do próprio inseto *L. longipalpis*, o qual encontra-se em quase toda extensão do território brasileiro, destacando-se uma maior concentração na região nordeste do país (**Figura 2**) (ANDRADE-FILHO et al., 2017; HARHAY et al., 2011; SHAW; RANGEL, 2018).

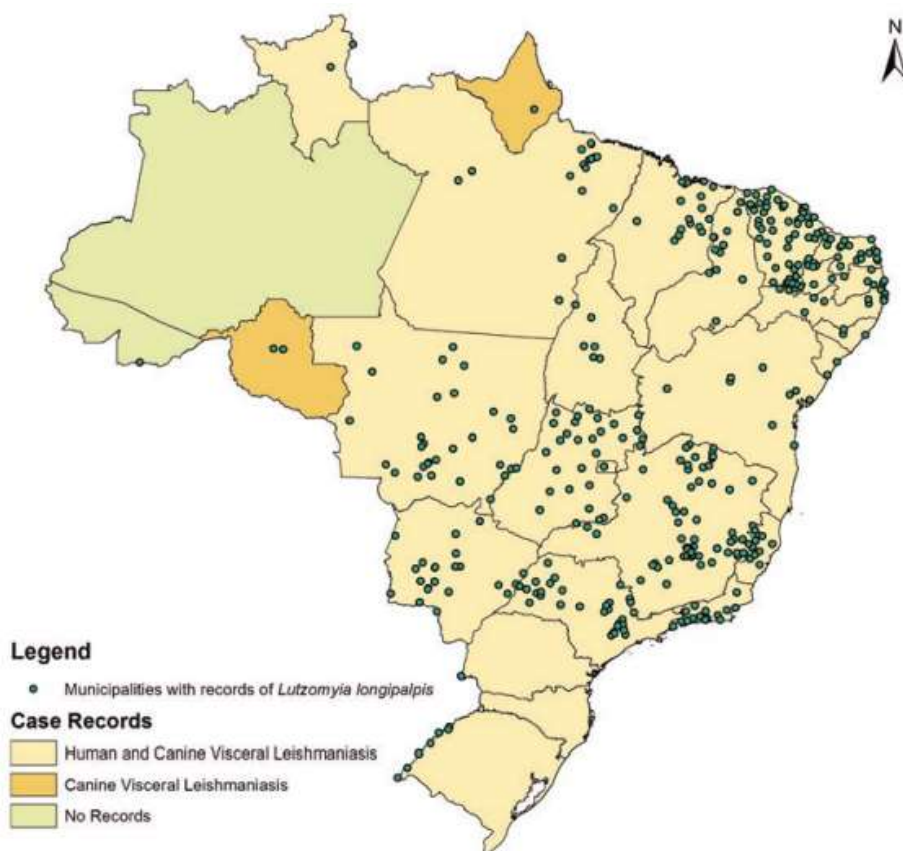


Figura 2 - Distribuição geográfica de *Lutzomyia longipalpis* e sua correlação com casos humanos e caninos de leishmaniose visceral. Distribuição geográfica no Brasil da ocorrência de *L. longipalpis* (pontos verdes sobre o mapa), bem como a ocorrência de casos de leishmaniose visceral humana e canina (cor bege), ou exclusivamente canina (cor laranja), destaca-se também a ausência de relatos em alguns estados (cor verde). **Adaptado de Shaw and Rangel, 2018.**

É importante salientar que *L. longipalpis* é a espécie de flebotomíneo mais bem adaptada ao ambiente urbano, com alguns estudos apontando um crescimento desse processo de urbanização do inseto a partir dos anos 80, o que tem consequência direta na epidemiologia da leishmaniose visceral (ANDRADE-FILHO et al., 2017; HARHAY et al., 2011; LAINSON; RANGEL, 2005; RANGEL; LAINSON, 2009). Além disso, alguns trabalhos suportam a teoria de que *L. longipalpis* trata-se, na verdade, de um complexo de espécies morfologicamente similares, o que pode acarretar diferença na competência vetorial de diferentes populações

geográficas (BAUZER et al., 2007; MAINGON et al., 2008; SHAW; RANGEL, 2018; SILVA FERNANDES et al., 2020; VIGODER et al., 2010).

Como o desenvolvimento de *L. infantum* se restringe ao ambiente intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*, existem vários estudos que buscaram investigar aspectos histológicos, bioquímicos e fisiológicos do intestino desses insetos (GEMETCHU, 1974; RUDIN; HECKER, 1982). O tubo digestivo é do tipo completo, sendo dividido em três porções principais: intestino anterior (da boca à cárdia), intestino médio (da cárdia ao piloro) e intestino posterior (do piloro ao ânus) (**Figura 3**) (TERRA; FERREIRA, 2005, 1994, 2012). O intestino médio, porção onde ocorre o processo de digestão do inseto, e onde dá-se o desenvolvimento de *Leishmania* (BATES, 2007a; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002), é constituído de uma monocamada epitelial, com células cilíndricas que apresentam microvilosidades voltadas para a porção luminal do intestino (GEMETCHU, 1974; RUDIN; HECKER, 1982), podendo ainda ser subdividido em duas partes: intestino médio torácico e intestino médio abdominal (MALTA et al., 2024b).

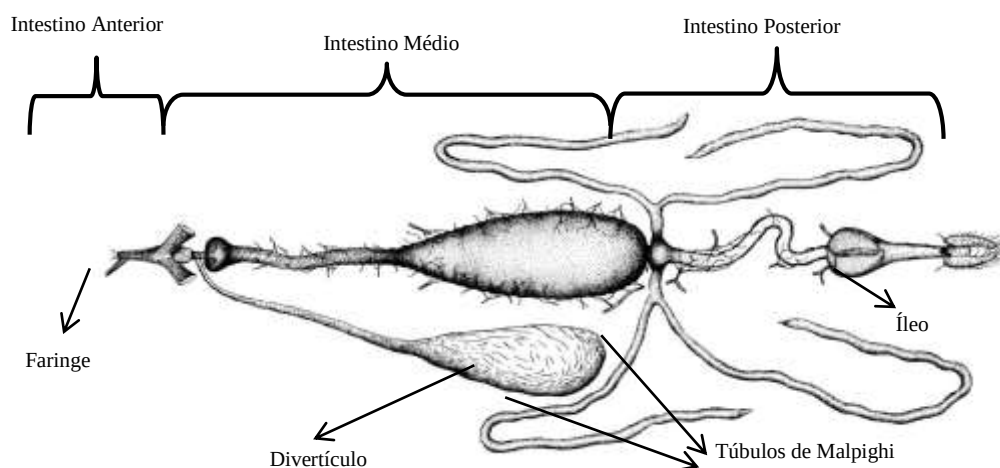


Figura 3 - Sistema digestivo de flebotomíneo. Ilustração do trato digestivo de fêmeas de flebotomíneo. Destaque para as divisões anômicas em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Destacam-se também algumas estruturas acessórias, como divertículo e túbulos de Malpighi. Adaptado de Jobling, 1987.

Grandes mudanças fisiológicas são observadas no intestino médio abdominal do inseto quando este se alimenta de sangue, sendo que a mudança do pH intestinal destaca-se como uma das principais, uma vez que tem influência sobre a produção e atividade de enzimas digestivas, bem como sobre o processo de desenvolvimento de *L. infantum* no flebotomíneo (BATES; TETLEY, 1993; GONTIJO et al., 1998; IN; RELATIONSHIPS, 2008; ROGERS et al., 2008; SANTOS et al., 2008, 2011, 2014; TERRA; FERREIRA, 1994).

Em fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sacarose é observado um valor luminal de pH igual a 6,0, portanto um valor de pH ácido, o qual é mantido de forma ativa, o que ficou evidenciado pela capacidade desses insetos de acidificarem uma solução de sacarose tamponada no pH 7,5 assim que ela é ingerida (SANTOS et al., 2008). Essa manutenção de pH ácido se dá pela ação de V-ATPases, proteínas que bombeiam ativamente íons H^+ a partir da hidrólise de ATP (RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2007). Vale destacar que as principais enzimas envolvidas na digestão de açúcares, as alfa-glicosidases, apresentam atividade ótima em valores de pH ácidos. As alfa-glicosidases são enzimas, em sua maior parte, ligadas a membrana do intestino médio e sua atividade é maior na porção torácica do mesmo (GONTIJO et al., 1998; MALTA, 2021; SANTOS et al., 2008). Quando as fêmeas são alimentadas com sangue, o mecanismo de manutenção de pH 6 é desligado e é observado um aumento do valor de pH luminal, o qual, logo após a ingestão de sangue, sobe para aproximadamente 8,1, caindo gradativamente conforme a digestão vai avançando (SANTOS et al., 2008). A alcalinização observada na porção abdominal do intestino médio é importante para o funcionamento das principais enzimas intestinais envolvidas com a digestão de proteínas, como por exemplo as tripsinas (GONTIJO et al., 1998; NEPOMUCENO et al., 2017a; SANTOS et al., 2008; TELLERIA et al., 2007; TERRA; FERREIRA, 1994).

Até então acreditava-se que o processo de alcalinização como um todo iniciava-se a partir da percepção da presença de proteínas no interior do intestino, isso porque, conforme descrito por (SANTOS et al., 2011), a alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com diferentes tipos de proteínas purificadas, incluindo proteínas como lisozima e caseína, ambas na concentração de 5% (que naturalmente uma fêmea nunca encontraria em sua alimentação), foram capazes de disparar os mecanismos de alcalinização intestinal. Estes resultados pareciam indicar que a formação de peptídeos resultantes do próprio processo de digestão, poderiam ser

o gatilho que culminava com a ativação dos mecanismos de alcalinização, bem como com o desligamento do mecanismo de manutenção do pH 6,0.

1.2 Mecanismos de alcalinização intestinal

São três os mecanismos de alcalinização intestinal descritos até o momento, todos identificados em fêmeas de *L. longipalpis* (SANTOS et al., 2008, 2011), sendo eles: a volatilização de CO₂ durante o processo de alimentação do inseto, processo que ocorre como consequência da passagem do sangue pelas peças bucais do inseto durante o processo de alimentação. A movimentação do sangue pelo aparelho bucal do inseto causa um desbalanço de CO₂, em uma reação semelhante à de alcalose respiratória, onde a saída de CO₂ do sangue leva ao consumo de H⁺ ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$), com isso o sangue já chegaria ao intestino do inseto com um valor de pH acima do encontrado no próprio hospedeiro; o segundo mecanismo tem relação direta com o desligamento das V-ATPases e com a ativação de transportadores de HCO₃⁻. Moléculas, provavelmente hormônios, liberados na hemolinfa dos insetos durante o processo de alimentação sanguínea, são reconhecidas pela superfície basolateral dos enterócitos, culminando com uma cascata de sinalização intracelular que inibe a ação das V-ATPases e ativa os transportadores de HCO₃⁻/Cl⁻ (LEITE; EVANGELISTA, 2001; SANTOS et al., 2011). Tanto as bombas de H⁺ quanto os transportadores de HCO₃⁻/Cl⁻ estão localizados na superfície apical (ou seja, voltadas para o lúmen) dos enterócitos; o terceiro mecanismo consiste em um sistema de transporte do tipo simporte, em que certos aminoácidos são transportados conjuntamente com íons H⁺ do lúmen intestinal para o citoplasma dos enterócitos (sistema PAT), o que resulta na alcalinização do lúmen intestinal e acidificação do citoplasma dos enterócitos (NEPOMUCENO et al., 2020). Nepomuceno e colaboradores, 2020, mostraram ainda que, além desses três mecanismos anteriormente expostos, pode existir um outro mecanismo de alcalinização, no qual certos aminoácidos são capazes de entrar nos enterócitos por transportadores diferentes de PAT, posteriormente convergindo para uma mesma via de sinalização. A participação conjunta destes mecanismos seria responsável pela alcalinização observada quando o inseto ingere sangue.

O entendimento completo das vias de sinalização envolvendo cada um dos três mecanismos ainda não se encontra totalmente esclarecido. A participação de segundos mensageiros no processo de sinalização intracelular foi recentemente apontada e confirmada em fêmeas de *L. longipalpis* (NEPOMUCENO et al., 2022b, 2022a). Foi identificada a capacidade de desligamento das V-ATPases, bem como a capacidade de ativação de transportadores $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ pelo segundo mensageiro cAMP (NEPOMUCENO et al., 2022a).

Outro ponto ainda não esclarecido é aquele que diz respeito ao papel de cada aminoácido no processo de alcalinização intestinal. É sabido que aminoácidos como leucina e serina são capazes de contribuir para a alcalinização intestinal através dos transportadores PAT que realizam o cotransporte de aminoácidos com íons H^+ , retirando estes íons do lúmen intestinal (NEPOMUCENO et al., 2020). Contudo, aminoácidos como lisina e arginina não são absorvidos pelo intestino utilizando transportadores PAT, mas mesmo assim, são capazes de induzir alcalinização, provavelmente através de sua entrada por outros transportadores diferentes de PAT. Vale destacar que, apesar de todos esses aminoácidos (serina, leucina, lisina e arginina) ativarem, à sua maneira, o processo de alcalinização intestinal, o mesmo não atinge sua máxima eficiência, uma vez que os aminoácidos não são capazes de desligar o mecanismo de manutenção de pH 6,0. (NEPOMUCENO et al., 2017a, 2020, 2022b, 2022a).

1.3 Transportadores intestinais de aminoácidos e íons

A partir do momento em que fêmeas de insetos hematófagos realizam a alimentação sobre um hospedeiro, dá-se início no intestino médio dos mesmos o processo de digestão do sangue ingerido (BOROVSKY, 2003; TELLERIA et al., 2007; TERRA; FERREIRA, 1994). A digestão acontece a partir da ação de enzimas intestinais, destacando-se, para o caso das proteínas, a ação das tripsinas, aminopeptidases e carboxipeptidases (GONTIJO et al., 1998; GOODING, 1973; TELLERIA et al., 2007; TERRA; FERREIRA, 2005, 1994). Alguns estudos em mosquitos apontam para o fato de que a concentração de aminoácidos na hemolinfa dos insetos que se alimentaram de sangue sobe gradativamente a partir de 4 horas pós-alimentação, atingindo sua concentração máxima por volta de 24 horas pós-alimentação (BOUDKO et al., 2015; UCHIDA et al., 1990).

Para que haja essa movimentação de aminoácidos entre o lúmen intestinal e a hemolinfa dos insetos, é essencial a presença de transportadores colocados tanto na superfície apical, quanto na superfície basolateral dos enterócitos. Os transportadores de aminoácidos são proteínas transmembrana, que podem atuar de várias maneiras, transportando apenas aminoácidos de maneira individual, ou mesmo atuando no transporte concomitante de aminoácidos e íons, tais como os íons Na^+ , K^+ e H^+ (KANDASAMY et al., 2018).

Muito pouco se sabe sobre os transportadores de aminoácidos de *L. longipalpis*, grande parte dos estudos foram desenvolvidos em modelos de insetos de outras ordens, como Lepidoptera e Coleoptera. Boudko e colaboradores mostraram que grande parte dos transportadores já estudados apresentam características conservadas, apresentando ortologias que permitem que sejam conjuntamente agrupados (BOUDKO et al., 2005, 2015). Em Diptera, a maior parte dos trabalhos é focada no transporte de aminoácidos em mosquitos, principalmente em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e mosquitos do gênero *Anopheles* (BOUDKO, 2012; BOUDKO et al., 2015; CARPENTER et al., 2012; HANSEN et al., 2011; MELESHKEVITCH et al., 2009).

Um dos principais grupos de transportadores de membrana são os SLCs (*Solute Carriers*), apresentando ampla distribuição entre os seres vivos e mostrando capacidade de transporte para nutrientes, íons e xenobióticos (DENECKE et al., 2020). Os transportadores da família SLC7 foram bem caracterizados em vertebrados, sendo seus homólogos encontrados principalmente em mosquitos (CARPENTER et al., 2012). Esses transportadores podem ser divididos em duas subfamílias, sendo elas: transportadores catiônicos de aminoácidos (CAT; *Cationic Amino acid Transporters*), os quais apresentam alta especificidade por aminoácidos carregados positivamente; e os transportadores heterodiméricos de aminoácidos (HAT; *Heterodimeric Amino acid Transporters*), que tem especificidade no transporte de aminoácidos de cadeia ramificada (BOUDKO, 2012; CARPENTER et al., 2012). Vale ressaltar o papel dos transportadores da família SLC7 na ativação da via TOR do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* (CARPENTER et al., 2012). Destaca-se que a via TOR é uma importante via de sinalização celular envolvida na percepção do estado nutricional de células eucariotas (**item 1.4**).

Outra família de transportadores é a SLC36, que consiste em transportadores de aminoácidos dependentes de prótons (PAT; *Proton-dependent Amino acid Transporters*), os quais realizam o simporte de aminoácidos e H^+ na proporção estequiométrica de 1:1 (BOLL et al., 2002; BOLL; DANIEL; GASNIER, 2004; EVANS; AIMANOVA; GILL, 2009; SAGNÉ et al., 2001). Esses transportadores são independentes de íons metálicos, mas dependem dos íons H^+ , determinando um queda no valor do mesmo em direção ao local de transporte (EVANS; AIMANOVA; GILL, 2009). Em *A. aegypti*, AaPAT1 é expresso na superfície apical dos enterócitos, participando do transporte de aminoácidos de maneira não muito específica, além disso sua expressão é induzida logo após o repasto sanguíneo (EVANS; AIMANOVA; GILL, 2009). Vale destacar que um dos principais mecanismos de alcalinização, citados anteriormente em *L. longipalpis*, tem relação direta com os transportadores do tipo PAT (NEPOMUCENO et al., 2020). Evans e colaboradores também chamam a atenção para o fato de que os transportadores do tipo PAT parecem ter grande influência sobre a ativação da via TOR de sinalização intracelular.

Além desses transportadores anteriormente citados, destacam-se também os seguintes transportadores: LAT (*L-system Amino acid transportes*), os quais tem especificidade por aminoácidos neutros e básicos, sua expressão foi confirmada no intestino de larvas de *A. aegypti* (CARPENTER et al., 2012; JIN et al., 2003); e transportadores do tipo NAT (*Nutrient Amino acid Transporters*), os quais estão envolvidos no transporte, principalmente, de aminoácidos aromáticos (BOUDKO et al., 2005; CARPENTER et al., 2012), esses transportadores estão incluídos na superfamília dos SLCs, mais especificamente na família SLC6 e são dependentes do transporte concomitante de íons Na^+ e K^+ .

O transporte de íons tem papel central no funcionamento dos mais diversos sistemas biológicos e está envolvido na manutenção da homeostase fisiológica. As Na^+/K^+ -ATPases e as V-ATPases são bombas iônicas eletrogênicas que utilizam ATP como fonte de energia participando da geração e manutenção do potencial de membrana das células intestinais de insetos, tornando o interior das células mais negativo com relação ao meio externo (HARVEY, 2009; WIECZOREK et al., 2009). Cada uma dessas bombas apresentam suas particularidades, e vão variar em função de uma dada resposta fisiológica. Sendo assim, a diferença de potencial criada por essas bombas é a base de funcionamento para outros

transportadores, como os transportadores PAT e NAT, o primeiro dependendo de um gradiente de H^+ , e o segundo se aproveitando do gradientes de Na^+ e K^+ criado pelas bombas.

Além de sistemas de transporte de cátions, transportadores de ânions estão envolvidos nos mecanismos de controle do pH da luz intestinal, a exemplo do antiporte HCO_3^-/Cl^- (bombeamento de bicarbonato para o lúmen e cloreto para o citoplasma). Quando a acetazolamida, um inibidor da anidrase carbônica, foi testada em fêmeas de *L. longipalpis*, o processo de alcalinização ficou prejudicado indicando que o transporte de íons bicarbonato gerado pela anidrase carbônica a partir de CO_2 e H_2O participa desse mecanismo (SANTOS et al., 2011).

Além de todos esses transportadores descritos anteriormente, que sem dúvida alguma, participam de forma integrada a garantir uma alcalinização intestinal eficiente, vale destacar o papel de segundos mensageiros, os quais, em vias de sinalização, desempenham papel fundamental na transdução de sinais. De maneira geral, segundos mensageiros são pequenas moléculas que fazem a sinalização inicial quando um receptor é ativado por um ligante específico ("Second Messengers," 2017). Eles difundem-se rapidamente pelo interior das células, passando a atuar sob enzimas, transportadores e canais iônicos. Dentre os principais sistemas de segundos mensageiros encontram-se os nucleotídeos cíclicos, sendo seus principais representantes: monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (NEWTON; BOOTMAN; SCOTT, 2016; WALLER; SAMPSON, 2018).

Na mosca *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830) foi demonstrada a participação de cAMP no processo de sinalização celular que culmina com a produção de uma saliva ácida. O hormônio serotonina ativa uma cascata de sinalização que aumenta a quantidade de cAMP intracelular. O aumento de cAMP induz a ativação de V-ATPases responsáveis pelo bombeamento de H^+ para o lúmen da glândula salivar (DAMES et al., 2006; SCHEWE; SCHMÄLZLIN; WALZ, 2008; ZIMMERMANN et al., 2003). Para fêmeas de *L. longipalpis* foi demonstrado que cAMP participa do processo de alcalinização intestinal. Quando intestinos ácidos desses insetos foram estimulados diretamente com cAMP, os mesmos tornaram-se alcalinos, além disso, a inibição da enzima adenilato ciclase foi capaz de bloquear o processo de alcalinização intestinal disparado a partir da ação de moléculas alcalinizantes da hemolinfa

dos insetos logo após a alimentação com sangue (NEPOMUCENO et al., 2022a). Isso se deve a posição da adenilato ciclase na via de sinalização celular que leva a alcalinização. Essa enzima está colocada abaixo (*downstream*) dos receptores envolvidos no reconhecimento da molécula presente na hemolinda das fêmeas alimentadas com sangue, seu bloqueio, portanto, não impede o reconhecimento das moléculas por parte dos intestinos, mas impede a continuação da sinalização celular que culminaria com o processo de alcalinização. Nepomuceno e colaboradores demonstraram ainda a ação direta de cAMP na ativação de Na^+/K^+ -ATPases, mostrando o papel central desse mensageiro tanto no processo inicial da digestão (aumento do pH intestinal), como nos processos de absorção de nutrientes (NEPOMUCENO et al., 2022b, 2022a).

1.4 Aquaporinas

Nas células de todos os organismos vivos, a água é um dos componentes mais abundantes, o que faz com que estratégias para uma eficiente regulação de sua entrada e saída sejam de extrema importância. A água das células pode se difundir livremente através de suas membranas plasmáticas, porém essa movimentação é limitada. O fato de diferentes células apresentarem diferentes taxas de movimentação de água, foi um fator que levou vários pesquisadores a inicialmente hipotetizarem a existência de transportadores específicos daquela molécula, portanto, a presença em maiores ou menores quantidades desses transportadores poderia explicar, pelo menos parcialmente, essa diferença na movimentação de água entre as células (KRUSE; UEHLEIN; KALDENHOFF, 2006).

Em 1993, Agre e colaboradores, em estudos com ovócitos de *Xenopus* sp. demonstraram as primeiras proteínas identificadas como sendo as responsáveis por transporte majoritário de água, batizando-as de aquaporinas (AQP1 e AQP0) (AGRE et al., 1993). Posteriormente ficou demonstrado que as aquaporinas podem ser divididas em duas subfamílias: a primeira agrupa aquelas relacionadas única e exclusivamente com o transporte de água; já a segunda subfamília reúne as aquaporinas que, além de transportarem água, são responsáveis pelo transporte de solutos não-polares como glicerol e uréia (BENOIT et al., 2014; ISHIBASHI et al., 2011; KRUSE; UEHLEIN; KALDENHOFF, 2006; VERKMAN, 2013).

As aquaporinas são proteínas intrínsecas de membranas, compostas por seis alfa-hélices transmembrana e duas hélices curtas (domínios asparagina-prolina-alanina; NPA), as quais formam um poro que conecta o ambiente intracelular ao extracelular (**Figura 4**) (KRUSE; UEHLEIN; KALDENHOFF, 2006; SPRING; ROBICHAUX; HAMLIN, 2009; VERKMAN, 2013). São encontradas de arqueas até mamíferos, sendo observadas sob inúmeras isoformas, podendo apresentar diferentes tipos de modificações, o que faz com que tenham especificidades relacionadas ao tecido onde são expressas (KRUSE; UEHLEIN; KALDENHOFF, 2006).

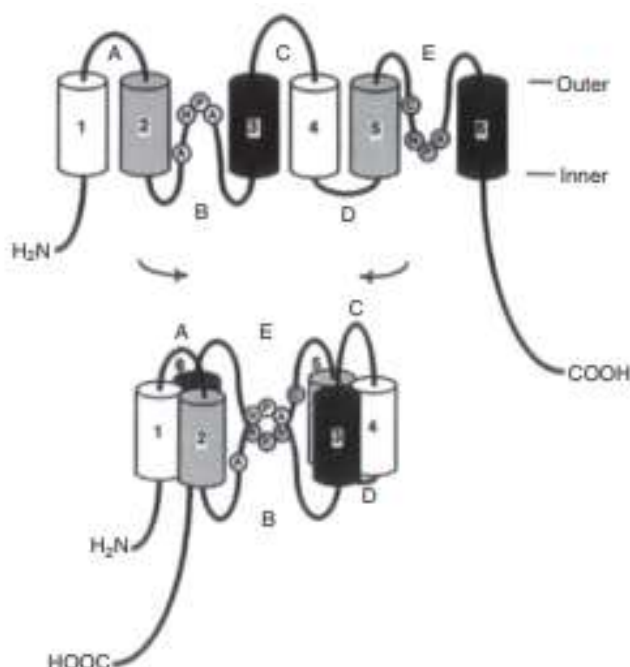


Figura 4 – Estrutura geral das Aquaporinas. Esquema representativo da estrutura básica das aquaporinas. Na parte superior da imagem observa-se a disposição linear das estruturas terciárias da proteína, onde destacam-se as seis alfa hélices transmembrana, bem como as hélices curtas que formam os domínios NPA. Na parte inferior observa-se o esquema ilustrativo da estrutura quaternária das aquaporinas, onde destaca-se a formação do poro pelos domínios NPA. **Adaptado de JUNG et al., 1994 e SPRING; ROBICHAUX; HAMLIN, 2009.**

Dentre os insetos, acredita-se que o número de genes relacionados a diferentes aquaporinas pode variar entre seis e dez (BENOIT et al., 2014; DRAKE; RODRIGUEZ;

HANSEN, 2015b; ISHIBASHI et al., 2011; SPRING; ROBICHAUX; HAMLIN, 2009). Uma das primeiras aquaporinas caracterizadas entre os insetos foi isolada de *Cicadella viridis* (Linnaeus, 1758), os quais se alimentam do líquido presente no xilema de plantas (HUBERT et al., 1989; SPRING; ROBICHAUX; HAMLIN, 2009). A quantidade de líquido que esses insetos tem que ingerir para acumular uma certa quantidade de nutrientes faz com que eles tenham que lidar com um grande volume de líquido. Ficou demonstrado então que a expressão da proteína AQP_{cic} nos túbulos de Malpighi daquele inseto estava diretamente relacionada com a capacidade de excreção do inseto, possibilitando a eliminação de água e consequente concentração de nutrientes (HUBERT et al., 1989). Dentre os insetos hematófagos, as aquaporinas foram apontadas como sendo extremamente importantes em fatores relacionados com a homeostase de água, resistência à dessecação, concentração do sangue durante a alimentação, dentre outros (BENOIT et al., 2014; SPRING; ROBICHAUX; HAMLIN, 2009).

Em *A. aegypti* foram identificadas seis aquaporinas, as quais apresentam diferentes padrões de expressão a depender do tecido analisado. No intestino médio e túbulos de Malpighi desse inseto, ficou demonstrado que as APQ1, 2, 4 e 5, são aquelas de maior expressão, sendo que apresentam pico de expressão em fêmeas logo após o repasto sanguíneo (DRAKE; RODRIGUEZ; HANSEN, 2015b). Vale destacar que a análise transcricional do intestino médio de *L. longipalpis* mostrou expressão de aquaporinas após a alimentação com sangue de fêmeas desse inseto (BENOIT et al., 2014; JOCHIM et al., 2008).

Três horas após alimentação com sangue, as fêmeas de *A. aegypti* são capazes de excretar cerca de 75% do volume total do sangue ingerido em forma de urina (DRAKE; RODRIGUEZ; HANSEN, 2015b; WILLIAMS; HAGEDORN; BEYENBACH, 1983). Esse dado se torna de extrema importância para o presente trabalho porque mostra a alta capacidade desses insetos em concentrar seu bolo alimentar, e ao que tudo indica, por meio de aquaporinas.

1.5 Via TOR

Uma das principais vias de sinalização celular envolvidas com o estado nutricional de um organismo é a chamada via TOR, que por sua vez encontra-se extremamente conservada entre os eucariotos (OLDHAM; HAFEN, 2003; SCHMELZLE; HALL, 2000;

WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). TOR (*Target of Rapamycin*) é uma quinase do tipo serina/treonina (apesar de se tratar de um complexo multiproteico, é comum na área o tratamento da via como uma unidade), pertencendo a família das quinases relacionadas ao fosfatidilinositol (PIKK; *Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase*), representando um complexo multiprotéico de efetores celulares com participação em processos como crescimento e progressão do ciclo celular, autofagia, integração de sinais e mobilização de nutrientes (**Figura 5**) (DE VIRGILIO; LOEWITH, 2006a; FINGAR; BLENIS, 2004; LOEWITH et al., 2002).

O sistema TOR pode ser dividido em dois complexos multiproteicos: TORC1 e TORC2 (**Figura 5**). A principal diferença entre os complexos reside nos estímulos aos quais eles são responsivos, bem como nos processos que ambos são capazes de controlar. TORC1 responde à disponibilidade de nutrientes, principalmente a presença de aminoácidos, participando do controle de processos como crescimento e metabolismo celular; TORC2, por sua vez, participa principalmente de processos de remodelação celular, envolvendo a reestruturação do citoesqueleto (**Figura 5**). Uma das principais diferenças entre os dois complexos diz respeito a resposta à rapamicina, somente TORC1 é sensível a essa molécula (**Figura 5**) (DE VIRGILIO; LOEWITH, 2006a; DUSZENKO et al., 2011; INOKI et al., 2005; LOEWITH et al., 2002; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006).

A rapamicina é uma lactona macrocíclica inicialmente isolada de extratos da bactéria *Streptomyces higroscopicus*. Essa droga é capaz de desencadear um estímulo que mimetiza a privação de nutrientes, o que resulta em redução da taxa de crescimento e proliferação celular, o que impacta diretamente o ciclo celular (ABRAHAM; WIEDERRECHT, 1996; LI; KIM; BLENIS, 2014; SCHMELZLE; HALL, 2000).

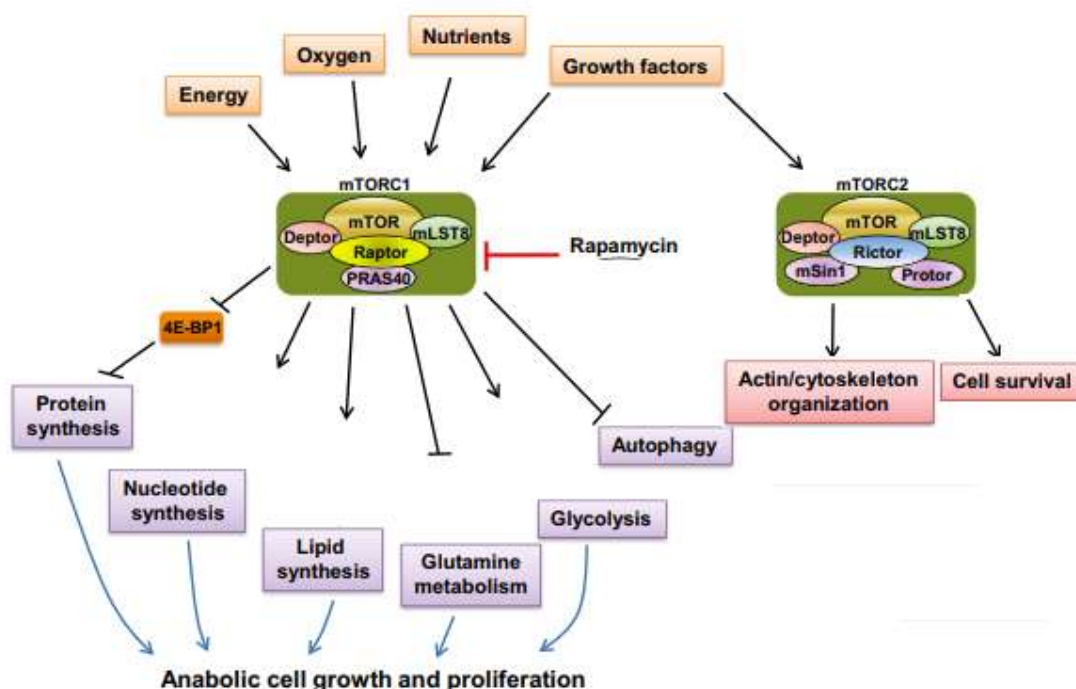


Figura 5 - Via TOR de sinalização celular. Esquema da via TOR de sinalização celular. Destaque para os estímulos capazes de ativar os dois complexos que compõem TOR (mTORC1 e mTORC2). Em roxo vê-se as funções celulares coordenadas por mTORC1 e tem rosa as funções coordenadas por mTORC2. Destaca-se ainda a ação da molécula 4E-BP (em laranja escuro), controlada por mTORC1, e que, no seu estado não fosforilado, inibe os eventos traducionais relacionados a via TOR. **Adaptado de Li et al., 2014.**

Em *A. aegypti*, alguns estudos mostram que o aumento da concentração de aminoácidos na hemolinfa após repasto sanguíneo ativa a cascata de sinalização do sistema TOR no corpo gorduroso, ativando a expressão de genes envolvidos com a vitelogênese. Além disso, quando TOR é inibido por rapamicina, há comprometimento da sinalização ao corpo gorduroso com relação à presença de aminoácidos, interferindo na fertilidade das fêmeas. (CARPENTER et al., 2012; HANSEN et al., 2004, 2005). Em fêmeas de *L. longipalpis* ficou demonstrado que o tratamento desses insetos com rapamicina durante o processo de alimentação com sangue, reduziu de maneira significativa a atividade de proteases intestinais, como a tripsina (SILVA FERNANDES et al., 2020). Além disso, o tratamento desses insetos com galactosamina, uma hexosamina derivada da galactose, reduziu a atividade de tripsina dessas fêmeas alimentadas

com sangue de maneira semelhante à rapamicina (SILVA FERNANDES et al., 2020). O mecanismo através do qual a galactosamina interfere na produção de tripsina tem relação com a inibição competitiva realizada por esse açúcar aminado no sítio catalítico das tripsinas, além disso Silva Fernandes e colaboradores demonstraram que esse açúcar é capaz de reduzir a fosforilação de 4E-BP (*Eukariotic Translation Initiation Factor 4E-binding Protein*) a níveis semelhantes aos observados para insetos em jejum ou alimentados somente com sacarose, sugerindo uma redução de ativação de TOR. Acredita-se que a galactosamina possa como um inibidor competitivo da via TOR com relação aos aminoácidos.

4E-BP é uma molécula que atua na inibição de eventos traducionais, perdendo essa capacidade quando fosforilada. Está colocada “*downstream*” a TORC1, portanto sob um estado nutricional favorável a ativação de TORC1, ocorre a fosforilação e inativação de 4E-BP, levando a continuidade dos eventos de sinalização da via TOR (**Figura 5**) (KIM; GUAN, 2011). Nepomuceno (2019) mostrou que após repasto sanguíneo de fêmeas de *L. longipalpis*, há intensa fosforilação de 4E-BP, estimulando a produção de enzimas digestivas tais como a tripsina, mostrando a participação da via TOR nos mecanismos envolvendo a digestão de sangue. Além disso, no mesmo estudo, foi demonstrada que a ação inibitória de rapamicina bloqueia o evento de alcalinização disparado por moléculas presentes na hemolinfa dos insetos que acabaram de se alimentar de sangue.

1.6 Insulina

A insulina é um dos peptídeos mais bem estudados do mundo, o que se deve ao fato de tal peptídeo estar relacionado com a regulação do metabolismo de carboidratos em seres humanos. A falha na produção ou na sensibilidade a insulina leva a condição conhecida como diabetes (MAYER; ZHANG; DIMARCHI, 2007; WU; BROWN, 2006). A insulina humana é um peptídeo hormonal de 51 aminoácidos, com peso molecular de 5807 Da (THOMAS; THEVIS, 2019).

Hoje sabe-se que a molécula conhecida como insulina, é em si, apenas um de muitos peptídeos pertencentes a uma superfamília multigênica que incluem as relaxinas, os peptídeos semelhantes à insulina (do inglês *insulin-like peptides*; ILPs), e os fatores de crescimento

semelhantes à insulina (do inglês *insulin-like growth factors*; IGFs), todos presentes em vertebrados (WU; BROWN, 2006), sendo diferenciados através do processamento de seus prepropeptídeos, e através das vias de sinalização que são capazes de induzir (WEN et al., 2010). Desse modo, é muito comum que alguns estudos relativizem o papel de todas essas moléculas, agrupando-as sob o termo insulinas. A estrutura e função dos ILPs e IGFs são extremamente conservadas entre os organismos vertebrados, o faz com que tais peptídeos possam ser utilizados como relógios moleculares, auxiliando em estudos evolutivos (SMIT, 1998).

Entre os invertebrados, os ILPs e os IGFs formam um grupo estruturalmente diversificado, sendo codificados por diversas famílias multigênicas. Os genes relacionados a expressão de diferentes ILPs já foram identificados em Orthoptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Diptera. Todos os peptídeos compartilham a estrutura básica da insulina, porém, podem apresentar modificações a depender do grupo de invertebrados ao qual pertencem (SMIT, 1998; WU; BROWN, 2006).

Vale destacar que Veenstra em 1989, apontou que os ILPs de invertebrados provavelmente não teriam relação com a regulação de carboidratos na hemolinfa desses organismos (VEENSTRA, 1989), contudo outros estudos da mesma época refutam essa hipótese, acusando os ILPs como homônios capazes de reduzir os níveis tanto de glicose como de trealose presentes na hemolinfa dos insetos (CHEN; FRIEDMAN, 1977; DUVE, 1978; NORMANN, 1975; WU; BROWN, 2006). Outros estudos, também em invertebrados, conseguiram mostrar o papel desses peptídeos em vias de sinalização relacionadas com o desenvolvimento, longevidade, metabolismo e reprodução (CLAEYS et al., 2002; WU; BROWN, 2006).

Entre os insetos pertencentes a ordem Diptera, os ILPs são muito bem conhecidos em *Drosophila melanogaster*, onde são produzidos por sete genes bem caracterizados, com suas expressões variando conforme o tecido e o estágio de desenvolvimento do inseto (BROGIOLO et al., 2001). Sete também foram os genes relacionados aos ILPs encontrados em *Anopheles gambiae* (Giles, 1902) (KRIEGER et al., 2004). Já para *A. aegypti*, foram encontrados oito genes relacionados a expressão de ILPs (RIEHLE et al., 2006). Um dado interessante diz respeito a

ativação da via de sinalização induzida pela insulina (a ligação de ILPs aos seus receptores leva a ativação da via fosfoinositol-3-quinase/AKT), que nos insetos, pode ser ativada por qualquer insulina produzida entre os mamíferos, o que faz com que os ILPs tanto de vertebrados como de invertebrados sejam vistos como homólogos (TELEMAN, 2010; WEN et al., 2010).

Dentre as fêmeas de mosquitos, ficou demonstrado que, há uma ativação da via de sinalização relacionada a insulina logo após a alimentação com sangue. A ativação dessa via leva a uma cascada de eventos que culmina com a absorção de nutrientes, a produção de hormônios ecdisteróides e a produção de vitelogenina (ARIK et al., 2009; BROWN et al., 1998, 2008; ROY; HANSEN; RAIKHEL, 2007; SIM; DENLINGER, 2008; WEN et al., 2010). Em *D. melanogaster* os ILPs, através da ativação da via de sinalização relacionada a insulina, participam da ativação da via TOR (**item 1.5**) (**Figura 6**), o que culmina com processos relacionados a digestão dos insetos (BRANDON et al., 2008; CASTILLO; BROWN; STRAND, 2011).

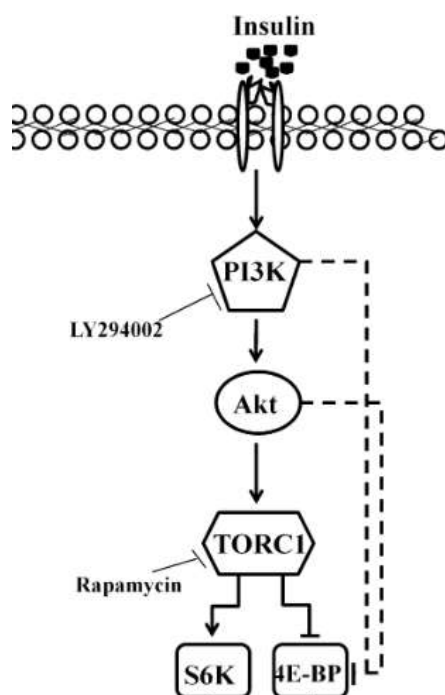


Figura 6 – Ligação entre Insulina e a ativação de via TOR. Esquema representativo da ativação da via TOR a partir da ação da insulina. Destaque para a ativação do complexo TORC1, o qual é sensível a ação inibitória de rapamicina. Adaptado de Li et al., 2015.

Dentre os ILPs produzidos por *A. aegypti*, acredita-se que os ILP3 e ILP4 sejam aqueles que participam diretamente da ativação das vias de sinalização anteriormente citadas (*Insulin-pathway* e *TOR-pathway*). Ambos os peptídeos são sintetizados no cérebro do inseto e tem sua quantidade aumentada na hemolinfa momentos após a alimentação com sangue (BROWN et al., 2008; CASTILLO; BROWN; STRAND, 2011).

1.7 Polietilenoglicol (PEG)

Polietilenoglicol (PEG; *Polyethylene glycol*) é um polímero sintético derivado do petróleo, pode também ser encontrado sob as seguintes nomenclaturas: *Polyethylene oxide* (PEO) e *Polyoxyethylene* (POE) (BAILEY; KOLESKE, 2000). Trata-se, portanto, de um poliéter composto por unidades repetidas de etilenoglicol $[H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH]$ (**Figura 7**). Comercialmente são encontrados com os mais diferentes graus de polimerização, podendo também apresentar ligações terminais específicas de grupamentos biologicamente ativos (D'SOUZA; SHEGOKAR, 2016).

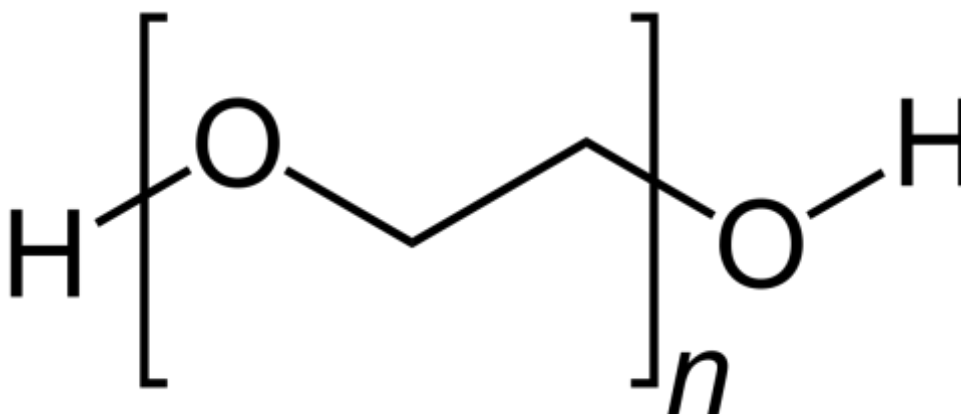


Figura 7 - Molécula de Polietilenoglicol. Fórmula estrutural da unidade básica de Polietilenoglicol, onde “n” representa o número de repetições que compõem a unidade molecular.

Devido a sua ampla versatilidade, essa molécula tem sido usada para as mais diferentes funções, como entrega de fármacos, produção de anticongelantes e lubrificantes, e como

componentes de matrizes de purificação, como, por exemplo resinas de cromatografia líquida (D'SOUZA; SHEGOKAR, 2016).

Mesmo se tratando de uma molécula sintética com a qual, em condições naturais, um inseto hematófago nunca entraria em contato durante o processo de alimentação, nosso grupo de pesquisa, em experimentos preliminares para determinação de potenciais estimuladores de alcalinização, mais especificamente experimentos que buscavam determinar se a dilatação intestinal durante o processo de alimentação teria relação com o disparo de mecanismos de alcalinização e com o desligamento dos processos de acidificação, mostrou que PEG, apesar de não provocar dilatação no intestino dos insetos, de uma maneira não esclarecida, era capaz de induzir o processo de alcalinização em insetos que viessem a ingerir este composto.

Diante de tudo o que foi exposto anteriormente, o presente projeto surgiu com o propósito de identificar quais seriam os gatilhos que dão início aos mecanismos de alcalinização intestinal. Como destacado anteriormente, as fêmeas de *L. longipalpis* mostraram capacidade de alcalinização frente a diversos tipos de proteínas, até mesmo proteínas com as quais os insetos jamais se alimentariam. Esses resultados indicavam que poderia haver um padrão molecular que fosse reconhecido pelos intestinos. Além disso, a alimentação dos insetos com PEG e a resposta de alcalinização por parte das fêmeas que se alimentavam desse composto, indicavam existir uma outra resposta de estímulo intestinal, a qual, por sua vez, deveria ser diferente daquela observada para proteínas, uma vez que não há semelhança estrutural entre moléculas de proteínas e as moléculas de PEG.

Portanto, a fim de investigar os mecanismos através dos quais os processos de alcalinização intestinal de *L. longipalpis* são iniciados, bem como seus desdobramentos intracelulares, foram delineados uma série de experimentos, os quais deram origem a este trabalho.

2. JUSTIFICATIVA

Lutzomyia longipalpis é um inseto hematófago, sendo nas Américas o principal vetor de *Leishmania infantum* (SOARES; TURCO, 2003), o agente etiológico da leishmaniose visceral americana. Apresenta ampla distribuição pelo território brasileiro, destacando-se principalmente na região nordeste do país (ANDRADE-FILHO et al., 2017; HARHAY et al., 2011; SHAW; RANGEL, 2018). Além disso essa espécie é considerada a mais bem adaptada ao ambiente urbano, com amplo crescimento desse processo de urbanização a partir dos anos 80 (LAINSON; RANGEL, 2005; RANGEL; LAINSON, 2009), o que impacta diretamente em estratégias de controle, tanto do vetor como da própria leishmaniose visceral.

O pH é uma propriedade química de grande importância, influenciando nas mais variadas funções biológicas, participando de forma essencial na manutenção da homeostase de um organismo (DEMAUREX, 2002). No que diz respeito ao processo de digestão dos insetos, observa-se que o pH tem papel central, uma vez que a maioria das enzimas digestivas possuem atividade máxima em uma faixa de pH bem determinada (APPLEBAUM, 1985; HARRISON, 2001; TERRA; FERREIRA, 1994). É sabido também que o pH do meio tem influência sobre o processo de desenvolvimento de *L. infantum* “*in vitro*”, onde um pH mais ácido acaba por estimular o processo de metaciclogênese desse protozoário ao final do processo de digestão do inseto (BATES; TETLEY, 1993). Esse dado é extremamente interessante porque mostra haver uma relação entre o processo digestivo do inseto e o próprio desenvolvimento de *L. infantum*, como demonstrado por Santos e colaboradores (SANTOS et al., 2014).

Dado o fato de que a maior parte dos estudos envolvendo o controle de pH intestinal em diferentes condições fisiológicas foram realizados em *L. longipalpis*, principalmente no que diz respeito ao pH intestinal (sua manutenção e processos digestivos que o influenciam) (GONTIJO et al., 1998; NEPOMUCENO et al., 2022a, 2022b; SANTOS et al., 2008, 2011), as fêmeas desse inseto se mostram como o melhor modelo para o estudo dos processos envolvendo os mecanismos de alcalinização intestinal que ainda não se encontram elucidados. Dentre estes últimos, destacam-se principalmente aqueles relacionados ao reconhecimento de moléculas e início dos processos de alcalinização intestinal. Além disso, são desconhecidas muitas das etapas das vias de sinalização intracelular que levam à alcalinização intestinal. Com isso, o

presente projeto se propôs a esclarecer justamente esses pontos, buscando descrever se ocorrem ou não padrões moleculares que são reconhecidos pelos intestinos de *L. longipalpis*, levando ao início do processo de alcalinização intestinal, bem como elucidar etapas de sinalização intestinal ainda desconhecidas.

Estudos que visam entender processos fisiológicos básicos, não só de *L. longipalpis*, mas de insetos hematófagos como um todo, têm grande importância para o preenchimento de lacunas envolvendo aspectos básicos da fisiologia intestinal de um organismo. Além disso, esses estudos abrem portas para o desenvolvimento de pesquisas aplicadas ao controle não somente do inseto vetor, como também dos patógenos por eles transmitidos, principalmente *Leishmania*, uma vez que seu ciclo de desenvolvimento se dá exclusivamente no ambiente intestinal de flebotomíneos. O presente trabalho mostra sua relevância justamente por se debruçar sobre os aspectos básicos envolvendo o processo de alcalinização intestinal de *L. longipalpis*, tanto no que diz respeito a sinalizações intracelulares como nos processos extracelulares que ativam esse mecanismo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Identificar e descrever etapas intra e extracelulares dos mecanismos de alcalinização intestinal de *L. longipalpis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar ensaios de alimentação de *L. longipalpis* com a molécula sintética Polietilenoglicol (PEG 8.000) e estudar o efeito de diferentes concentrações dessa molécula no processo de alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*.

- Investigar a importância de íons durante o processo de alcalinização intestinal em *L. longipalpis*, utilizando PEG 8.000 como molécula estimuladora do processo. Além disso verificar se a presença de Sacarose na solução de alimentação potencializa a alcalinização.

- Investigar se a alimentação de *L. longipalpis* com moléculas como Dextran, Celobiose e PEG 100.000, é capaz de provocar alcalinização intestinal semelhante a PEG 8.000 em *L. longipalpis*, quando oferecidas em uma mesma concentração.

- Verificar se a aplicação de soluções hiperosmóticas de PEG 8.000 e sacarose, bem como a aplicação direta de PEG 8.000 em pó sobre intestinos dissecados de *L. longipalpis*, são capazes de disparar os processos de alcalinização intestinal.

- Determinar o papel das aquaporinas intestinais de *L. longipalpis* no processo de alcalinização intestinal disparado pelo desbalanço osmótico entre lúmen e enterócitos.

- Analisar se a hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com PEG 8.000 apresenta potencial de alcalinização intestinal semelhante a encontrada para a hemolinfa de fêmeas recém alimentadas com sangue.

- Investigar se a distensão intestinal provocada por estímulos externos em intestinos dissecados ou pela ingestão de microesferas de látex promovem a alcalinização intestinal em *L. longipalpis*.

- Determinar a concentração relativa de aminoácidos na hemolinfa de fêmeas alimentadas com sangue.

- Estudar a participação de Ca^{+2} no processo de degranulação de células enteroendócrinas de fêmeas de *L. longipalpis*, bem como analisar se peptídeos secretados por aquelas células apresentam potencial de alcalinização sobre outros intestinos ácidos de *L. longipalpis*.

- Verificar se a aplicação “*ex vivo*” de insulina sobre intestinos médios de fêmeas de *L. longipalpis* que se encontram ácidos, é capaz de disparar os mecanismos de alcalinização intestinal.

- Determinar o padrão de peso molecular dos peptídeos obtidos a partir da estimulação de intestinos de *L. longipalpis* com ionóforo de cálcio.

- Verificar se intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* expressam genes relacionados a *Insulin-like peptides* e aos *Insulin-like receptors*, bem como analisar se existe diferença na expressão desses genes entre fêmeas que se alimentaram, ou não, de sangue.

- Investigar se a alcalinização intestinal disparada por PEG 8.000 envolve os mesmos mecanismos de sinalização intracelulares observados no processo de alcalinização promovido pela alimentação com aminoácidos, sangue, soro ou outras proteínas, através da alimentação dos insetos com diferentes inibidores de transportadores ou de vias de sinalização celular.

- Verificar se a alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com PEG 8.000 estimula a atividade tripsinolítica.

4. METODOLOGIA

4.1 Comitê de ética

Todos os experimentos desenvolvidos nesse trabalho foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/ICB-UFMG), número de protocolo 141/2018, e com os manuais de experimentação animal, sendo os animais utilizados neste projeto destinados exclusivamente à manutenção da colônia de insetos.

4.2 Material Biológico

Os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* foram obtidos de uma colônia originada da cidade de Teresina (PI), mantidos de acordo com (Modi & Tesh 1983) no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH). Sendo criados em condições controladas de temperatura e umidade, com período claro-escuro de 12 horas.

As larvas foram criadas em potes plásticos sendo alimentadas com mistura de fezes de coelho, húmus de minhoca e ração para coelho. Os adultos, assim que emergiam da pupa, foram alimentados com solução de sacarose à 15%, sendo posteriormente realizado repasto sanguíneo em Hamsters (*Mesocricetus auratus*) previamente anestesiados com 0,2 mL de Thiopental® (50 mg/mL).

Em todos os protocolos desenvolvidos neste trabalho, os adultos de *L. longipalpis*, apresentavam entre 3 e 6 dias de idade, sendo alimentados, ou mantidos em jejum, de acordo com os requisitos de cada experimento.

4.3 Ensaio para determinação de pH intestinal a partir de alimentação com Azul de Bromotimol

Os insetos adultos foram separados e alimentados em algodão embebido com solução de sacarose 15% contendo o corante indicador vital. Os insetos foram mantidos em jejum por um período de 24 horas, após o qual recebiam o algodão contendo a solução de sacarose e corante indicador, ficando esta última disponível “*ad libitum*” por 24 horas. Nenhuma das

soluções oferecidas aos insetos foi tamponada. A depender do experimento, outros solutos eram adicionados à solução (descritos posteriormente no corpo deste texto).

O corante indicador utilizado foi Azul de Bromotimol ($pK_a = 7,4$), na concentração final de 0,1%, sendo o valor final de pH da solução oferecida aos insetos, ajustado de acordo com o que se pretendia observar em cada experimento.

Passado o tempo de alimentação, os insetos foram dissecados com o auxílio de microscópio estereoscópico, e a coloração adquirida pela região do intestino médio comparada com escala padrão de indicação para o corante Azul de Bromotimol (**Figura 8**). Os resultados foram lançados como observações individuais de cada inseto, sendo agrupados em faixas de pH a depender do experimento realizado.

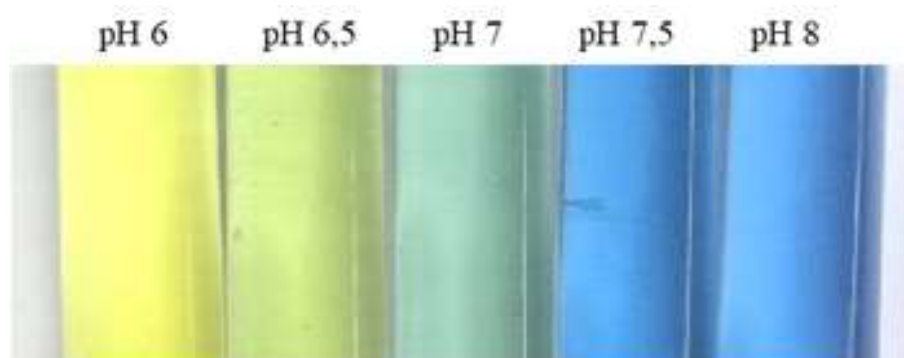


Figura 8 - Escala padrão de indicação para Azul de Bromotimol. Soluções tamponadas padrão para Azul de Bromotimol 0,1%, com faixa de indicação de 6.0 a 8.0, variando em 0.5 unidades de pH.

Para todos ensaios onde foram realizadas dissecações, as quais foram feitas em solução de IS (Insect Saline): $119,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$; $2,68 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$; $1,36 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$; e $0,56 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose.

4.4 Ensaio de alimentação com PEG 8.000

Como descrito no item 4.3, os insetos adultos foram separados e alimentados em algodão embebido com solução de sacarose 15% contendo o corante indicador vital e PEG

8.000 (Sigma 202452), em diferentes concentrações, as quais foram escolhidas dependendo do experimento realizado (1 mM, 3 mM e 10 mM).

Também da mesma forma como descrito no item 4.3, os insetos foram mantidos em jejum por um período de 24 horas, após o qual recebiam o algodão contendo a solução de sacarose, corante indicador e PEG, ficando esta última disponível “*ad libitum*” por 24 horas. Nenhuma das soluções oferecidas aos insetos foi tamponada. Passado esse tempo, os insetos foram dissecados e a coloração adquirida pelo intestino médio foi comparada com escala padrão de indicação (**Figura 8**). Os valores de pH foram anotados de forma individual, sendo posteriormente agrupados em faixas de pH.

A fim de determinarmos a influência da sacarose nos processos de alcalinização observados com base na metodologia anteriormente exposta, realizamos também ensaios onde os insetos se alimentaram somente de solução contendo PEG 8.000 [10 mM] e o corante azul de Bromotimol [0,1%].

4.5 Ensaio de alimentação para verificar a capacidade de alcalinização de DEXTRAN, PEG 100.000 e Celobiose

A fim de verificarmos a capacidade alcalinizante de outras moléculas sintéticas diferentes de PEG, realizamos alimentação de *L. longipalpis* com duas moléculas sintéticas, Dextran 10.000 à 10 mM e Celobiose à 10 mM. Além disso, realizamos também a alimentação dos insetos com PEG 100.000, uma molécula maior, mas que poderia nos dar respostas interessantes.

A alimentação com Dextran 10.000 foi realizada em algodão embebido em solução contendo Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e Dextran 10.000 [10 mM], todos dissolvidos em IS, sendo o pH final da solução ajustado para 6.0. O tempo máximo de alimentação foi de 4 horas. As alimentações com PEG 100.000 e Celobiose, a exemplo da alimentação descrita anteriormente, foram realizadas em solução contendo Sacarose 15% e Azul de Bromotimol 0,1% em IS, contudo, a solução foi oferecida aos insetos através de alimentação artificial utilizando o aparelho Hemotek® (alimentador comercial no qual uma

solução pode ser oferecida aos insetos em uma dada temperatura, utilizando-se de membranas orgânicas ou sintéticas, as quais mimetizam a pele de um hospedeiro).

Em ambos os experimentos, após a alimentação, os insetos foram dissecados em solução IS, a cor dos intestinos observada e comparada com escala padrão para o corante indicador (**Figura 8**). Os resultados foram anotados como observações individuais.

4.6 Ensaio para verificar a capacidade de estímulos osmóticos ou mecânicos no processo de alcalinização

A fim de verificar se choques osmóticos externos ao intestino médio seriam capazes de disparar o mecanismo de alcalinização intestinal, foram realizadas aplicações de soluções de sacarose [2,5 M], PEG 8.000 [100 mM] e PEG 8.000 em pó sobre intestinos dissecados de fêmeas de *L. longipalpis*.

No caso de estímulos mecânicos, foram testadas a capacidade de um estiramento manual do intestino médio ou da distensão por meio da ingestão de microesferas de látex em disparar os mecanismos de alcalinização no intestino médio das fêmeas de *L. longipalpis*. O estiramento manual foi realizado através da aplicação mecânica de movimentos com estiletes, a fim de estimular os enterócitos (o intestino foi preso em suas extremidades, sofrendo leves puxões por 4 vezes); a distensão por ingestão foi realizada através da alimentação das fêmeas em alimentador artificial (Hemotek®) com solução de sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e “látex beads” (microesferas de látex) (Sigma LB-5), as quais foram preparadas em solução de IS na proporção de 50% (v/v).

No ensaio de alcalinização por choque osmótico, as fêmeas alimentadas por 24 horas com solução de sacarose 15% e Azul de Bromotimol 0,1%, tiveram seus intestinos dissecados. Foram utilizados para aplicação das soluções e de PEG 8.000 em pó, somente aqueles intestinos que apresentaram coloração amarela, ou seja, $\text{pH} \leq 6.0$. Esse critério de seleção dos intestinos foi utilizado devido ao fato de procurarmos por uma resposta de alcalinização, a qual só seria visualizada em testes realizados sobre intestinos ácidos.

No caso das soluções (sacarose [2,5M] e PEG 8.000 [100 mM]), foi aplicado sobre os intestino um volume de 50 μ L; no caso do PEG 8.000 em pó, foi aplicado uma quantidade suficiente para cobrir o intestino. Para todos os experimentos o tempo de observação foi de 10 minutos, contados a partir da aplicação.

No ensaio de estiramento mecânico, a exemplo do que aconteceu para o ensaio de alcalinização a partir do choque osmótico, foram utilizadas fêmeas alimentadas por 24 horas com solução de sacarose 15% e Azul de Bromotimol 0,1%, as quais foram posteriormente dissecadas. Foram selecionados somente intestinos que apresentavam $\text{pH} \leq 6.0$.

No ensaio de distensão por ingestão, as fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas com a solução contendo as microesferas de látex seguindo protocolo de alimentação artificial em Hemotek®. A solução contendo sacarose, azul de Bromotimol e *látex beads*, todos dissolvidos ou diluídos em IS, foi colocada no alimentador e oferecida aos insetos por 3 horas. Passado esse tempo, os insetos foram dissecados e a coloração do intestino foi comparada com escala padrão de pH (**Figura 8**).

Os resultados para todos os ensaios foram anotados e contabilizados como observações individuais. Nos ensaios de estiramento mecânico, foi considerado como controle o pH apresentado pelos intestinos antes da aplicação dos estímulos.

4.7 Ensaio para verificar a capacidade alcalinizante da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com PEG 8.000

Como um dos mecanismos envolvidos na alcalinização intestinal de *L. longipalpis* envolve a liberação de moléculas induzidas pelo repasto sanguíneo na hemolinfa dos insetos (**item 1.2 da introdução**), resolvemos testar se a alimentação com PEG 8.000 [10 mM] é capaz de também induzir essa mesma liberação que ocorre após a ingestão de sangue. Para obtenção da hemolinfa a ser utilizada, três fêmeas de *L. longipalpis* de 4 a 5 dias de idade alimentadas com sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 [10 mM] dissolvidos em IS tiveram seu abdômen aberto em 1 μ l de PBS, o volume obtido foi então coletado com uma ponteira, sendo posteriormente aplicado sobre o intestino de outras fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas somente com solução de sacarose 15% e Azul de Bromotimol

0,1% dissolvidos em IS. Foi coletada a hemolinfa somente de fêmeas com tempo pós-alimentação igual ou inferior a 2 horas.

Como controle foram utilizados os valores de pH dos intestinos antes da aplicação da hemolinfa das fêmeas que haviam se alimentado com PEG 8.000. Foram utilizados somente aqueles intestinos que apresentavam coloração inicial que indicasse um $\text{pH} \leq 6$. Os intestinos das fêmeas de *L. longipalpis* alimentados com o corante Azul de Bromotimol em sacarose 15% foram retirados e colocados sobre bloco de agarose 2%, de modo a evitar que os mesmos ressecassem.

De forma complementar a este experimento, realizamos também ensaio para obtenção e confirmação do efeito alcalinizante de moléculas extraídas do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*. A extração das moléculas foi realizada seguindo protocolo de Santos e colaboradores, 2011. Brevemente, 60 intestinos de fêmeas com 3 dias de idade foram dissecados em solução IS, sendo posteriormente transferidos para tubos contendo 20 μL de IS e 2 mmol/L de EDTA, um inibidor de metaloproteases usado para garantir que não haveria degradação dos peptídeos extraídos. Posteriormente os tubos foram imediatamente aquecidos à 100 °C por 10 minutos. Passado esse tempo, o material foi resfriado e sonificado em sonificador de banho por 10 minutos. A amostra foi então homogeneizada e submetida à centrifugação por 10 minutos à 10.000 G. O sobrenadante foi então transferido para novo tubo. Durante os ensaios, 1 μL do extrato foi aplicado diretamente sobre intestinos que apresentavam $\text{pH} \leq 6$ de fêmeas de *L. longipalpis* que haviam se alimentado de solução de Sacarose 15% e Azul de Bromotimol 0,1%. Para evitar desidratação dos intestinos, os intestinos após dissecação foram colocados em blocos de agarose 2% preparada em IS. Os intestinos após aplicação do extrato foram observados por 10 minutos, sendo as mudanças de cor observadas e comparadas com escala padrão para o corante. (**Figura 8**).

4.8 Ensaio para determinação da concentração relativa de aminoácidos na hemolinfa extraída de fêmeas de *L. longipalpis*

A fim de verificarmos a influência de componentes da hemolinfa de fêmeas alimentadas com sangue no processo de alcalinização, mais especificamente a influência de aminoácidos no

processo, que poderiam agir diretamente sobre os intestinos, sendo os indutores de alcalinização, ou mesmo atuar como cofatores que potencializariam a ação das moléculas alcalinizadoras, realizamos ensaio de dosagem de aminoácidos na hemolinfa de fêmeas alimentadas e não alimentadas com sangue. Para as fêmeas alimentadas com sangue, realizamos a dosagem em dois períodos de tempo diferentes, 2 horas e 30 horas após a alimentação com sangue.

A dosagem foi realizada seguindo os protocolos propostos por Haeger e colaboradores, 2022 e Starcher, 2001, com algumas modificações. Brevemente, realizamos a preparação do reagente de ninhidrina, composto por: Ninhidrina [112,2 mM]; Etilenoglicol; Tampão Acetato de Sódio [4 M] pH 5.5; e Cloreto Estanhoso (SnCl_2). Foram preparados três grupos, sendo eles: branco, no qual a 100 μL de ninhidrina eram adicionadas 10 μL salina 0,9%; padrão, no qual a 100 μL do reagente de ninhidrina eram adicionados 10 μL de L-Alanina à 2 mM dissolvida em salina 0,9%; e por último o grupo teste, onde a 100 μL do reagente de ninhidrina eram adicionados 10 μL das amostras de hemolinfa coletada dos insetos. Foi utilizada hemolinfa de 5 insetos (em 5 μL de salina 0,9%, cinco fêmeas tiveram o abdômen aberto, posteriormente, mais 5 μL de salina 0,9% foram somados ao volume inicial, totalizando 10 μL de amostra). Após a preparação, todos os grupos foram incubados a 100 °C por 10 minutos. Sendo posteriormente resfriados em gelo.

Os resultados foram obtidos a partir dos valores de absorbância de cada grupo, os quais foram obtidos em um leitor de placas à 570 nm. Nos poços, 25 μL de cada grupo foram adicionados a 225 μL de tampão Tetraborato de Sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) [100 mM] pH 10. Os valores de absorbância foram então normalizados com base no valor de absorbância obtido para a amostra padrão de L-Alanina, sendo expressos em nmoles de aminoácidos / inseto.

4.9 Alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com diferentes inibidores de transporte iônico e de sinalização intracelular

Para verificarmos a participação de transportadores específicos e de segundos mensageiros nos mecanismos de alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*, realizamos uma série de experimentos de alimentação desses insetos com diferentes inibidores.

Diante do fato de que a alimentação das fêmeas de *L. longipalpis* com PEG 8.000 [10 mM] foi capaz de disparar a alcalinização intestinal, todas as alimentações para verificar o bloqueio desse processo foram realizadas com fêmeas que se alimentaram de solução contendo PEG 8.000 [10 mM], sacarose 15% e Azul de Bromotimol 0,1%, tudo dissolvido em IS. Os inibidores eram acrescentados a essa solução de acordo com a necessidade. Após cada alimentação, os insetos foram dissecados e a coloração adquirida pelo intestino médio foi observada.

Para inibição do transportador de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ foram utilizados dois inibidores: DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid) e NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid). Ambos os inibidores foram oferecidos aos insetos em solução contendo PEG 8.000 [10 mM], sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e um dos inibidores, a depender do experimento (DIDS [0,1 mM] ou NPPB [0,1 mM]), todos dissolvidos em IS. As soluções foram oferecidas aos insetos após um período de jejum de 24 horas, em algodão embebido, por um período máximo de 4 horas. Realizamos também a alimentação de fêmeas com o inibidor H89, um inibidor que atua bloqueando a fosforilação do transportador de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$. Essa alimentação foi realizada com solução de Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, PEG 8.000 [10 mM] e H89 10 μM utilizando método de alimentação artificial em Hemotek® (a semelhança na alimentação descrita no **item 4.6** da metodologia).

Para inibição de uma das principais vias de sinalização celular, a via TOR, realizamos alimentação de *L. longipalpis* com o inibidor Rapamicina na concentração final de 20 μM . Assim como no experimento anteriormente descrito, a solução contendo o inibidor (Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, PEG 8.000 [10 mM] e Rapamicina 20 μM ; pH = 6,0), foi oferecida em algodão embebido, sendo o período máximo de alimentação igual a 6 horas. Além disso, em resultados anteriores do nosso grupo, ficou demonstrada a capacidade de inibição da via TOR por galactosamina (SILVA FERNANDES et al., 2020), um carboidrato aminado. Dessa forma realizamos ensaio onde, na solução de alimentação, a Rapamicina foi substituída por Galactosamina, na concentração final de 30 mM.

A fim de verificar a participação de segundos mensageiros no processo de alcalinização disparado por PEG 8.000, e com base nos resultados obtidos por Nepomuceno e colaboradores, onde ficou clara a participação de cAMP no processo de alcalinização, realizamos alimentação

de fêmeas de *L. longipalpis* com solução de Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, PEG 8.000 [10 mM], Rapamicina 20 μ M e análogo permeável de cAMP (Sigma D0627) à 2,8 mM, todos dissolvidos em IS. Essa alimentação tinha por objetivo verificar a capacidade de cAMP de reverter o bloqueio de alcalinização realizado por Rapamicina. A exemplo da alimentação descrita anteriormente, esta também foi realizada em algodão embebido, sendo de 4 horas o período máximo de alimentação dos insetos. Para confirmar a participação de cAMP no processo de alcalinização, realizamos também uma segunda alimentação, utilizando dessa vez o inibidor DDA (2',5' - dideoxy adenosine), inibidor específico da Adenilato ciclase. Como descrito anteriormente, a alimentação foi realizada em algodão embebido com solução de Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, PEG 8.000 [10 mM] e DDA 2 mM, com período máximo de alimentação de 4 horas.

4.10 Ensaio para determinação do potencial alcalinizante de insulina e serotonina sobre o intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*.

A fim de verificarmos a participação dos hormônios insulina e serotonina no processo de alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*, realizamos experimentos onde, sobre o intestino médio das fêmeas, após a dissecação, aplicamos 20 μ L de soluções de insulina bovina [0,1 mM] (Sigma I6634) e serotonina [0,1 mM] (Sigma H9523), separadamente.

Os insetos selecionados para o ensaio foram previamente alimentados, por um período de 24 horas, com solução contendo sacarose 15% e Azul de Bromotimol 0,1%. Foram utilizados somente aqueles intestinos que apresentavam coloração inicial que indicasse um $\text{pH} \leq 6$.

Como controle foram utilizados os valores de pH dos intestinos antes da aplicação das soluções contendo insulina e serotonina. Além disso, realizamos um outro grupo controle onde sob os intestinos dissecados aplicamos 20 μ L da solução IS utilizada para dissolver tanto a insulina bovina como a serotonina. Antes da aplicação dos compostos, os intestinos das fêmeas de *L. longipalpis* alimentados com o corante Azul de Bromotimol em sacarose 15% foram colocados sobre bloco de agarose 2 %, de modo a evitar que os mesmos ressecassem.

4.11 Análise da expressão de insulina e seu receptor em fêmeas de *L. longipalpis*

Em todos os experimentos realizados para análise de expressão gênica, foram utilizadas fêmeas de *L. longipalpis* com 3 a 6 dias de idade, as quais, a depender do experimento, foram selecionadas com base em sua alimentação. Foram utilizadas tanto fêmeas alimentadas somente com sacarose 15%, como também fêmeas recém alimentadas com sangue (com período máximo pós-alimentação de 2 horas).

Para extração e obtenção do RNA-total de *L. longipalpis*, utilizamos “pools” de 20 insetos. Cada “pool” foi processados de forma individual a depender do tecido alvo. Para análises que levaram em conta o RNA total obtido a partir de insetos inteiros, estes eram anestesiados através de rápida passagem em congelador, sendo posteriormente separados em tubos de plástico contendo 1 mL do reagente TRIzol®; para ensaios onde o intestino médio era o tecido de interesse, os insetos foram dissecados em microscópio estereoscópico com auxílio de estiletes, e o intestino médio transferido separadamente para tubo plástico contendo 1 mL do reagente TRIzol®. O material obtido foi então rapidamente sonificado em sonificador de banho (Branson 1510), sendo posteriormente homogeneizado com auxílio de pistilos de plástico previamente lavados e autoclavados. As demais etapas da extração seguiram protocolo padrão recomendado pelo fabricante (TRIzol™ Reagent).

Ao final das etapas de extração, o RNA total obtido foi tratado com Turbo DNase Free (Ambion RNA by Life Technologies) conforme instruções do fabricante, sendo posteriormente eluído em 30 µL de água Milli-Q livre de nucleases e quantificado à 260 nm em Nanodrop Lite® (Thermo Scientific).

Para síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems™), seguindo protocolo padrão recomendado pelo fabricante. Brevemente, 10 µL de RNA total (aproximadamente 20 µg de RNA), foram somados a 4 µL de Tampão RT; 1,6 µL de dNTP mix (100 mM); 4 µL de Random primers; 2 µL de Reverse Transcriptase Multiscribe; e 18,4 µL de água Milli-Q nucleasse-free, finalizando com uma reação com volume total de 40 µL. A reação foi realizada em termociclador Veriti® (Thermo Fisher) a 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos; e 85°C por 5 minutos. Finalizada a reação, as amostras foram mantidas

armazenadas a – 20°C até o momento de sua utilização. O cDNA sintetizado foi utilizado como molde tanto para as reações de PCR convencional como para as reação de PCR quantitativa.

Para identificação e seleção dos genes relacionados a insulina de *L. longipalpis*, neste organismo realizamos busca por sequências homólogas a sequência da *insulin-like peptide* 3 de *D. melanogaster* (NP_648360.2) através da ferramenta BLASTp no banco de dados Vector Base (<https://www.vectorbase.org/blast>). Da mesma forma, para obtenção das sequências homólogas referentes ao receptor de insulina de *L. longipalpis*, realizamos busca por BLASTp com base na sequência *insulin-like receptor* de *D. melanogaster* (CAY93031.1) no banco de dados Vector Base (<https://www.vectorbase.org/blast>). Para ambas as buscas selecionamos o primeiro melhor resultado, sendo eles: LLONM1_008043.P12976 para *insulin-like peptide* e LLONM1_009708.P15996 para *insulin-like receptor*. A confiabilidade das sequências selecionadas com relação as proteínas/peptídeos esperados foi testada através da busca por domínios conservados através do programa NCBI Conserved Domain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Uma vez selecionadas as sequências alvo para *Insulin-like peptide* e *Insulin-like receptor*, desenhamos os iniciadores tanto para a PCR convencional como para a PCR quantitativa através do programa Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>). Os iniciadores obtidos e selecionados são apresentados no **quadro 1**.

A PCR convencional foi realizada em termociclador Veriti® (Thermo Fisher), sendo realizados 35 ciclos de reação. Cada reação era composta por 1 µL de cDNA, 200 nM de cada iniciador (*Foward* e *Reverse*) (**Quadro 1**), 200 µM de dNTPs e 1 U de Taq DNA polimerase, com volume final de reação igual a 40 µL. Os ciclos do termociclador foram ajustados como se segue: 94°C por 45 segundos; 60°C por 45 segundos; e 72°C por 1 minuto. Para cada gene alvo foi também realizada um reação extra denominada controle negativo, onde o cDNA da amostra foi substituído por água Milli-Q, de forma a garantir a ausência de contaminação em qualquer um dos reagentes utilizados no processo. Os produtos de PCR foram então analisados em gel de agarose a 2% acrescido de Brometo de Etídio submetido a um campo elétrico de 100 mV em cuba de corrida contendo tampão TAE 1X. Posteriormente o gel foi observado sob luz ultravioleta e fotografado. Para todos os géis foram utilizados padrões moleculares de 100 pares de base (pb).

Nos experimentos de análise de expressão através de PCR quantitativo (RT-qPCR), 2 µL de cDNA foram adicionados ao mix de reação contendo Power SYBR Green PCR Master Mix e 300 nM de cada um dos iniciadores, totalizando um volume final de reação de 15 µL. As condições de amplificação utilizadas nos ensaios foram as seguintes: 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para cada gene alvo realizamos a adição de um controle negativo, onde o cDNA foi substituído por água Milli-Q. As análises dos resultados de amplificação foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O gene GAPDH de *L. longipalpis* foi escolhido como sendo o gene de referência para controle interno das reações (GenBank ABV60323.1) (**Quadro 1**).

Tanto nos ensaios de PCR convencional, quanto nos ensaios de PCR quantitativo, dois foram os grupos experimentais analisados, sendo eles: fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas somente com sacarose 15% e fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue, estas com período máximo de duas horas pós-alimentação com sangue.

GENE ALVO	Iniciador "Forward" 5' » 3'	Iniciador "Reverse" 5' » 3'	Amplicon (nº de pb)
GAPDH (GenBank ABV60323.1)	TTCGCAGAAGACAGTGATGG	CCCTTCATCGGTCTGGACTA	150 pb
Lulo-ILP3 (LLONM1_008043.P12976)	AACAACCTCATCATTTGCGTG	CCGCAGTAGCCCTTCAGTTC	401 pb
Lulo-ILR (LLONM1_009708.P15996)	GGGGGATCTCAAGGGGTACT	GAGACATCCAACGAACCGGT	302 pb

Quadro 1 - Identificação dos genes e das sequências de iniciadores. Quadro mostrando o número de acesso dos genes de *L. longipalpis* escolhidos para as análises de expressão gênica, tanto em PCR convencional como em RT-qPCR (GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; Lulo-ILP3: *L. longipalpis* Insulin-like peptide-3; Lulo-ILR: *L. longipalpis* Insulin-like receptor). Na segunda e terceira coluna observam-se as sequências dos iniciadores *Forward* e *Reverse* utilizados para cada um dos genes.

alvo. Na quarta e última coluna observa-se o tamanho, em pares de base, do produto de reação utilizando cada um dos iniciadores selecionados.

4.12 Ensaio de inibição da atividade de aquaporinas no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*

Para verificarmos a participação de aquaporinas no processo de alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*, realizamos ensaios de alimentação dessas fêmeas com Bumetanide, um inibidor de aquaporinas (ressalta-se o fato de não se tratar de um inibidor específico para as aquaporinas). Fêmeas de *L. longipalpis* com 3 a 6 dias de idade foram alimentadas com solução contendo PEG 8.000 [10 mM], sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e Bumetanide [0,1 mM] (solução estoque a 10 mM em etanol 100%) todos dissolvidos/diluídos em IS. As soluções foram oferecidas aos insetos após um período de jejum de 24 horas, em algodão embebido, por um período máximo de 4 horas. Passado o tempo de alimentação, os insetos foram dissecados e a coloração do intestino foi comparada com escala padrão de pH (**Figura 8**).

4.13 Ensaio de atividade tripsinolítica em intestinos de *L. longipalpis* alimentados com PEG 8.000

Fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas com solução de Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 [10 mM] dissolvidos em IS. Passado o período de alimentação (4 horas pós-alimentação), os insetos foram dissecados em solução IS, sendo selecionados para o experimento somente aqueles intestinos que apresentaram $\text{pH} \geq 7,0$. Como grupo controle foram utilizados insetos que se alimentaram somente com solução de Sacarose 15% e Azul de Bromotimol 0,1%, dissolvidos em IS.

Dois intestinos de cada grupo foram colocados separadamente em 100 μL de salina 0,9%, sendo posteriormente sonicados em sonificador de banho por 15 segundos. Em seguida o material foi centrifugado à 10.000 g, à 4°C por 5 minutos. Para o ensaio enzimático foram utilizados os seguintes reagentes: tampão TRIS-HCl 0,1 M com pH ajustado para 8,5 (100 μL); substrato BApNA na concentração final de 1 mM (20 μL); salina 0,9% (30 μL); e amostra do extrato de intestino (equivalentes a 1 intestino) (50 μL). O volume total da reação foi de 200

μL. A leitura foi realizada em leitor de ELISA à 410 nm, 30 °C em modo cinético com leituras a cada 30 segundos durante 30 minutos. A placa foi agitada por 5 segundos antes da primeira leitura. A atividade foi expressa como a quantidade de produto (p-Nitro-anilida) liberado por minuto.

4.14 Ensaio para verificar a participação de Ca^{+2} no processo de alcalinização intestinal

Para realização desse ensaio foram separadas fêmeas de *L. longipalpis*, as quais foram alimentadas com solução contendo Sacarose 15% e Azul de Bromotimol 0,1%, ambos dissolvidos em IS, por um período máximo de 24 horas. Passado o período de alimentação, os insetos foram dissecados, sendo selecionados para o ensaio somente aqueles intestinos que apresentavam-se ácidos, ou seja, apresentando coloração amarela.

Em paralelo, trinta insetos alimentados somente com solução de Sacarose 15% foram dissecados e seus intestinos médios lavados em solução IS. Posteriormente os intestinos foram colocados em tubo de ensaio contendo 9 μL de solução IS (que contém sais de Ca^{+2} em sua composição). Ao final, aos 9 μL foi acrescido 1 μL do ionóforo de cálcio A23187 (Sigma C7522), até uma concentração final de 10 μM, diluído em solução de IS (solução estoque de 1 mM dissolvido em DMSO). O tubo contendo os intestinos e solução de IS + Ionóforo foi então levemente agitado por aproximadamente 5 minutos. Como grupo controle utilizamos trinta intestinos, os quais após serem lavados, foram transferidos para tubo contendo 9 μL de solução IS, posteriormente a esse tudo foi acrescido 1 μL de solução IS + DMSO 1% (de modo que no volume final de 10 μL, a concentração final de DMSO fosse de 0,1%, a exemplo daquela encontrada no tubo contendo o ionóforo de cálcio).

Os intestinos das fêmeas de *L. longipalpis* alimentados com o corante Azul de Bromotimol em sacarose 15% foram retirados e colocados sobre lâmina de microscópio. Posteriormente foi aplicado sobre esses intestinos, de forma individual, 1 μL do conteúdo obtido a partir da estimulação com o ionóforo ou 1 μL do tubo destinado ao grupo controle. Os intestinos foram observados por no máximo 10 minutos, e as alterações de cor observadas.

Realizamos também experimento para obtenção de um outro grupo controle, onde, a exemplo do que foi descrito anteriormente, trinta insetos alimentados somente com solução de

Sacarose 15% foram dissecados e os intestinos médios colocados em tubo de ensaio contendo 9 µL de solução IS com EDTA [2 mM]. Posteriormente, aos 9 µL foi acrescido 1 µL do ionóforo de cálcio A23187, na concentração final de 10 µM, diluído em solução de IS + EDTA [2 mM] (solução estoque de 1 mM dissolvido em DMSO). Como EDTA atua como quelante de cálcio, este não estaria disponível e não estimularia os intestinos mesmo na presença do ionóforo.

4.15 Análises de espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS)

De maneira complementar ao experimento descrito no item 4.14 da metodologia deste trabalho, realizamos ensaios de espectrometria de massa (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass spectrometry* - MALDI/TOF-MS) (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics, Germany) em modo de varredura para determinar a massa/carga dos compostos liberados por intestinos médios de fêmeas de *L. longipalpis* após a estimulação com ionóforo de cálcio. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuários de Proteômica (LMProt), do ICB/UFMG.

A preparação do ensaios seguiu exatamente o mesmo procedimento descrito no item 4.14. Brevemente, quarenta e cinco insetos alimentados somente com solução de Sacarose 15% foram dissecados e seus intestinos médios lavados em solução IS. Posteriormente os intestinos foram colocados em tubo de ensaio contendo 13,5 µL de solução IS (que contém sais de Ca^{+2} em sua composição). Ao final, aos 13,5 µL foi acrescido 1,5 µL do ionóforo de cálcio A23187 (Sigma C7522), na concentração final de 10 µM, diluído em solução de IS (solução estoque de 1 mM dissolvido em DMSO). O tubo contendo os intestinos e solução de IS + Ionóforo foi então levemente agitado por aproximadamente 5 minutos. Como grupo controle utilizamos quarenta e cinco intestinos, os quais após serem lavados, foram transferidos para tubo contendo 13,5 µL de solução IS, posteriormente a esse tudo foi acrescido 1,5 µL de solução IS + DMSO 1% (de modo que no volume final de 15 µL, a concentração final de DMSO fosse de 0,1%, a exemplo daquela encontrada no tubo contendo o ionóforo de cálcio).

Após a estimulação com ionóforo de cálcio, ou com solução IS (no caso do grupo controle), os tubos contendo os intestinos foram centrifugados à 3.000 G por 5 minutos, em

centrífuga refrigerada à 4°C. Passado o tempo de centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo plástico previamente identificado.

Realizamos então o processo de dessalinização das amostras, o qual foi realizado através da passagem do sobrenadante recuperado de cada amostra por ponteiros contendo resina C18 (ZipTip® Pipette Tips – MilliPore REF ZTC18S096), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, as ZipTips foram ativadas pela passagem de 10 µL de solução de Acetonitrila (ACN) a 60% (3 vezes), seguida pela passagem de solução de Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,1% (3 vezes). Uma vez ativada, 10 µL de cada amostra foram passados sucessivas vezes pelas ZipTips, de maneira a saturar a resina com o material proteico/peptídico recuperado a partir da estimulação dos intestinos com ionóforo de cálcio ou solução IS. Após a passagem das amostras, a resina foi lavada por três vezes com solução de TFA 0,1%, sendo o material que se ligou à resina eluído em novo tubo plástico através da passagem sucessiva de solução de ACN 60% pelas ZipTips.

Após o procedimento de dessalinização, as amostras foram aplicadas em placa analisadora de aço (MTP AnchorChip 800/384 - Bruker Daltonics). Como matriz de dessorção, para todas as amostras, foi utilizado o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -HCCA – Bruker) em solução, no qual as amostras foram misturadas na proporção de 1:1 (v/v). Após secagem, iniciaram-se as leituras, sendo o espectro de massa obtido através do modo positivo/linear, utilizando o método LP-ClinProt (*FlexControl software*) com faixa de obtenção de 520 a 20.000 m/z. A calibração do instrumento foi realizada utilizando o kit *Peptide Calibration Standard II* (Bruker Daltonics 8222570) como referência.

4.16 Análises estatísticas

Nos resultados referentes aos ensaios de tripsina, foi realizado testes t-student sendo consideradas significativas diferenças com valor $p < 0,05$. Nos ensaios de alcalinização intestinal foram realizados testes de proporção de Fisher, sendo consideradas significativas diferenças com valor $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da alimentação com PEG 8.000 no pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*

Nosso grupo de pesquisa tem larga experiência em estudos da fisiologia intestinal de insetos hematófagos, sendo que os mecanismos envolvidos na alcalinização intestinal de Diptera, principalmente em *L. longipalpis*, foram por nós descritos (NEPOMUCENO, 2019; SANTOS, 2010). Diante dessa ampla experiência, o direcionamento inicial do presente trabalho se deu a partir do momento em que, em ensaios anteriores, verificamos que fêmeas de *L. longipalpis* pareciam alcalinizar seu intestino quando alimentadas com qualquer molécula de origem proteica (SANTOS, 2010), mesmo sendo uma proteína que jamais esses insetos encontrariam na natureza. Uma vez que, no lúmen intestinal de insetos não alimentados com sangue, existe uma baixa atividade proteolítica (basicamente de tripsina) (TELLERIA et al., 2007), inicialmente hipotetizamos que o estímulo primário que promovia a alcalinização seria o reconhecimento de peptídeos gerados a partir destas proteínas. Peptídeos gerados por tripsina têm sempre, na sua extremidade carboxila, um resíduo de arginina ou de lisina, e esta extremidade interagiria com algum receptor de peptídeos, iniciando então os eventos responsáveis pela alcalinização. Contudo, esta hipótese não se mostrou verdadeira (dados não apresentados).

Diante disso veio uma nova hipótese, onde acreditávamos que a concentração das proteínas ingeridas é que parecia ser importante para o processo de alcalinização intestinal, e não sua natureza. Surgiu então a ideia de que um choque osmótico produzido pela retirada de íons e água do lúmen intestinal seria o estímulo primário responsável pela alcalinização. Portanto, para iniciar os experimentos, escolhemos uma molécula não proteica, não tóxica e com peso molecular semelhante ao de proteínas pequenas, a molécula de PEG 8.000, que apresenta uma estrutura simples, com repetições de um mesmo motivo, para ser testada como agente promotor de alcalinização (seja por meio da hipótese osmótica ou qualquer outra advinda de sua natureza não proteica).

Vale destacar que, Santos, em 2010, em experimentos preliminares para determinação de potenciais estimuladores de alcalinização, mostrou que PEG, de uma maneira não esclarecida, era capaz de induzir o processo de alcalinização em insetos que viessem a ingerir

este composto. A hipótese inicial quando destes experimentos era a de que, provavelmente uma dilatação intestinal seria capaz de disparar os mecanismos de alcalinização e desligar aqueles relacionados com a acidificação. Como dito anteriormente, foi observada uma capacidade de alcalinização disparada pela alimentação com PEG, onde descartou-se a hipótese relacionando esse processo com a dilatação intestinal, uma vez que os intestinos dos insetos alimentados com PEG não apresentavam-se dilatados após a alimentação. Contudo, os experimentos pararam por aí e nada se esclareceu quanto aos estímulos intestinais provocados por PEG que levaram a uma alcalinização daqueles intestinos.

A fim de demonstrarmos de maneira sistemática e bem definida que a molécula sintética PEG 8.000 tem algum efeito sobre o processo de alcalinização intestinal de *L. longipalpis*, realizamos ensaios de alimentação de fêmeas com essa molécula dissolvida em água destilada contendo sacarose 15% e o corante indicador de pH, Azul de Bromotimol na concentração de 0,1 % (conforme descrito nos **itens 4.3 e 4.4**).

Nossos resultados mostraram que a molécula PEG 8.000, na concentração de 10 mM, é eficiente em disparar os mecanismos de alcalinização intestinal, com todos os intestinos dissecados apresentando-se alcalinos ($\text{pH} > 6,0$) (**Figura 9**).

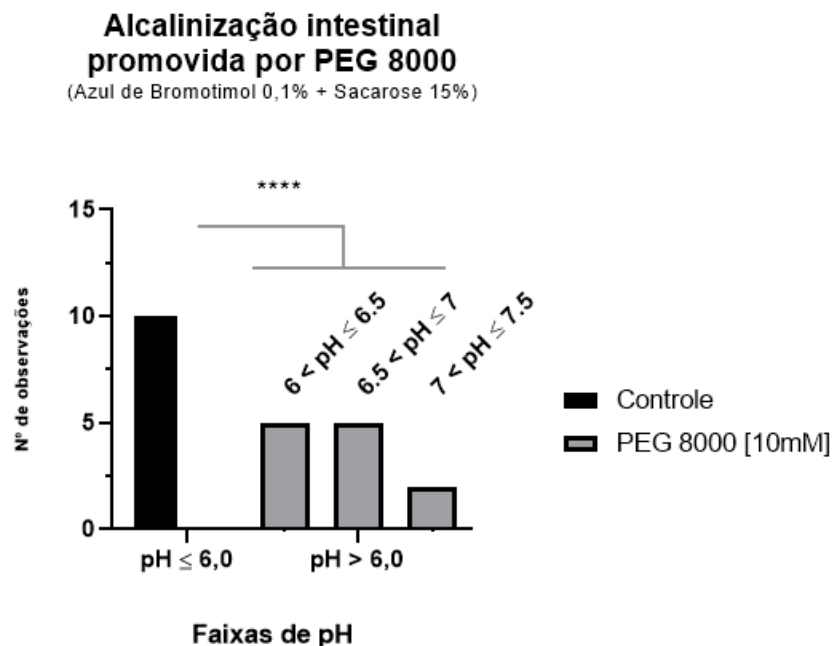


Figura 9 - Análise de proporção de alcalinização intestinal. Gráfico de análise da proporção de alcalinização intestinal entre fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1%, dissolvidos em água (**Controle**), e fêmeas alimentadas com sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10mM, dissolvidos em água (**PEG 8.000**). Dentro do grupo PEG 8.000, evidencia-se a subdivisão em categorias de pH de acordo com o grau de alcalinização, sendo elas: $6 < \text{pH} \leq 6,5$; $6,5 < \text{pH} \leq 7,0$; $7,0 < \text{pH} \leq 7,5$. O número de observações representa eventos individuais, onde cada observação equivale a um intestino dissecado para cada grupo. Destaque para a ausência de intestinos alcalinos ($\text{pH} > 6,0$) no grupo controle, e a ausência de intestinos ácidos ($\text{pH} \leq 6,0$) entre os insetos alimentados com PEG 8.000. Teste de proporção de Fisher. **** ($p < 0,0001$).

Diante disso, levantamos o questionamento sobre a concentração mínima de PEG 8.000 necessária para ativar os mecanismos de alcalinização intestinal, já que queríamos investigar melhor a hipótese do mecanismo osmótico de alcalinização. Para isso realizamos ensaios onde os insetos foram alimentados com diferentes concentrações de PEG 8.000.

5.2 Efeito da concentração de PEG 8.000 no processo de alcalinização de fêmeas de *L. longipalpis*

Conforme descrito no **item 4.4** da metodologia deste trabalho, as fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas com solução de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% contendo PEG 8.000 em diferentes concentrações (1 mM, 3 mM e 10 mM). Ressaltamos aqui que todos os reagentes especificamente deste experimento foram dissolvidos em água destilada.

Nossos resultados mostraram que, à medida em que aumentamos a concentração de PEG 8.000 na solução oferecida para as fêmeas de *L. longipalpis*, ocorre um aumento no número de intestinos capazes de disparar os mecanismos de alcalinização intestinal, de modo que, a alcalinização torna-se também mais eficiente em soluções com uma maior concentração de PEG 8.000. Nos insetos alimentados com solução de PEG 8.000 à 1 mM, somente dois insetos foram capazes de disparar o mecanismo de alcalinização (**Figura 10A**), enquanto que para solução de PEG 8.000 à 10 mM, somente três intestinos permaneceram na condição ácida (**Figura 10C**). Os valores de pH observados para a alimentação com a solução de PEG 8.000 à 3 mM foram intermediários aos observados para as outras alimentações (**Figura 10B**).

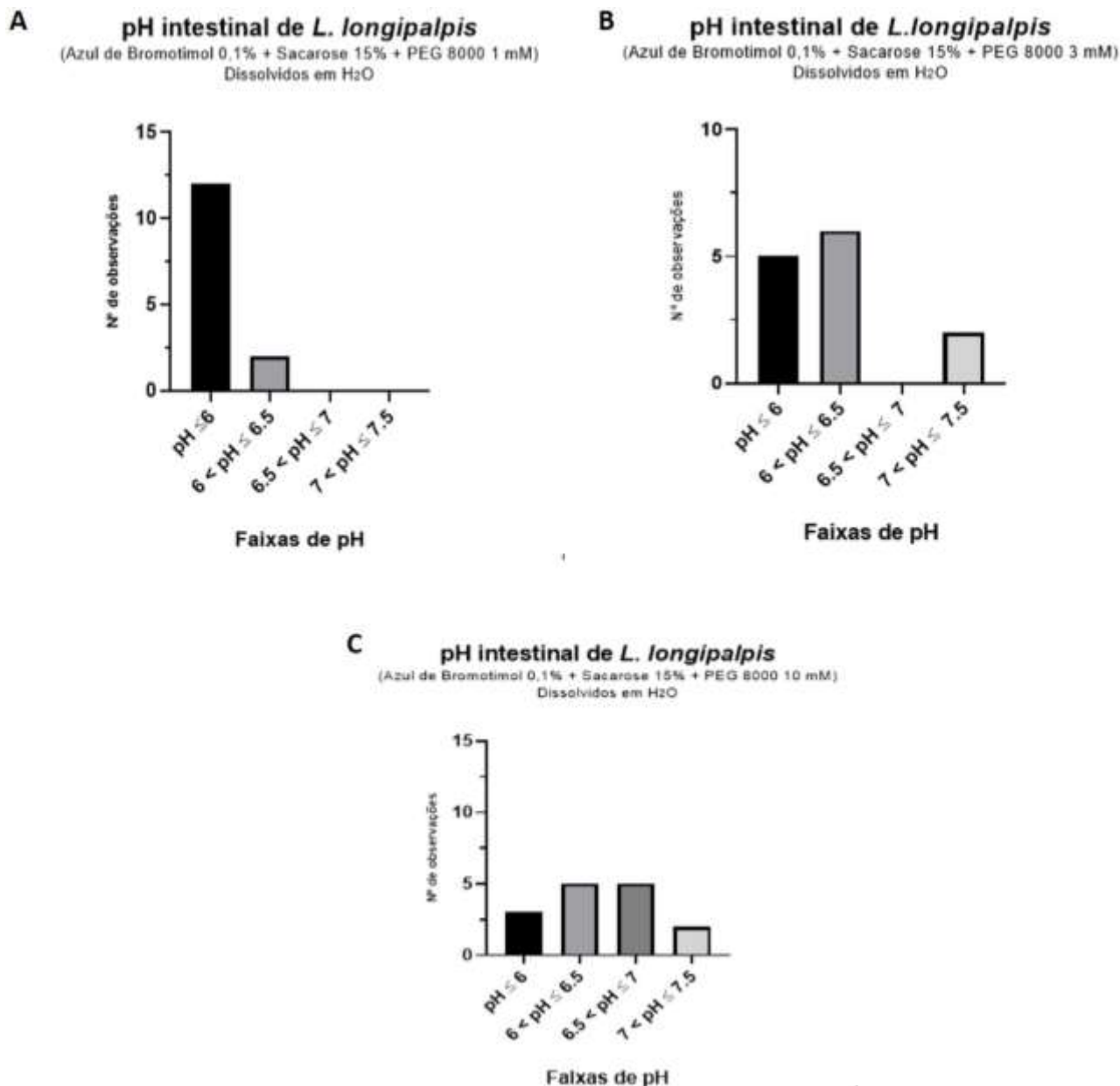


Figura 10 - Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução contendo PEG 8.000 em diferentes concentrações, em água. Gráficos de análise do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução de sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 em diferentes concentrações, todos dissolvidos em água destilada. Temos o número de observações, o que equivale ao número de intestinos dissecados e comparados com escala padrão para o corante indicador, bem como as faixas de pH onde cada uma das observações se encaixam. **A** – fêmeas alimentadas com solução de PEG 8.000 à 1 mM; **B** – fêmeas alimentadas com solução de PEG 8.000 à 3 mM; **C** – fêmeas alimentadas com solução de PEG 8.000 à 10 mM.

Esses resultados reforçaram nossa hipótese osmótica de alcalinização intestinal, onde ficou claro que, soluções mais concentradas de PEG 8.000 são mais eficientes em disparar os mecanismos de alcalinização.

Nos perguntamos então se sais presentes na solução a partir da qual as fêmeas se alimentam teriam alguma influência nos processos de alcalinização, esses sais poderiam ajudar no processo de alcalinização potencializando a saída de água no lúmen intestinal para os enterócitos na medida em que eles fossem transportados do lúmen para os enterócitos, de modo a ocorrer uma concentração ainda maior das moléculas presentes no lúmen intestinal, no caso, de PEG 8.000. Com isso realizamos alimentação das fêmeas com as mesmas soluções, nas mesmas concentrações anteriormente mostradas, porém dissolvendo os reagentes em solução IS.

5.3 Influência de sais no processo de alcalinização disparado por PEG 8.000

Conforme descrito no **item 4.4** da metodologia e no **item 5.2** dos resultados deste trabalho, as fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas com solução de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% contendo PEG 8.000 em diferentes concentrações (1 mM, 3 mM e 10 mM), porém dessa vez com todos os reagentes sendo dissolvidos em solução IS (composição

Nossos resultados confirmaram nossa hipótese inicial de que a presença de sais poderia potencializar a ação dos mecanismos de alcalinização disparados pela alimentação contendo PEG 8.000. De forma semelhante ao que mostramos no **item 5.2** dos resultados, soluções mais concentradas de PEG 8.000 são melhores em estimular os processos de alcalinização, insetos que comeram PEG 8.000 10 mM alcalinizam melhor do que aqueles que comeram PEG 8.000 3 mM, e estes por sua vez, alcalinizam melhor dos que comeram PEG 8.000 1 mM (**Figura 11**).

Quando comparamos os resultados obtidos para uma mesma concentração de PEG 8.000 (**Figuras 10 e 11**), porém considerando a presença ou não de sais, sempre nas soluções

contendo IS o número de intestinos que foram capazes de alcalinizar, tanto em número quanto em intensidade, foi maior (**Figuras 10 e 11**).

descrita no **item 4.3** da metodologia).

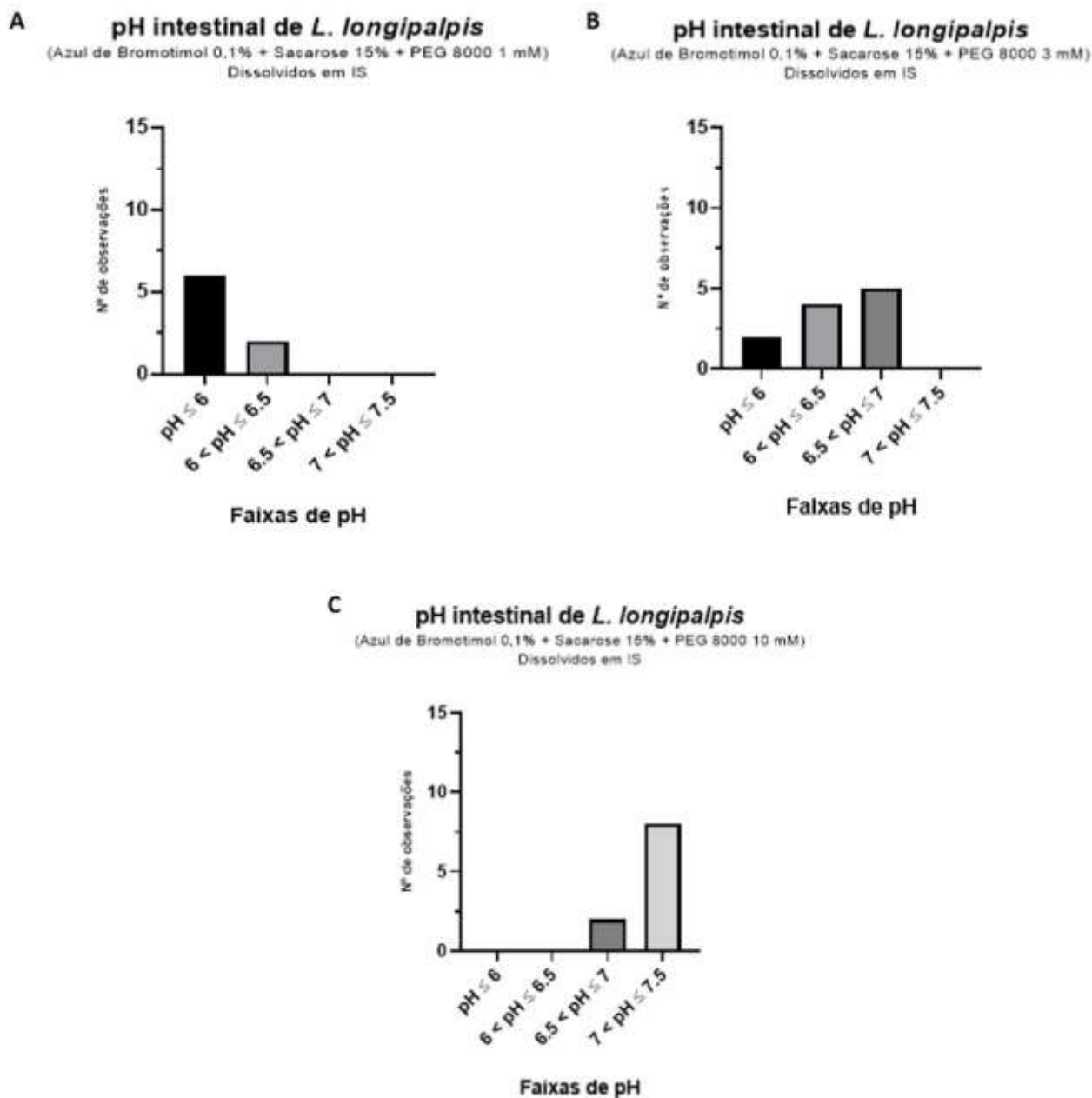


Figura 11 – Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução contendo PEG 8.000 em diferentes concentrações, em IS. Gráficos de análise do pH

intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução de sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 1 mM, todos dissolvidos em IS. Temos o número de observações, o que equivale ao número de intestinos dissecados e comparados com escala padrão para o corante indicador, bem como as faixas de pH onde cada uma das observações se encaixam. **A** – fêmeas alimentadas com solução de PEG 8.000 à 1 mM; **B** – fêmeas alimentadas com solução de PEG 8.000 à 3 mM; **C** – fêmeas alimentadas com solução de PEG 8.000 à 10 mM

Como descrito nos itens 4.3 e 4.4 da metodologia e nos itens 5.1 e 5.2 dos resultados deste trabalho, até então todas as alimentações oferecidas às fêmeas de *L. longipalpis* continham em comum a presença de dois solutos: Azul de Bromotimol 0,1% e Sacarose 15%. Como demonstrado anteriormente, nossos resultados confirmaram que variações na concentração de PEG 8.000 e na presença de sais na solução de alimentação, influenciavam o processo de alcalinização intestinal, de modo que soluções mais concentradas e com presença de sais, levavam a uma alcalinização mais eficiente. Diante disso nos perguntamos se a presença de outros solutos na solução a partir da qual os insetos se alimentavam, também teriam influência no processo de alcalinização intestinal. Levando em consideração que a presença do corante indicador de pH era essencial para obtenção dos resultados, realizamos ensaios onde retiramos a sacarose 15% da solução de alimentação das fêmeas de *L. longipalpis*, a fim de determinar a influência desse composto no processo de alcalinização.

5.4 Efeito da presença de sacarose 15% no processo de alcalinização de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução contendo PEG 8.000.

Conforme descrito no **item 4.4** da metodologia deste trabalho, as fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas com solução de Azul de Bromotimol 0,1% contendo PEG 8.000 na concentração de 10 mM, ambos dissolvidos em água. O processo de alimentação seguiu o padrão exposto nos **itens 4.3 e 4.4** da metodologia.

Nossos resultados mostraram que, a exemplo do que acontece com a presença de sais, a presença de sacarose 15% na solução de alimentação dos insetos, influencia positivamente o processo de alcalinização intestinal das fêmeas de *L. longipalpis*. Conforme mostrado na **figura**

12, a maior parte dos intestinos apresentaram valor de $\text{pH} \leq 6,5$, uma diferença clara no potencial de alcalinização desses intestinos quando comparados com os dados apresentados nas **figura 10 e 11**, onde os insetos foram alimentados com a solução de Azul de Bromotimol 0,1 % e PEG 8.000 a 10 mM contendo sacarose 15%.

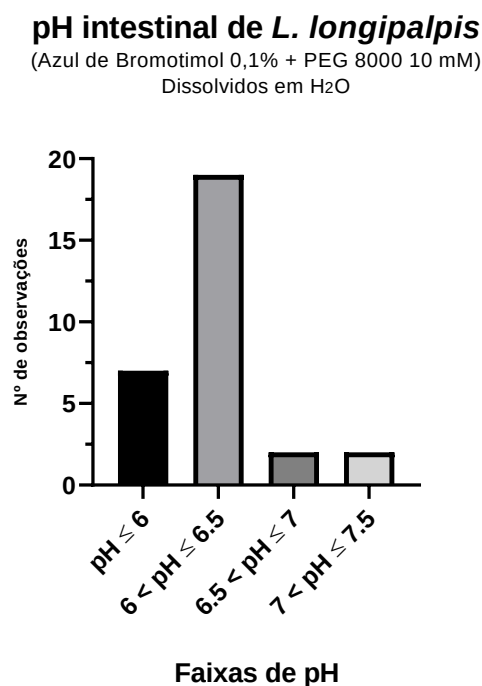


Figura 12 - Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução contendo PEG 8.000 à 10 mM na ausência de sacarose 15%. Gráfico de análise do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução de Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 10 mM, todos dissolvidos em água destilada. Temos o número de observações, o que equivale ao número de intestinos dissecados e comparados com escala padrão para o corante indicador, bem como as faixas de pH onde cada uma das observações se encaixam.

Realizados os experimentos onde mostramos que a concentração e a presença de sais e sacarose na solução tem grande influência sobre o poder de alcalinização de *L. longipalpis*,

resolvemos realizar mais experimentos que nos mostrassem que o gatilho de ativação de todo o processo de alcalinização tem relação direta com a concentração osmótica dentro no lúmen intestinal, e não com a origem da molécula a partir da qual o inseto se alimenta.

Como mostrado nos **itens 5.2, 5.3 e 5.4**, nossa hipótese, com base nos resultados ali apresentados, é a de que o gatilho que leva à alcalinização intestinal é um desbalanço osmótico que acontece entre o lúmen intestinal e citoplasma dos enterócitos, fenômeno que ocorre logo após a ingestão de sangue. Isto aconteceria a partir da eliminação de água do sangue ingerido e do transporte de íons para os enterócitos com consequente aumento da pressão osmótica do bolo alimentar.

Resolvemos então realizar uma série de alimentações com outras moléculas diferentes de PEG 8.000, mas que poderiam nos mostrar se, em uma dada concentração, a resposta de alcalinização sobre elas seria semelhante a que encontramos para PEG 8.000 na concentração de 10 mM (aquela que mais eficientemente ativa os mecanismos de alcalinização).

5.5 Efeito sobre o pH intestinal da alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com DEXTRAN

A primeira molécula que escolhemos para essa nova série de alimentações foi a molécula de Dextran, a qual foi oferecida aos insetos conforme descrito no **item 4.5** da metodologia deste trabalho. Fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentados com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + Dextran 10 mM, todos dissolvidos em solução IS. Assim como nas demais alimentações descritas neste trabalho, após o período de alimentação, os insetos foram dissecados, e a cor adquirida pelos intestinos médios foi comparada com a escala padrão para o corante indicador.

Nossos resultados mostraram que, assim como PEG 8.000 à 10 mM dissolvido em solução IS (**Figura 11**), a molécula de Dextran foi capaz de provocar a alcalinização intestinal em fêmeas de *L. longipalpis* (**Figuras 13**), contudo essa alcalinização se mostrou qualitativamente menos intensa, sendo que a maior parte das observações indicaram pH igual a 7,0.

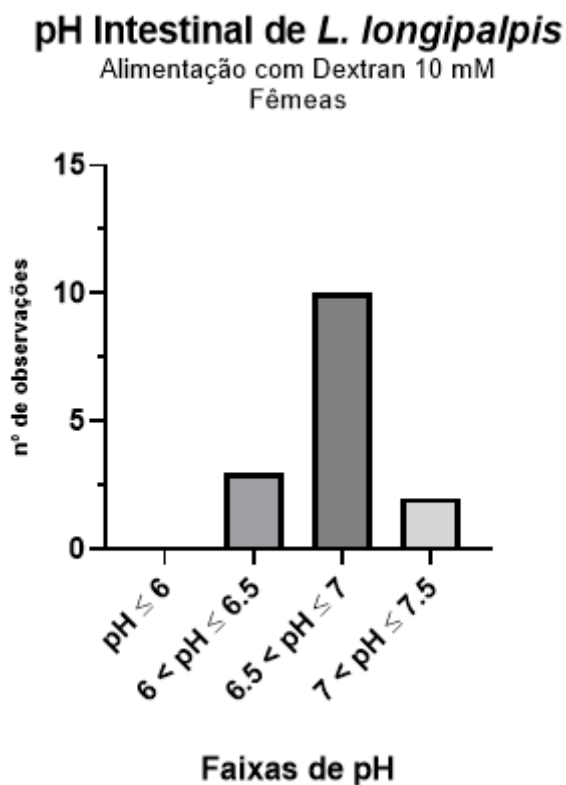


Figura 13 – Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução contendo Dextran 10.000 à 10 mM. Gráfico de análise do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução de sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, e Dextran 10000 10 mM, todos dissolvidos em IS, após 24 horas de alimentação. Temos o número de observações, que equivale ao número de intestinos dissecados e comparados com escala padrão para o corante indicador, bem como as faixas de pH onde cada uma das observações se encaixam.

Realizamos também a alimentação com outras moléculas que poderiam apresentar o mesmo potencial de promover a alcalinização intestinal que aquele apresentado por PEG 8.000 e Dextran, as moléculas escolhidas foram PEG 100.000 e Celobiose.

5.6 Efeito da alimentação com PEG 100.000 e Celobiose sobre o pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*

Conforme descrito no **item 4.5** da metodologia deste trabalho, as alimentações dos insetos, tanto para PEG 100.000, quanto para Celobiose, foram realizadas através de alimentador artificial (Hemotek®). Ambas as moléculas foram oferecidas aos insetos em solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1%, ambos dissolvidos em IS. A solução final de PEG 100.000 foi oferecida na concentração de 1 mM enquanto a de Celobiose foi oferecida na concentração de 10 mM. A utilização de PEG 100.000 à 1 mM se deu devido ao fato de que uma solução à 10 mM, apresenta-se altamente viscosa, o que tornaria difícil (ou quase inviável) a alimentação por parte dos insetos.

Nossos resultados mostraram que para a molécula de PEG 100.000 à 1 mM, a maior parte dos intestinos indicaram um valor de pH próximo de 6,5 (**Figura 14**), resultado este que se assemelha ao resultado encontrado na alimentação de *L. longipalpis* fêmeas com molécula de PEG 8.000 à 1 mM (**Figura 11**).

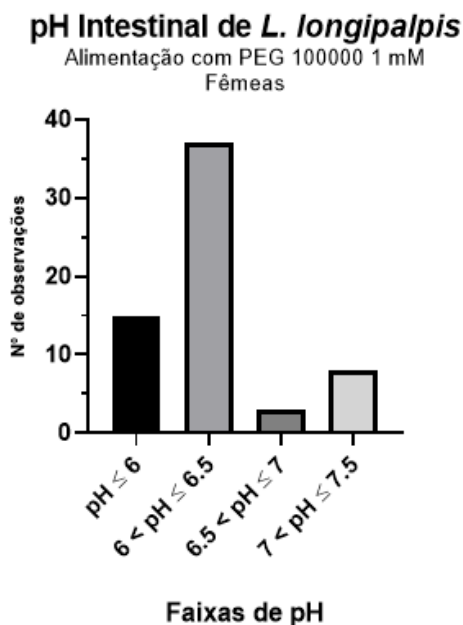


Figura 14 – Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução contendo PEG 100.000 à 1 mM. Gráfico de análise do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução de sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 100.000 1 mM, todos dissolvidos em IS após 24 horas de alimentação. Temos o número de observações, que equivale ao número de intestinos dissecados e comparados com escala padrão para o corante indicador, bem como as faixas de pH onde cada uma das observações se encaixam.

Isso reforça nossa hipótese inicial de que o gatilho para os mecanismos de alcalinização em *L. longipalpis* não é a natureza molecular do alimento ingerido, mas sim a concentração e o comportamento osmótico dessa molécula no tubo digestivo do inseto. Mesmo em uma alimentação com uma molécula maior, seu comportamento foi semelhante àquele de outra alimentação com uma molécula menor, porém na mesma concentração.

No caso da Celobiose, nossos resultados mostraram que a maior parte dos intestinos indicaram um pH próximo a 6,5 (**Figura 15**), o que difere dos resultados obtidos para PEG 8.000 à 10 mM (**Figura 11**). Esse resultado pode ser explicado, pelo menos em parte, pela presença de β -glicosidases no intestino de *L. longipalpis* (FERREIRA et al., 2018), enzimas estas que seriam responsáveis pela quebra de Celobiose, alterando a concentração dessa

molécula no intestino do inseto, tornando seu potencial osmótico menor, o que por sua vez resultaria numa baixa estimulação para a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal.

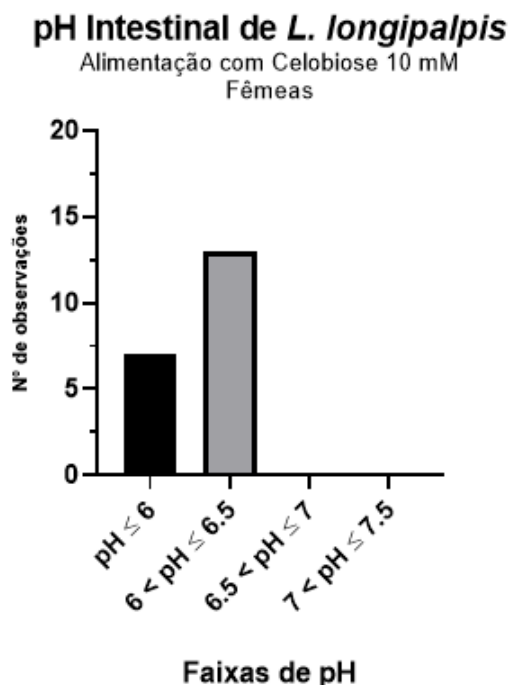


Figura 15 – Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução contendo Celobiose à 10 mM. Gráfico de análise do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução de sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e Celobiose 10 mM, todos dissolvidos em IS após 24 horas de alimentação. Temos o número de observações, que equivale ao número de intestinos dissecados e comparados com escala padrão para o corante indicador, bem como as faixas de pH onde cada uma das observações se encaixam.

Com esses ensaios reforçamos nossa hipótese de que, independentemente da origem molecular da fonte de alimentos, os mecanismos de alcalinização intestinal são disparados pela concentração osmótica dentro do intestino médio de *L. longipalpis*.

A fim de reforçarmos as evidências até então encontradas, as quais confirmaram nossa hipótese inicial da concentração osmótica do alimentado no tubo digestivo do inseto, realizamos

ensaios onde submetemos os intestinos a choques osmóticos externos, ou seja, choques osmóticos através das superfícies basolaterais dos enterócitos por meio de aplicação “*ex vivo*” de soluções hiperosmóticas.

5.7 Análise da capacidade de alcalinização intestinal de choques osmóticos aplicados à superfície basolateral de intestinos médios de fêmeas de *L. longipalpis*

Conforme descrito no **item 4.6** da metodologia deste trabalho, para testarmos se choques osmóticos seriam capazes de disparar os mecanismos de alcalinização intestinal no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*, soluções hiperosmóticas de sacarose (2,5 M) e PEG 8.000 (100 mM) foram preparadas e aplicadas sobre intestinos dissecados de fêmeas que haviam previamente se alimentado de solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% dissolvidos em solução IS e que apresentavam pH intestinal ácido ($\text{pH} \leq 6,0$). Testamos também a aplicação de PEG 8.000 em pó sobre os intestinos.

Nossos resultados mostraram que nenhum dos estímulos hiperosmóticos aplicados pelo lado de fora dos intestinos foi capaz de disparar os mecanismos de alcalinização intestinal. Em todos os três experimentos realizados (Sacarose 2,5 M; PEG 8.000 100 mM; PEG 8.000 em pó), nenhum dos intestinos observados apresentou qualquer sinal de alcalinização (**Tabela 1**).

Muito provavelmente a ausência de respostas observadas nesses estímulos pode estar relacionada com o fato de que os testes foram realizados com intestinos fechados, portanto através da superfície basolateral dos enterócitos e células endócrinas intestinais. Os mecanismos de alcalinização intestinal podem depender do transporte de íons e de água do lúmen para os enterócitos. É pertinente ressaltar que a ingestão de íons sem algo que promova um choque osmótico dentro do lúmen não leva a alcalinização. Mesmo nos experimentos feitos com água destilada haviam certamente alguns íons presentes dentro dos intestinos utilizados nos experimentos. Nestes casos o efeito alcalinizante foi menor porque haviam menos íons presentes junto com PEG dentro do lúmen (**Figura 10**).

Tabela 1 - Resposta de alcalinização intestinal frente à estímulos hiperosmóticos aplicados pela região basolateral do intestino médio

Tratamento	Controle		pH após aplicação		Valor de p
	pH $\leq$ 6.0	pH $>$ 6.0	pH $\leq$ 6.0	pH $>$ 6.0	
Sacarose 2,5 M	10	0	10	0	p > 0,9999
PEG 8.000 100 mM	10	0	10	0	p > 0,9999
PEG 8.000 em pó	28	0	28	0	p > 0,9999

Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após aplicação de estímulo hiperosmótico pela região basolateral do intestino médio. Tabela de proporção onde observa-se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a aplicação de estímulos hiperosmóticos, a saber: Sacarose 2,5 M; PEG 8.000 100 mM; e PEG 8.000 em pó. Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH $>$ 6,0. Os intestinos foram observados por 10 minutos após a aplicação do tratamento. Teste de proporção de Fisher.

Levando em consideração nossa hipótese de que o desbalanço osmótico entre lúmen intestinal e enterócitos é o gatilho de um dos mecanismos envolvidos no processo de alcalinização intestinal, é de se esperar que o transporte de água entre os dois ambientes desempenhe papel central no processo. A fim de testar essa hipótese, realizamos ensaios com fêmeas de *L. longipalpis* onde, juntamente com uma alimentação contendo PEG 8.000, foi oferecido um inibidor de aquaporinas.

5.8 Influência da alimentação com Bumetanide sobre o pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*

Conforme descrito no **item 4.12** da metodologia deste trabalho, realizamos alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 a 10 mM, todos dissolvidos em IS, acrescentando a essa alimentação o inibidor

de aquaporinas Bumetanide (BMT), na concentração de 0,1 mM. Após a alimentação, os insetos foram dissecados, e a coloração adquirida pelo intestino comparada com escala padrão para o corante indicador. Como grupo controle para este experimento, foram utilizados os valores de pH obtidos a partir da observação de intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* que se alimentam da mesma solução anteriormente descrita, contudo sem o composto BMT.

Nossos resultados mostraram que o bloqueio das aquaporinas através da ação de BTM 0,1 mM foi capaz de prejudicar o processo de alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* (**Figura 16**). A inibição do transporte de água do lúmen intestinal para os enterócitos, provavelmente prejudicou a concentração do bolo alimentar do inseto contendo PEG 8.000. A ausência de um desbalanço osmótico mais acentuado, por sua vez, faz com que o processo de alcalinização intestinal não atinja sua máxima eficiência.

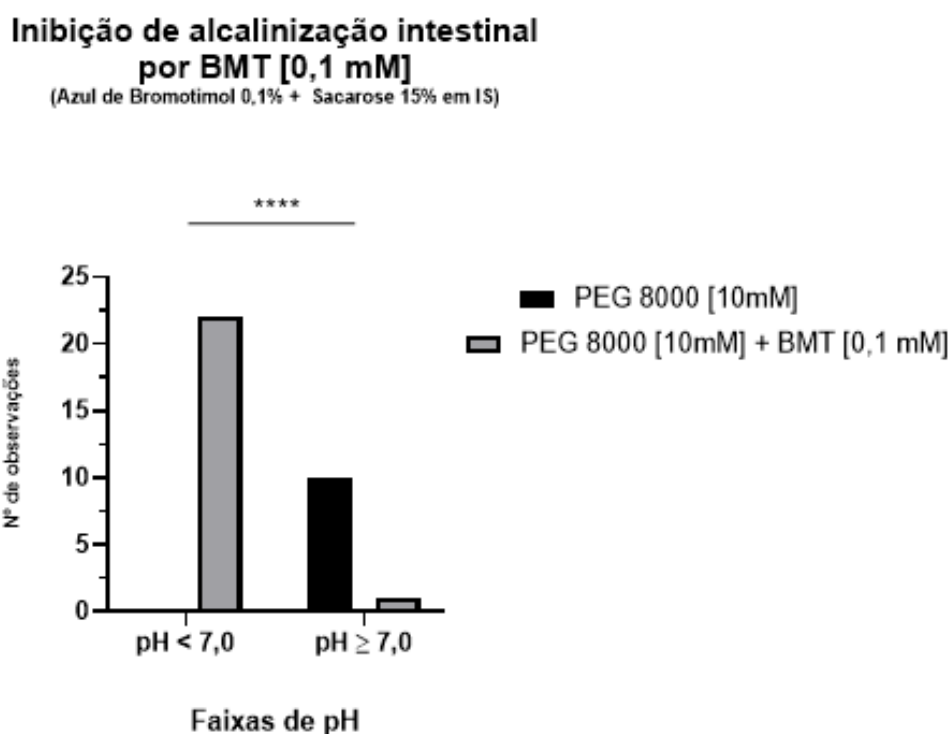


Figura 16 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após alimentação com Bumetanide (BMT). Gráfico de proporção onde observa-se a alteração do

pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*. Em preto temos o grupo controle, onde os insetos foram alimentados somente com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 [10 mM]; em cinza temos as observações dos intestinos dos insetos que se alimentam de solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 [10 mM] + Bumetanide [0,1 mM]. Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. **** - Teste de Fisher onde $p < 0,9999$.

Um dos processos de alcalinização descritos por nosso grupo é aquele envolvendo a liberação de uma ou mais moléculas na hemolinfa de fêmeas recém alimentadas com sangue. Essas moléculas, quando em contato com superfície basolateral de intestinos ácidos, acaba por disparar o processo de alcalinização intestinal. Como PEG 8.000 provocou uma alcalinização eficiente no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*, decidimos verificar se a hemolinfa dessas fêmeas alimentadas com PEG 8.000 na concentração de 10 mM (aquela com maior eficiência no processo de alcalinização) apresentaria efeito alcalinizante semelhante ao encontrado para a hemolinfa das fêmeas alimentadas com sangue.

5.9 Análise da capacidade de alcalinização da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com PEG 8.000

Conforme descrito no **item 4.7** da metodologia deste trabalho, primeiramente separamos fêmeas de *L. longipalpis*, as quais foram alimentadas com solução contendo Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 10 mM, todos dissolvidos em solução IS. A hemolinfa dessas fêmeas, após alimentação com a solução anteriormente descrita, foi retirada e aplicada sobre o intestino de outras fêmeas que haviam se alimentado somente com solução de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1%. Estes intestinos apresentavam-se com coloração amarela, indicando um pH ácido. Após aplicação os intestinos foram observados por 10 minutos, e as alterações de cores foram comparadas com escala padrão para o corante indicador.

Nossos resultados mostraram que a hemolinfa das fêmeas alimentadas com solução contendo PEG 8.000 à 10 mM não apresenta capacidade de disparar os mecanismos de

alcalinização, dos oito intestinos observados após aplicação da hemolinfa, somente um apresentou sinais de alcalinização (**Figura 17**).

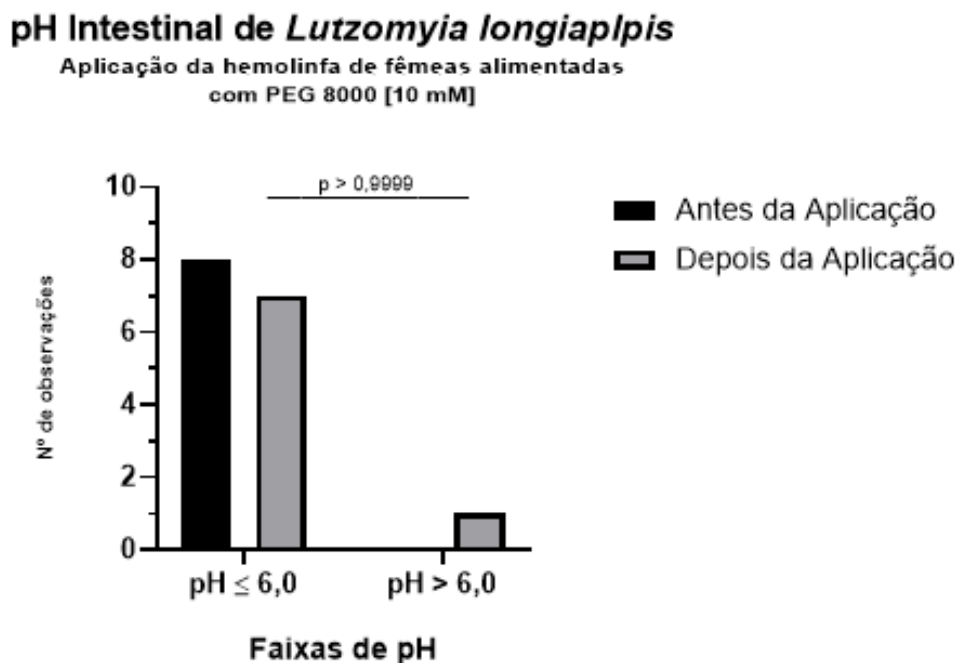


Figura 17 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após aplicação de hemolinfa. Gráfico de proporção onde observa-se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a aplicação de hemolinfa de fêmeas alimentadas com solução contendo PEG 8.000 à 10 mM. Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. Os intestinos foram observados por 10 minutos após a aplicação da hemolinfa. Teste de Fisher onde $p > 0,9999$.

Isso nos levou a pensar que, provavelmente, os mecanismos de alcalinização ativados por PEG 8.000 podem não compartilhar das fases iniciais do processo de alcalinização daqueles mecanismos ativados a partir da liberação de moléculas alcalinizadoras na hemolinfa dos insetos que se alimentaram de sangue.

Nossos resultados até aqui mostram que a ativação da alcalinização observada para PEG 8.000 e as outras moléculas sintéticas testadas, passa por um mecanismo de balanço osmótico,

que deve estar presente também durante o processo de alcalinização de insetos que comeram sangue, só que estes últimos podem potencializar o mecanismo através da ação de moléculas estimuladoras liberadas em sua hemolinfa. De alguma maneira ainda não esclarecida, a alimentação com sangue induz a secreção por parte das células endócrinas intestinais de moléculas alcalinizadoras, provavelmente hormônios, os quais não são liberados durante a alimentação com PEG 8.000.

Diante dos resultados anteriores resolvemos testar também a capacidade que estímulos mecânicos tem de disparar algum dos mecanismos envolvidos com a alcalinização intestinal em fêmeas de *L. longipalpis*. Testamos uma distensão direta por estiramento dos intestinos e uma distensão provocada pela ingestão de microesferas de látex.

5.10 A influência da distensão mecânica do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* no processo de alcalinização intestinal

Como descrito no **item 4.6** da metodologia deste trabalho, a fim de verificar se estímulos mecânicos, principalmente aqueles relacionados com a distensão do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* seriam capazes de disparar os mecanismos de alcalinização intestinal, realizamos dois ensaios: o primeiro com intestino médio de fêmeas alimentadas com solução de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% dissolvidos em solução IS, onde as extremidades dos intestinos foram puxadas com estiletes provocando o estiramento de todo o intestino (onde a hipótese era que o estiramento poderia ser um dos estímulos capazes de disparar a alcalinização do lúmen intestinal); e um segundo ensaio, onde fêmeas foram alimentadas com solução contendo, além de Sacarose 15% e Azul de Bromotimol 0,1% dissolvidos em solução IS, microesferas de látex, as quais são inertes em termos osmóticos, mas causariam um aumento do volume intestinal, e consequentemente, sua distensão mecânica.

Nossos resultados mostraram que nem o estímulo mecânico por estiramento (realizado através de pequenos puxões nas extremidades dos intestinos) (**Figura 18**) nem aquele realizado através da alimentação com microesferas de látex (**Figura 19**) foram capazes de disparar os mecanismos de alcalinização intestinal.

pH Intestinal de *L. longipalpis*
Fêmeas alimentadas com Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1%

Estímulo por estiramento mecânico

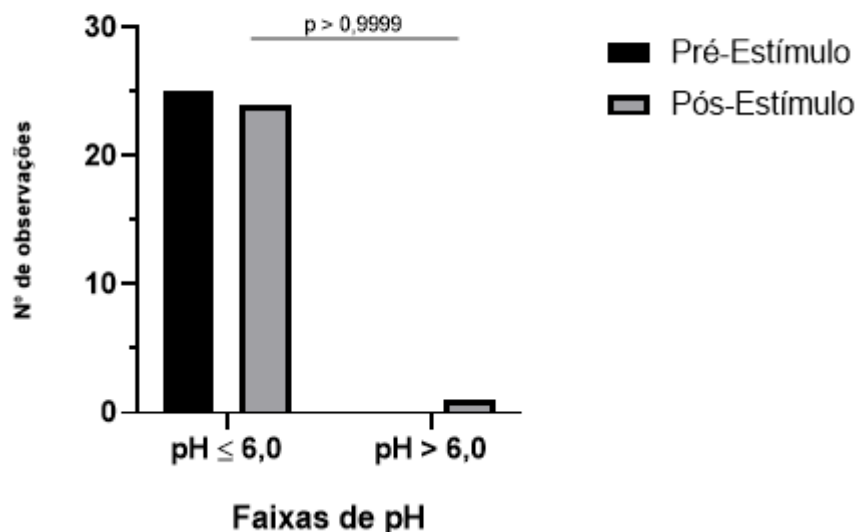


Figura 18 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após aplicação de estímulo mecânico por estiramento. Gráfico de proporção onde observa-se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a aplicação de estímulo mecânico por estiramento sobre o intestino através de pequenos puxões, os quais foram realizados com auxílio de estiletes. Como grupo controle temos o pH indicado pelo intestino de fêmeas alimentadas com solução de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol (Pré-Estímulo), como grupo teste temos os mesmos intestinos após estímulo de estiramento com período de observação de 10 minutos. Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. Teste de Fisher onde $p > 0,9999$.

pH Intestinal de *L. longipalpis*

Efeito da dilatação provocada pela ingestão de microesferas de látex

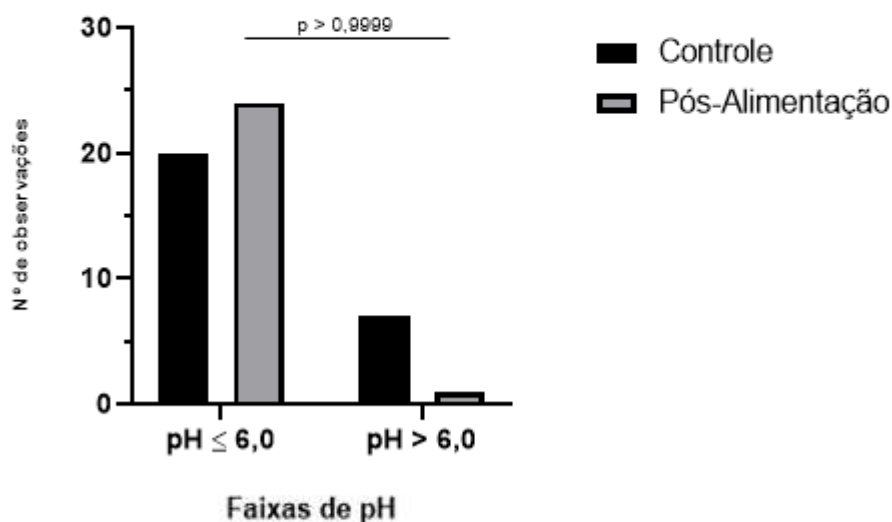


Figura 19 – Análise do efeito da dilatação provocada pela ingestão de microesferas de látex por fêmeas de *L. longipalpis*. Gráfico de proporção onde observa-se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a ingestão de microesferas de látex por meio de alimentação. Como grupo controle temos o pH indicado pelo intestino de fêmeas alimentadas com solução de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol, dissolvidos em solução IS (Controle), como grupo teste intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* após alimentação com solução de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% em solução IS contendo “beads” de látex, os intestinos foram dissecados e a cor adquirida por eles comparada com escala padrão para o corante indicador. Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. Teste de Fisher onde p > 0,9999.

Esses resultados reforçaram ainda mais nossa hipótese de que, muito provavelmente, o grande sinal para a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal estão relacionados com uma diferença osmótica entre o citoplasma das células intestinais e o lúmen intestinal.

No caso, a ausência de resposta entre as fêmeas alimentadas com as microesferas de látex se deve ao fato dessas partículas serem osmoticamente inertes, portanto, não provocando a ativação dos mecanismos.

Apesar de demonstrada em trabalhos anteriores do nosso grupo a ação alcalinizadora da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* recém alimentadas com sangue, até então não havíamos conseguido esclarecer de forma definitiva a natureza ou identidade da molécula liberada na hemolinfa que é responsável por disparar parte dos mecanismos de alcalinização, porém acreditamos que esta molécula, que apresenta uma função hormonal, não atue de maneira individual.

Acreditamos que sua ação estaria atrelada a presença de outros componentes, os quais em conjunto disparariam os mecanismos de alcalinização intestinal. Um dos prováveis componentes que poderiam atuar em conjunto com a molécula alcalinizadora seriam os aminoácidos presentes na hemolinfa dos insetos.

Sabemos que a concentração de aminoácidos livres na hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* que se alimentaram de sangue cresce progressivamente a medida em que ocorre a digestão; além disso, como evidenciado anteriormente no corpo deste texto e no **item 1.2** da introdução, a hemolinfa retirada de fêmeas que acabaram de se alimentar de sangue apresenta potencial de alcalinização, ou seja, tem em sua composição todos os conjuntos de fatores necessários a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal.

Diante disso resolvemos dosar a quantidade de aminoácidos livres na hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* em três situações: fêmeas alimentadas somente com sacarose 15%; fêmeas alimentadas com sangue, com período pós-alimentação de 2 horas; e por fim, fêmeas alimentadas com sangue com período pós-alimentação de 30 horas. Vale ressaltar que a escolha em dosar a concentração de aminoácidos livres se deu por ser um dos prováveis componentes potencializadores da molécula alcalinizadora mais fáceis de serem testados, além disso, como a hemolinfa de fêmeas não alimentadas com sangue não apresentam o potencial alcalinizador, quando comparada com a hemolinfa de fêmeas que acabaram de se alimentar de sangue (onde a concentração de aminoácidos livres na hemolinfa é crescente), os aminoácidos seriam a escolha mais acertada.

5.11 Determinação da concentração relativa de aminoácidos da hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas e não alimentadas com sangue

Assim como descrito no **item 4.8** da metodologia deste trabalho, realizamos dosagem de aminoácidos livres na hemolinfa recuperada de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sacarose 15%, e com períodos pós-alimentação com sangue de 2 e 30 horas. Ressaltamos aqui que a concentração de aminoácidos medida não é propriamente a concentração de aminoácidos da hemolinfa dos insetos, mas a concentração de aminoácidos da hemolinfa recuperada em solução de IS, dado que, como evidenciado na metodologia, os insetos são abertos em uma pequena gota de volume conhecido daquela solução.

Foi utilizada a hemolinfa extraída de 5 insetos, sendo os resultados normalizados para o equivalente a hemolinfa de uma única fêmea. Para todos os grupos foram realizadas cinco réplicas.

Nossos resultados mostraram que não existe diferença estatística na concentração de aminoácidos livres na hemolinfa recuperada entre os insetos alimentados com sacarose 15% e insetos com 2 horas pós-alimentação com sangue (**Figura 20**). Contudo a concentração de aminoácidos na hemolinfa dos insetos 30 horas pós-alimentação com sangue é significativamente maior quando comparada a concentração dos outros dois grupos (**Figura 20**).

Concentração de AA's na hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis*

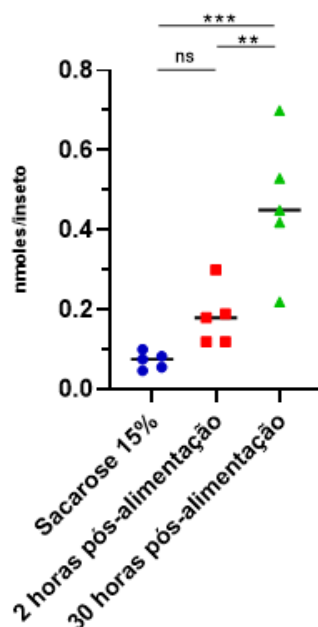


Figura 20 – Análise da concentração de aminoácidos livres na hemolinfa recuperada de fêmeas de *L. longipalpis*. Gráfico de dispersão de pontos onde observa-se a concentração de aminoácidos livres na hemolinfa recuperada de fêmeas de *L. longipalpis* sob três condições: alimentadas com sacarose 15% (em azul); alimentadas com sangue, sendo o período pós-alimentação de 2 horas (em vermelho); e alimentadas com sangue, com período pós-alimentação de 30 horas (em verde). Para cada um dos grupos foram realizadas cinco réplicas experimentais, sendo os valores obtidos a partir da coleta de hemolinfa de um “pool” de 5 insetos. Os valores apresentados no gráfico foram normalizados para valores equivalentes a hemolinfa de um único inseto. Teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov com valores de $p > 0.1$. Teste estatístico One-Way ANOVA com teste Tukey de múltiplas comparações. ns – não significativo $p = 0.2931$; *** - $p = 0.0003$; ** - $p = 0.0042$.

Vale destacar aqui que os aminoácidos livres provenientes da digestão dos insetos tem papel central no processo de ativação da via TOR (**item 1.4** da introdução). A ativação dessa via durante o processo de digestão poderia então funcionar como uma ferramenta de manutenção de um estado fisiológico que favorecesse a digestão, no caso, um pH intestinal

alcalino. Com o fim da digestão e uma queda na concentração de aminoácidos livres na hemolinfa dos insetos, o intestino voltaria ao seu estado natural, desligando os mecanismos de alcalinização intestinal e ativando àqueles relacionados com a manutenção de um pH ácido.

Levando em consideração que a molécula que dispara os mecanismos de alcalinização retirada da hemolinfa de fêmeas recém alimentadas com sangue é obtida de insetos com no máximo 2 horas pós-alimentação, com nossos resultados, fica claro que não podemos atribuir aos aminoácidos livres essa função, pelo menos não a estes aminoácidos sozinhos. Provavelmente eles participam em outros processos, atuando de forma conjunta com outras moléculas, dado que sua concentração é crescente na hemolinfa ao longo do tempo.

Obtivemos outros resultados (não apresentados neste trabalho), onde, por meio de metodologia específica para obtenção de peptídeos intestinais, conseguimos observar que, os peptídeos obtidos a partir de intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas somente com sacarose 15%, tem potencial alcalinizador semelhante àquele encontrado para a hemolinfa das fêmeas recém alimentadas com sangue. Esse resultado reforça nossa hipótese de que os aminoácidos provenientes de uma alimentação com sangue sozinhos não poderiam ser acusados de ser a molécula alcalinizante por nós observada.

Ainda pensando na origem da molécula alcalinizante liberada da hemolinfa de fêmeas recém alimentadas com sangue, resolvemos estimular intestinos com um ionóforo de cálcio, o qual poderia estimular as células intestinais a liberar vesículas contendo tal molécula uma vez que a sinalização por cálcio costuma estar associada a degranulação de vesículas de secreção. O líquido sobrenadante obtido foi então testado sobre intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* previamente alimentados com Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1%, apresentando pH intestinal ácido.

5.12 Influência do influxo de Ca^{+2} na liberação de moléculas alcalinizantes presentes no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*

Conforme descrito no **item 4.14** da metodologia deste trabalho, este ensaio foi realizado a partir da obtenção do sobrenadante de intestinos estimulados com o ionóforo de cálcio A23187 na concentração final de 10 μM . O sobrenadante recuperado foi aplicado sobre

intestinos médios de fêmeas de *L. longipalpis* que haviam se alimentado de solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% dissolvidos em solução IS (foi aplicado 1 μ L de sobrenadante sobre cada intestino). Foram utilizados para o experimento somente aqueles intestinos que apresentavam-se com $\text{pH} \leq 6,0$.

Após aplicação do líquido sobrenadante, os intestinos foram observados por no máximo 10 minutos e qualquer alteração de cor sofrida por eles foi comparada com escala padrão para o corante indicador. Além disso realizamos dois experimentos controle para esse ensaio. O primeiro controle consistia na aplicação de sobrenadante obtido em tubo contendo intestinos que não foram estimulados com o ionóforo de cálcio. Da mesma maneira que no ensaio teste, o sobrenadante foi posteriormente aplicado sobre intestinos dissecados apresentando $\text{pH} \leq 6,0$. O segundo controle seguiu os mesmos passos do ensaio teste, porém, na solução onde os intestinos foram coletados, acrescentamos EDTA na concentração final de 2 mM, de modo que, apesar de o ionóforo estar presente, a ação quelante de EDTA sobre cálcio impediria a liberação de vesículas mediada por cálcio.

Nossos resultados mostraram que houve diferença significativa entre os valores de pH intestinal observados antes e após a aplicação do sobrenadante de intestinos estimulados com o ionóforo de cálcio (**Figura 21**). Nos grupos controle, tanto aquele sem ionóforo (**Figura 22**) como aquele onde utilizamos EDTA (**Figura 23**) como agente quelante de cálcio, nenhuma resposta de alcalinização foi observada.

pH intestinal de *L. longipalpis*

(Sobrenadante de intestinos estimulados com
A23187 10 μ M)

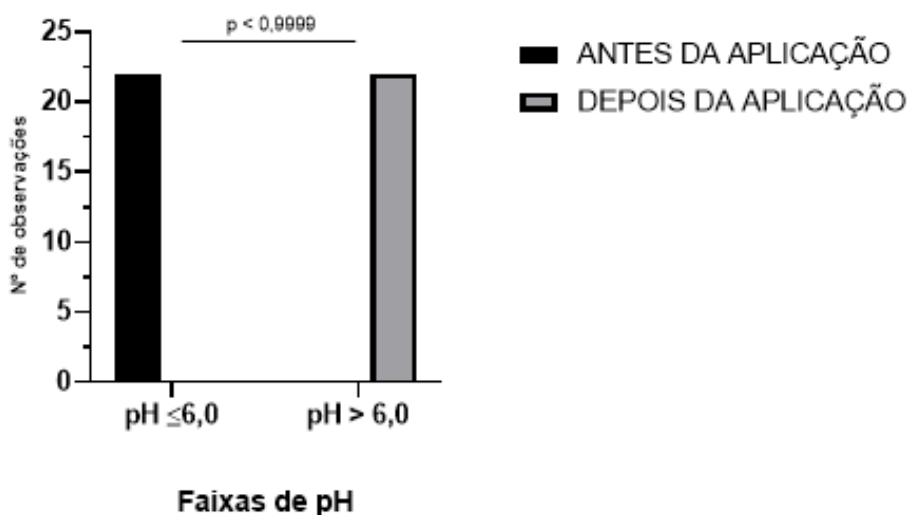


Figura 21 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após aplicação de sobrenadante de intestinos estimulados com A23187. Gráfico de proporção onde observa-se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a aplicação de sobrenadante de intestinos estimulados com o ionóforo de cálcio A23187 na concentração final de 10 μ M (foi aplicado 1 μ L de sobrenadante sobre cada intestino). Evidencia-se os valores de pH antes da aplicação (em preto) e após a aplicação do sobrenadante (em cinza). Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. Teste de Fisher onde $p < 0,9999$.

pH intestinal de *L. longipalpis*
(Sobrenadante de intestinos não estimulados com ionóforo)

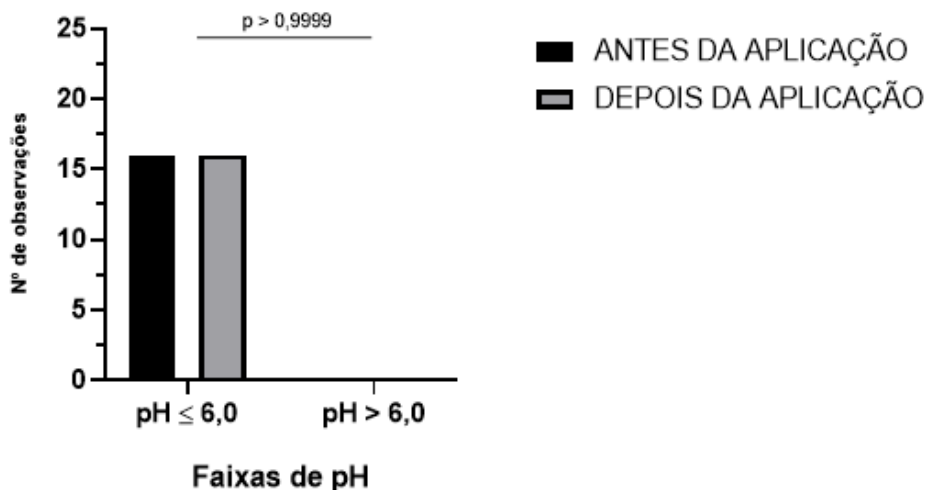


Figura 22 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após aplicação de sobrenadante de intestinos não estimulados com A23187. Gráfico de proporção onde observa-se ausência de alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a aplicação de sobrenadante de intestinos que não foram estimulados com o ionóforo de cálcio A23187 (ao volume final contendo os intestinos foi somado 1 µL de solução IS (foi aplicado 1 µL de sobrenadante sobre cada intestino). Evidencia-se os valores de pH antes da aplicação (em preto) e após a aplicação do sobrenadante (em cinza). Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. Teste de Fisher onde $p > 0,9999$.

pH intestinal de *L. longipalpis*

(Sobrenadante de intestinos estimulados com A23187 10 μ M na presença de EDTA 2 mM)

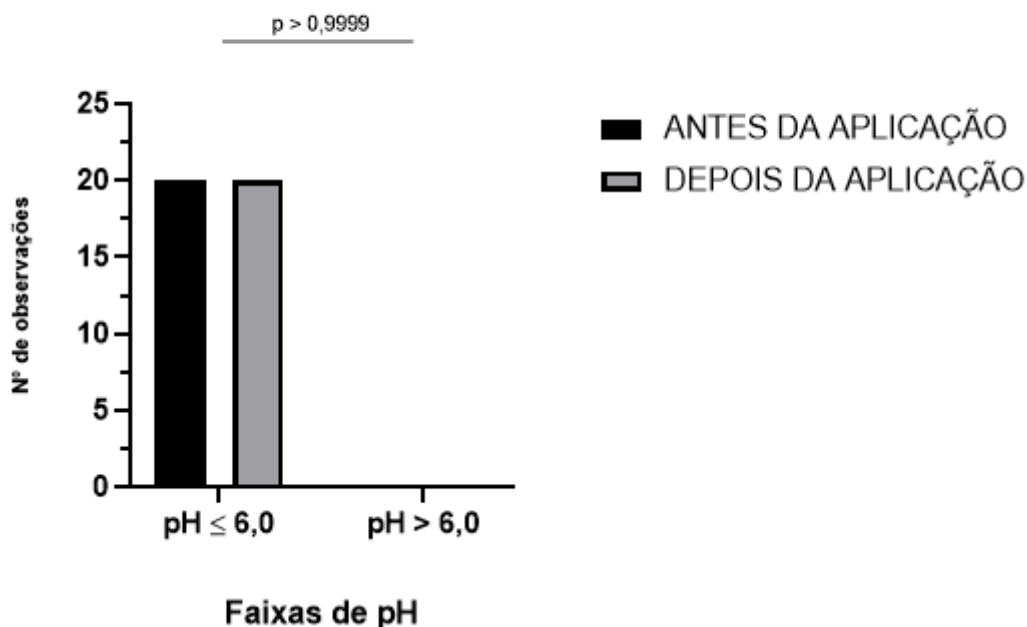


Figura 23 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após aplicação de sobrenadante de intestinos estimulados com A23187 na presença de EDTA 2 mM. Gráfico de proporção onde observa-se a ausência de alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a aplicação de sobrenadante de intestinos estimulados com o ionóforo de cálcio A23187 na concentração final de 10 μ M na presença de EDTA à 2 mM (foi aplicado 1 μ L de sobrenadante sobre cada intestino). Evidencia-se os valores de pH antes da aplicação (em preto) e após a aplicação do sobrenadante (em cinza). Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. Teste de Fisher onde p > 0,9999.

Esse resultado somado aos outros resultados obtidos nesse trabalho, nos levam a pensar que, os mecanismos de alcalinização intestinal atuam de forma conjunta, sendo o somatório de suas respostas o que leva a alcalinização intestinal ao seu ponto máximo.

O fato de que a molécula alcalinizadora liberada na hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* que se alimentaram de sangue, já estar presente no intestino médio daqueles insetos

antes mesmo de um repasto sanguíneo, reforçou nossa hipótese inicial de que provavelmente essa molécula teria uma função hormonal, sendo armazenada em vesículas intracelulares, aguardando um estímulo para ser secretada. Outro ponto que reforçou essa hipótese foi a evidência de que a entrada de cálcio nas células intestinais é o gatilho para liberação daquela molécula (**Figura 21**), uma característica típica de sinalização celular envolvida com a liberação de hormônios.

Dentre os hormônios descritos para insetos, alguns já são apontados como tendo relação com metabolismo digestivo, dentre eles os peptídeos semelhantes a insulina (ILPs) e a serotonina. Diante disso, resolvemos testar a ação dessas moléculas sobre o processo de alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*.

5.13 Efeito da aplicação de insulina bovina e serotonina no pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*

Conforme descrito no **item 4.10** da metodologia deste trabalho, a fim de verificar a resposta dos intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* à aplicação de insulina bovina sobre os mesmos, fêmeas de *L. longipalpis* foram alimentadas por 24 horas com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1%. Passado o período de alimentação, os insetos foram dissecados, sendo selecionados para o ensaio somente os intestinos que apresentaram $\text{pH} \leq 6,0$. Sobre esses intestinos realizamos a aplicação de solução de insulina bovina, sendo observada qualquer mudança na coloração dos intestinos, os quais foram comparados com escala padrão para o corante indicador (**Figura 8**).

Nossos resultados mostraram que, todos os intestinos observados apresentaram resposta de alcalinização intestinal após a aplicação sobre eles da solução contendo insulina bovina (**Figura 24**). Diferentemente do observado para os intestinos que foram destinados ao grupo controle, onde sobre os intestinos realizamos apenas a aplicação de solução IS (**Figura 25**).

pH intestinal de *L. longipalpis*

(Aplicação de insulina bovina 0,1 mM)

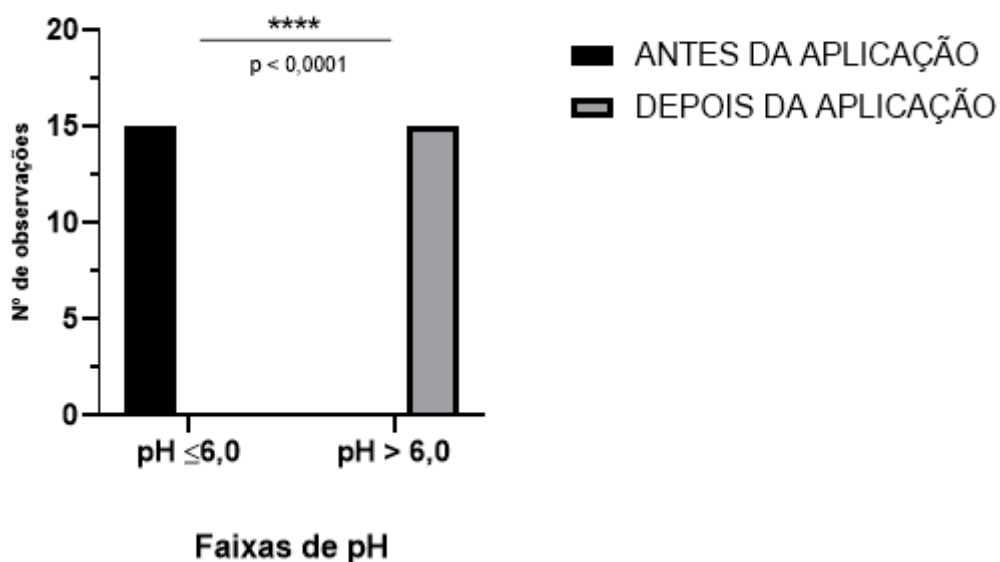


Figura 24 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após aplicação de insulina bovina. Gráfico de proporção onde observa-se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a aplicação de 20 µL de solução contendo insulina bovina na concentração de 0,1 mM. Evidencia-se os valores de pH antes da aplicação (em preto) e após a aplicação (em cinza). Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. Teste de Fisher onde p > 0,9999.

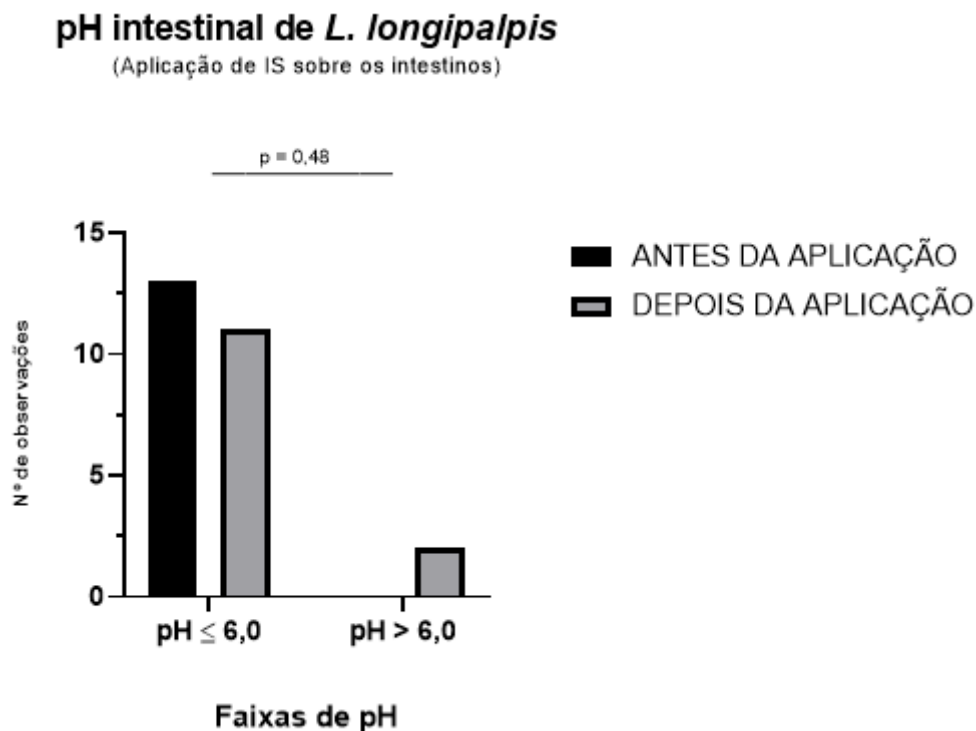


Figura 25 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após aplicação de solução IS. Gráfico de proporção onde observa-se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a aplicação de 20 µL de solução IS. Evidencia-se os valores de pH antes da aplicação (em preto) e após a aplicação (em cinza). Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. Teste de Fisher onde $p > 0,9999$.

De maneira semelhante ao encontrado para o grupo controle deste ensaio, a aplicação de solução contendo serotonina na concentração de 0,1 mM sobre os intestinos corados de fêmeas de *L. longipalpis*, não foi capaz de disparar o processo de alcalinização intestinal (**Figura 26**).

Em conjunto esses resultados reforçaram nossa hipótese inicial de que grande era a chance de que a molécula alcalinizadora liberada na hemolinfa de fêmeas de *L. longipalpis* recém alimentadas com sangue, e que já se encontrava no interior de vesículas das células intestinais de fêmeas antes da alimentação com sangue, era um ILP (*insulin-like peptide*).

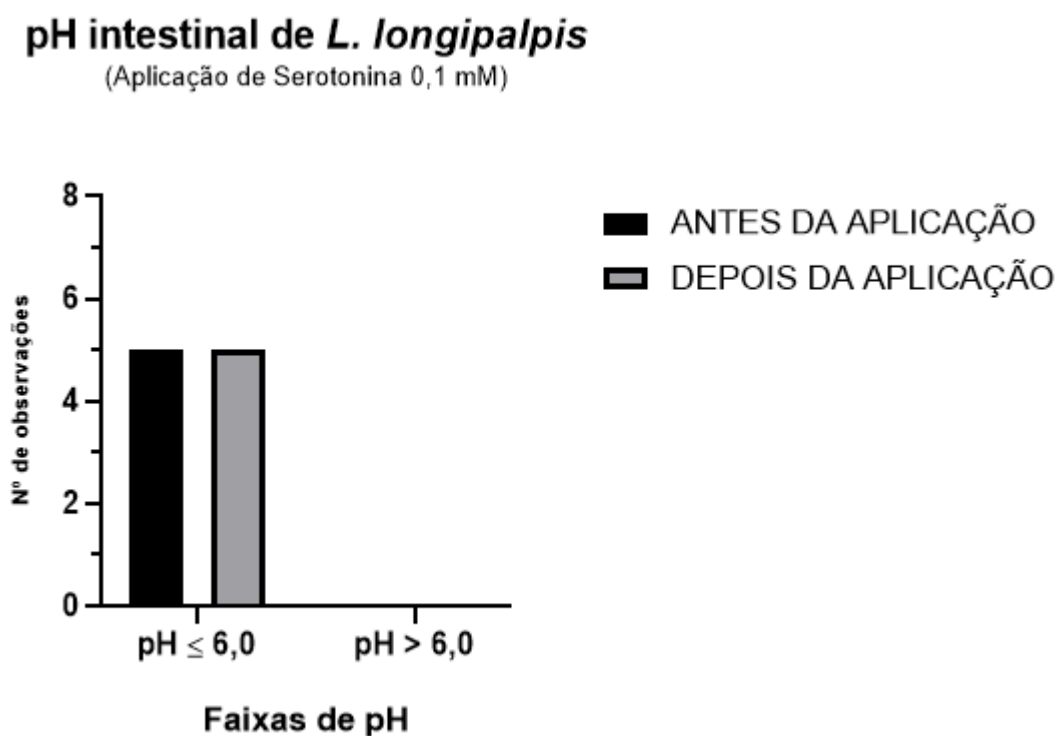


Figura 26 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* que sofreram alteração de pH após aplicação de solução contendo serotonina. Gráfico de proporção onde observa-se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após a aplicação de 20 µL de solução contendo serotonina na concentração de 0,1 mM. Evidencia-se os valores de pH antes da aplicação (em preto) e após a aplicação (em cinza). Foram considerados alcalinos os intestinos que apresentassem cor indicativa de pH > 6,0. Teste de Fisher onde $p > 0,9999$.

A molécula de insulina bovina utilizada no experimento anterior apresenta peso molecular de aproximadamente 5.700 Da, com essa informação em mãos decidimos realizar uma análise de espectrometria de massa do sobrenadante recuperado de intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* estimulados com ionóforo de cálcio.

5.14 A análise, por MALDI/TOF-MS, do sobrenadante de intestinos estimulados com ionóforo de cálcio

Conforme descrito nos itens **4.14 e 4.15** da metodologia deste trabalho, em ensaio semelhante ao descrito para o resultado de número **5.12**, recuperamos o sobrenadante de intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* que haviam sido estimulados com ionóforo de cálcio. Esse sobrenadante, quando aplicado sobre intestinos ácidos, fez com que estes disparassem o mecanismo de alcalinização intestinal (**Figura 21**), de maneira semelhante, a aplicação de insulina bovina sobre intestinos ácidos, também levou à alcalinização dos intestinos (**Figura 24**). Com esses resultados, resolvemos então, por meio de espectrometria de massa (MALDI/TOF-MS), verificar o perfil peptídico de amostras provenientes da estimulação de intestinos com ionóforo de cálcio. Como grupo controle para esse experimento, foi analisada a amostra proveniente de intestinos tratados somente com solução IS (**item 4.15**).

Em uma análise mais ampla, como a mostrada na **figura 27**, nossos resultados mostraram um perfil semelhante de peptídeos entre a amostra proveniente de intestinos estimulados com ionóforo de cálcio e a amostra proveniente de intestinos estimulados somente com solução IS, o que fica evidenciado pela detecção semelhante de peptídeos de mesmo valor m/z . Vale destacar que, em uma faixa de varredura de 0 a 8.000 unidade de m/z , para as duas amostras, as leituras indicam a presença de peptídeos com massa inferior a 6.000 m/z . Ainda analisando o espectro obtido em varredura mais ampla, é possível verificar a presença de um pico identificado somente na amostra proveniente de intestinos estimulados com ionóforo de cálcio (4.845,037 m/z).

Diante disso, em uma nova análise, agora concentrando as leituras em uma faixa m/z mais estreita (4.000 a 6.000 m/z), foi possível observar a presença de dois peptídeos encontrados somente na amostra proveniente de intestinos estimulados com ionóforo de cálcio. Os sinais desses peptídeos encontram-se destacados na **figura 28**, e apresentam valores de m/z de 4.845,037 e 4.998,605.

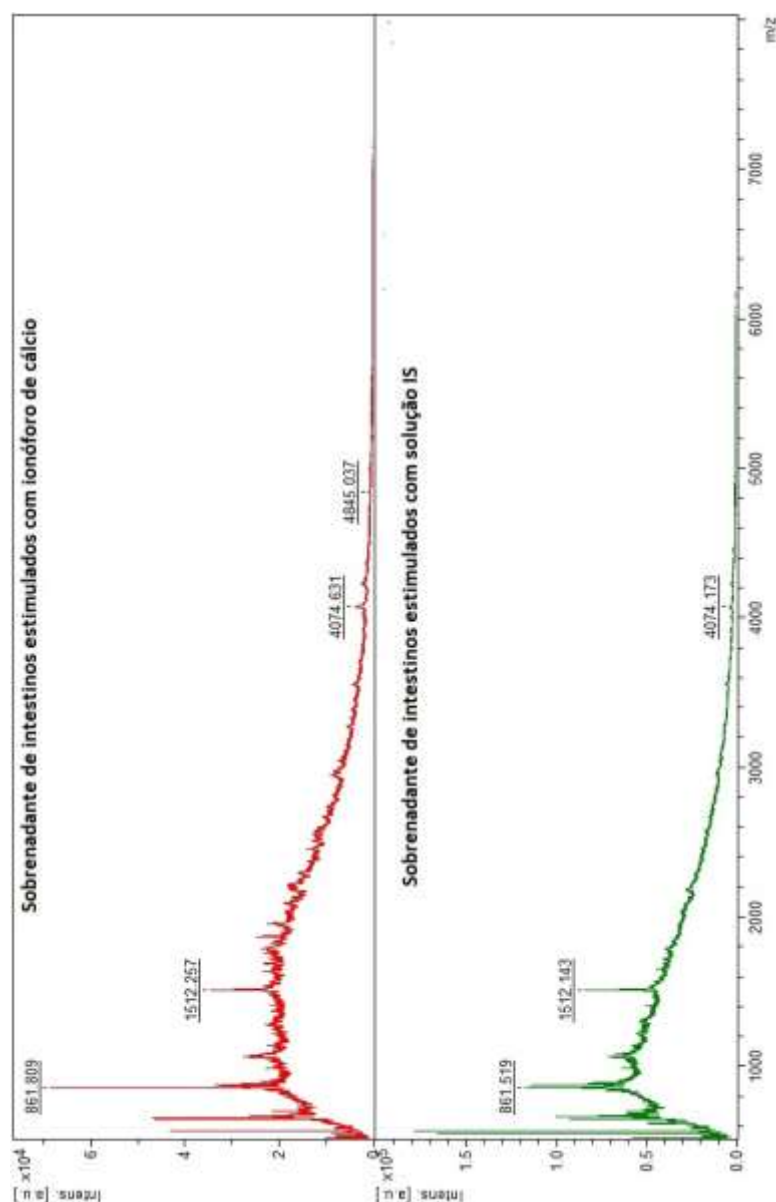


Figura 27 – Análise do perfil peptídico de amostras provenientes do sobrenadante de intestinos de *L. longipalpis* estimulados ou não com ionóforo de cálcio (0 a 8.000). Gráfico do perfil peptídico obtido por MALDI/TOF-MS de amostras provenientes da estimulação de intestinos médios de fêmeas de *L. longipalpis*. O eixo X representa a intensidade de sinal obtido após aplicação de laser sobre as amostras. O eixo Y representa o espectro de varredura de massa/carga (m/z) analisada. Em vermelho temos o resultado obtido para as amostras provenientes de estimulação com ionóforo de cálcio; em verde temos o resultado obtido para o grupo controle, onde a amostra é proveniente do sobrenadante de intestinos estimulados somente com solução IS.

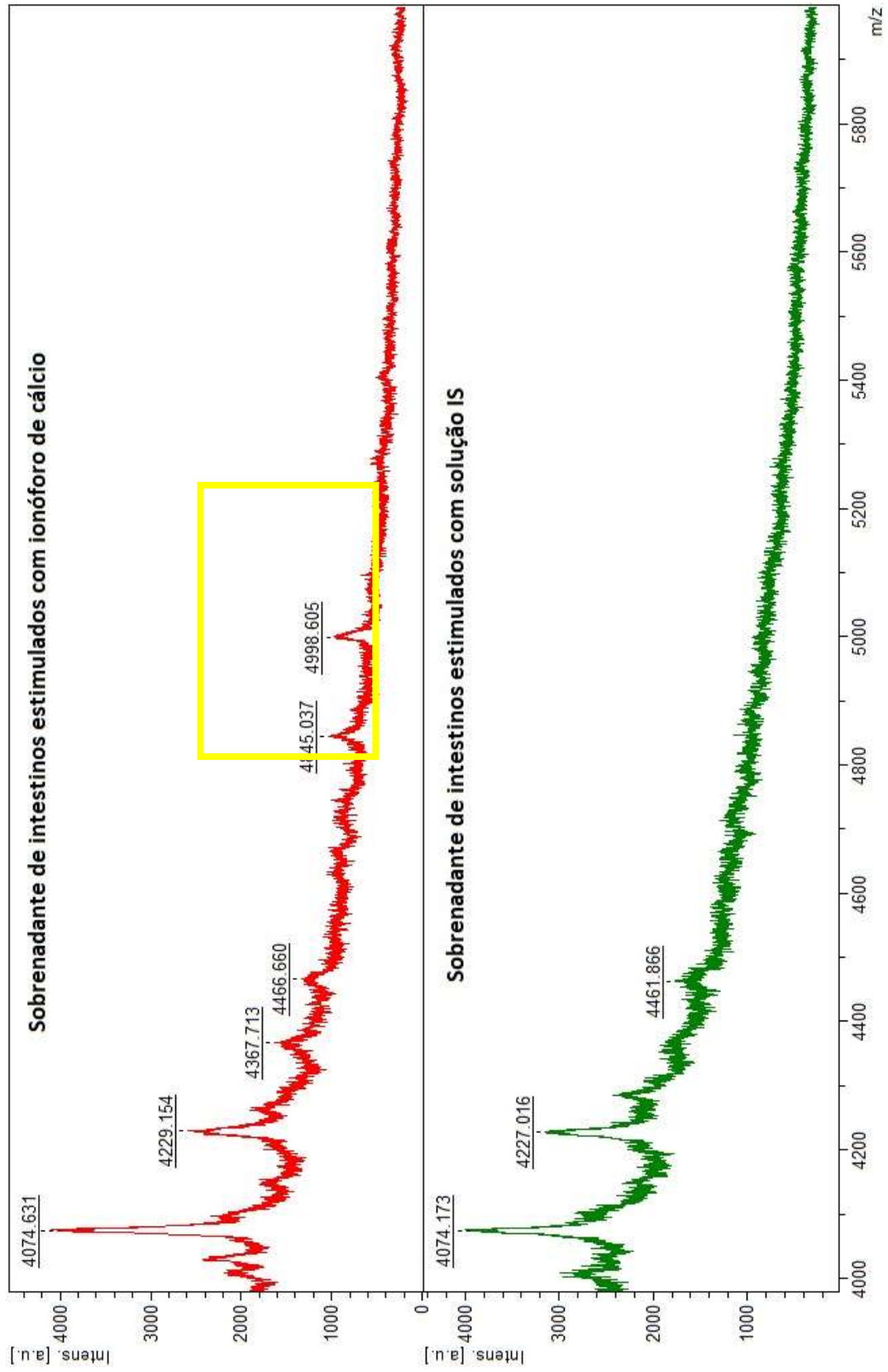


Figura 28 – Análise do perfil peptídico de amostras provenientes do sobrenadante de intestinos de *L. longipalpis* estimulados ou não com ionóforo de cálcio (4.000 a 6.000). Gráfico do perfil peptídico obtido por MALDI/TOF-MS de amostras provenientes da estimulação de intestinos médios de fêmeas de *L. longipalpis*. O eixo X representa a intensidade de sinal obtido após aplicação de laser sobre as amostras. O eixo Y representa o espectro de varredura de massa/carga (m/z) analisada. Em vermelho temos o resultado obtido para as amostras provenientes de estimulação com ionóforo de cálcio; em verde temos o resultado obtido para o grupo controle, onde a amostra é proveniente do sobrenadante de intestinos estimulados somente com solução IS. Destaque em amarelo para os picos identificados na amostra proveniente de intestinos estimulados com ionóforo de cálcio.

Em conjunto, os resultados apresentados nos **itens 5.13 e 5.14**, nos permitem inferir que as moléculas alcalinizadoras liberadas na hemolinfa de fêmeas recém alimentadas com sangue são ILPs, os quais são liberados através de vesículas por células enteroendócrinas a partir do influxo de cálcio.

A fim de gerar mais resultados que pudessem reforçar ainda mais nossa hipótese com relação aos ILPs de fêmeas de *L. longipalpis*, resolvemos realizar ensaios de expressão gênica em fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas ou não com sangue, tendo como alvos genes relacionados ao ILP3 (*insulin-like peptide-3*) e ao ILR (*insulin-like receptor*).

5.15 Análise qualitativa da expressão gênica de de ILP e IRP no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*

Conforme descrito nos **itens 5.13 e 5.14**, existem fortes evidências de que a insulina é a molécula alcalinizadora liberada na hemolinfa de fêmeas recém alimentadas com sangue. Caso essa molécula fosse realmente importante no processo de alcalinização ou mesmo em outros processos fisiológicos de *L. longipalpis*, era de se esperar que esses insetos expressassem genes, tanto das insulinas como de seus receptores. Diante disso, realizamos ensaios para verificar a expressão dos genes relacionados tanto ao ILP como ao ILR. Foram utilizados intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas somente com sacarose 15%, ou com tempo máximo de duas horas pós-alimentação com sangue (**item 4.11** da metodologia).

Nossos resultados mostraram que no intestino médio, tanto de fêmeas que se alimentam somente de sacarose 15%, como de fêmeas recém alimentas com sangue, há expressão dos dois genes alvos analisados, o primeiro relacionado a expressão de ILP e o segundo relacionado a expressão de ILR (**Figura 29**). Em conjunto esses resultados nos mostram que o intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* produz peptídeos relacionados a insulina, além de expressarem receptores que os tornam sensíveis e responsivos àquele peptídeo.

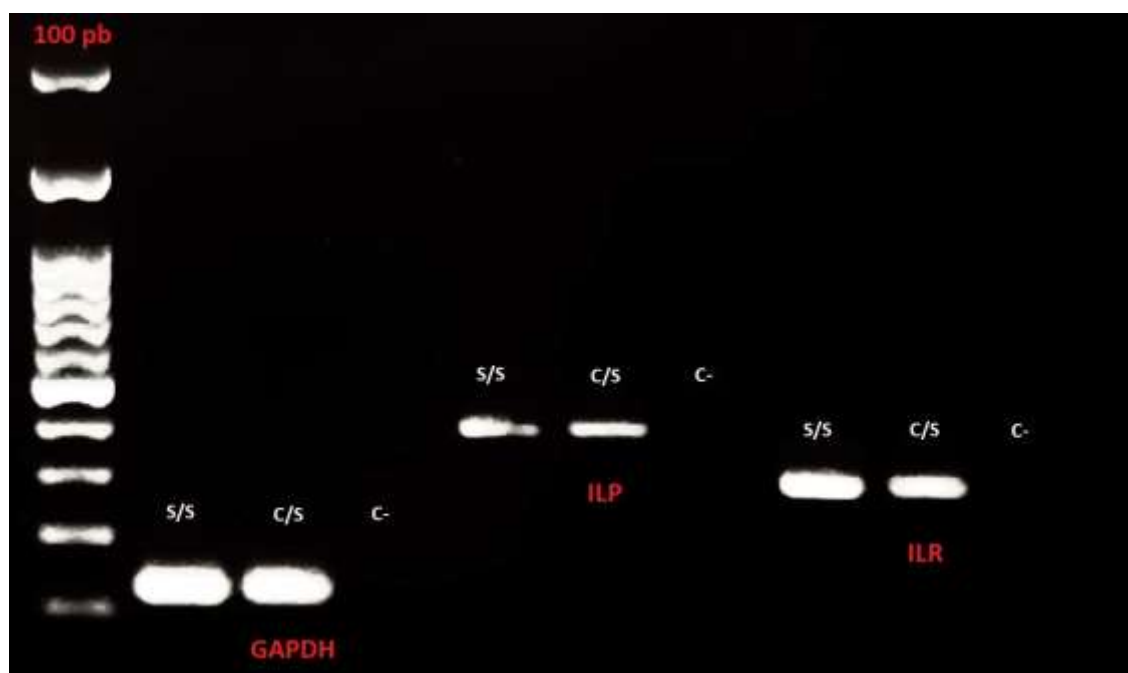


Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose. Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Brometo de etídio e revelado sob luz UV. Na imagem observam-se os três genes alvo escolhidos para análise, sendo eles: GAPDH, gene constitutivo utilizado como normalizador; ILP, gene referente ao *Insulin-like peptide*; e o gene ILR, referente ao *Insulin-like receptor*. Para cada gene foram analisadas duas amostras: S/S – Intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* que se alimentaram somente de sacarose 15%; C/S – Intestino médio de fêmeas de *L.longipalpis* que se alimentaram de sangue. Como referência do tamanho dos amplicons foi utilizado marcador de padrão molecular de 100 pb.

Visando ampliar ainda mais nosso entendimento com relação a atuação de peptídeos semelhantes a insulina no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*, realizamos também ensaios quantitativos de expressão.

5.16 Análise quantitativa da expressão gênica de ILR no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*

Uma vez que a molécula alcalinizadora está presente na hemolinfa somente das fêmeas que acabaram de se alimentar com sangue, pensamos que, muito provavelmente essas mesmas fêmeas deveriam tornar seu intestino mais sensível a essa molécula, de modo a responder de maneira mais eficiente ao estímulo. Com muitas evidências de que peptídeos semelhante a insulina poderiam ser a molécula envolvida no disparo de alcalinização intestinal, acreditávamos que, logo após a alimentação com sangue, as células intestinais deveriam aumentar a expressão dos receptores sensíveis a insulina.

Contudo, nossos resultados mostraram que, apesar de observa-se um aumento na expressão do gene relacionado aos receptores entre as fêmeas de *L. longipalpis* recém alimentadas com sangue, o mesmo não é significativo quando comparado à expressão dos receptores no intestino médio das fêmeas de *L. longipalpis* que se alimentaram somente de solução de sacarose 15% (**Figura 30**).

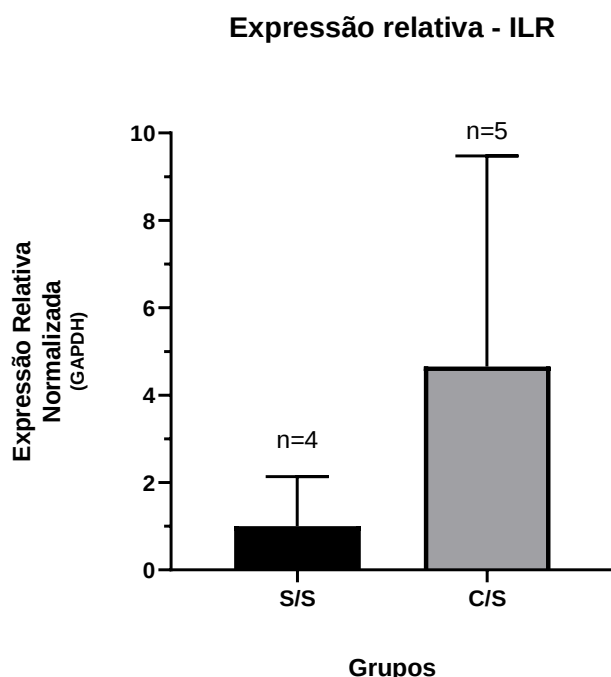


Figura 30 – RT-qPCR de ILR do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*. RT-qPCR do gene ILR de fêmeas de *L. longipalpis* submetidas a dois tratamentos: S/S – fêmeas alimentadas somente com solução de sacarose 15%; C/S – fêmeas recém alimentadas com sangue (duas horas como tempo máximo pós-alimentação). Cada grupo é composto por réplicas experimentais (S/S – 4; C/S -5) onde cada réplica representa um “pool” de 20 intestinos. As análises dos resultados de amplificação foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo o gene GAPDH escolhido como normalizador. Teste *t-student* não pareado com valor de $p = 0.1860$.

Até agora observamos que PEG 8.000 (e outros compostos sintéticos) é capaz de estimular a alcalinização intestinal por meio de um mecanismo de choque osmótico entre o conteúdo intestinal e os enterócitos; observamos também que a alcalinização provocada por PEG 8.000 não faz com que moléculas alcalinizantes sejam liberadas na hemolinfa dos insetos que se alimentaram; que a ativação eficiente do mecanismo de alcalinização intestinal é dependente da atuação de aquaporinas; e mostramos que, apesar de não serem liberadas durante a alimentação com PEG 8.000, essas moléculas alcalizadoras (*Insulin-like peptides*) já estão presentes nos intestinos dos insetos antes mesmo da alimentação com sangue, sendo na hemolinfa liberadas a partir de uma sinalização celular de cálcio. Mostramos também que a

expressão dos receptores envolvidos no reconhecimento dos peptídeos semelhantes a insulina, não sofre variação significativa quando comparamos fêmeas alimentadas somente com sacarose 15% e fêmeas recém alimentadas com sangue.

Diante dos resultados obtidos até o momento, ficou claro para nós que, os mecanismos de alcalinização intestinal disparados por uma alimentação com PEG 8.000 seguem uma via de sinalização intracelular, que, pelo menos em algumas partes (principalmente nas iniciais), seguem um caminho diferente do que havíamos observado para uma alimentação com proteínas ou sangue (NEPOMUCENO et al., 2022a, 2022b; SANTOS et al., 2008, 2011) (**Figura 31 e 32**).

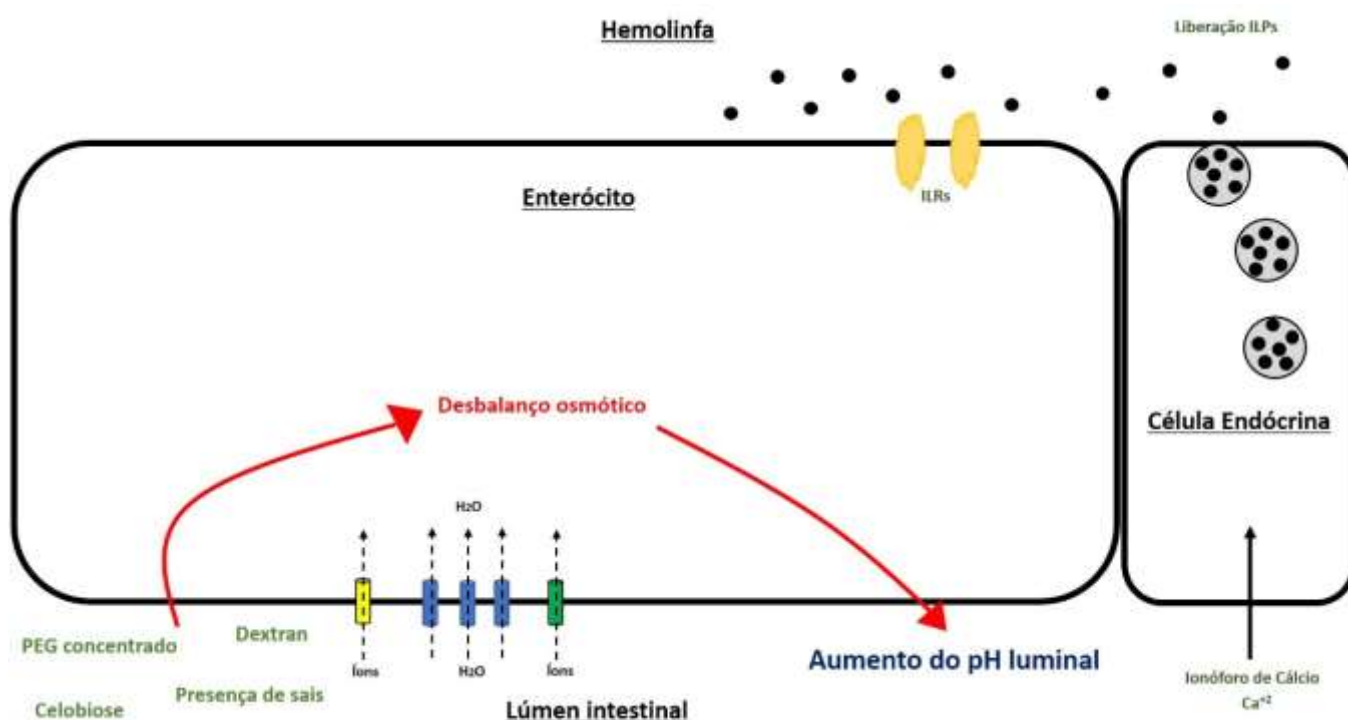


Figura 31– Esquema ilustrativo dos mecanismos de alcalinização intestinal. Ilustração dos passos até agora aqui demonstrados para os mecanismos de alcalinização envolvendo a alimentação com PEG 8.000 (e outras moléculas sintéticas), e a atuação de aquaporinas, que em conjunto levam a um desbalanço osmótico, além da participação do influxo de cálcio na liberação na hemolinfa dos insetos de vesículas contendo moléculas alcalinizantes, identificadas como ILPs, as quais são reconhecidas por

ILRs. Tanto o desbalanço osmótico como a ação de ILPs levam a um aumento do pH intestinal. Destacam-se também a presença de transportadores de íons, os quais, apesar de ainda não identificados, mostraram sua importância nos experimentos onde a alcalinização foi potencializada em insetos que se alimentaram de solução contendo IS.

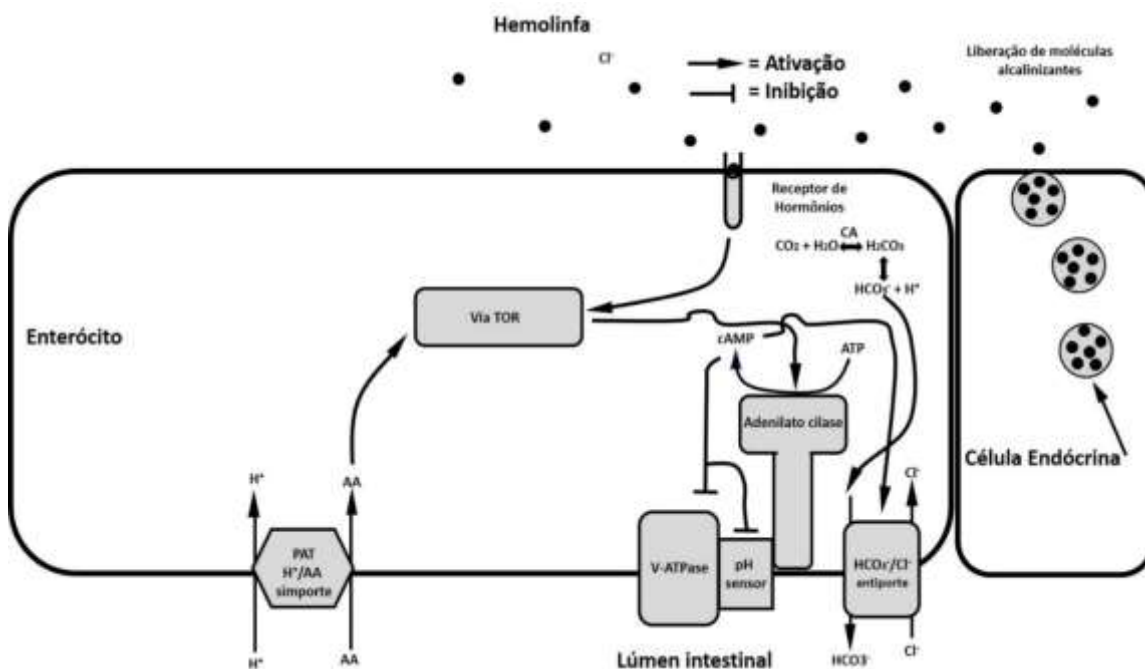


Figura 32 – Esquema ilustrativo das vias de alcalinização intestinal de *L. longipalpis*. Esquema ilustrativo com as vias de alcalinização intestinal descritas por Santos, 2014 e por Nepomuceno, 2019.

Com isso resolvemos analisar as etapas de sinalização intracelular dos mecanismos de alcalinização disparados pelo desbalanço osmótico (aqui representado pela alimentação dos insetos com PEG 8.000). Isso foi realizado a partir da alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com diferentes inibidores e segundos mensageiros já bem conhecidos. O primeiro inibidor escolhido foi a rapamicina, inibidor este que atua na via de sinalização celular TOR (**item 1.4**).

5.17 Efeito da alimentação com rapamicina na alcalinização intestinal disparada por PEG 8.000

Assim como descrito no **item 4.9** da metodologia desse trabalho, realizamos a alimentação de fêmeas *L. longipalpis* com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM e Rapamicina na concentração final de 20 μ M, tudo dissolvido em solução IS. Após alimentação, os intestinos foram dissecados e observados em lupa estereoscópica e sua cor comparada com escala padrão para o corante indicador.

Nossos resultados mostraram que, na alimentação com Rapamicina à 20 μ M, as fêmeas de *L. longipalpis* perdem sua capacidade de alcalinizar o intestino. Em uma análise de proporção fica claro que todos os intestinos de fêmeas que se alimentaram com Rapamicina perdem totalmente sua capacidade de alcalinizarem após a ingestão de PEG 8.000 (**Figura 33**). Vale destacar que todos os insetos utilizados como controle (ou seja, que se alimentaram de PEG 8.000 na ausência de Rapamicina), apresentaram pH intestinal com valores $\geq 7,0$. Com isso confirmamos que, no processo de alcalinização intestinal disparado pela alimentação com PEG 8.000, há participação da via TOR de sinalização celular.

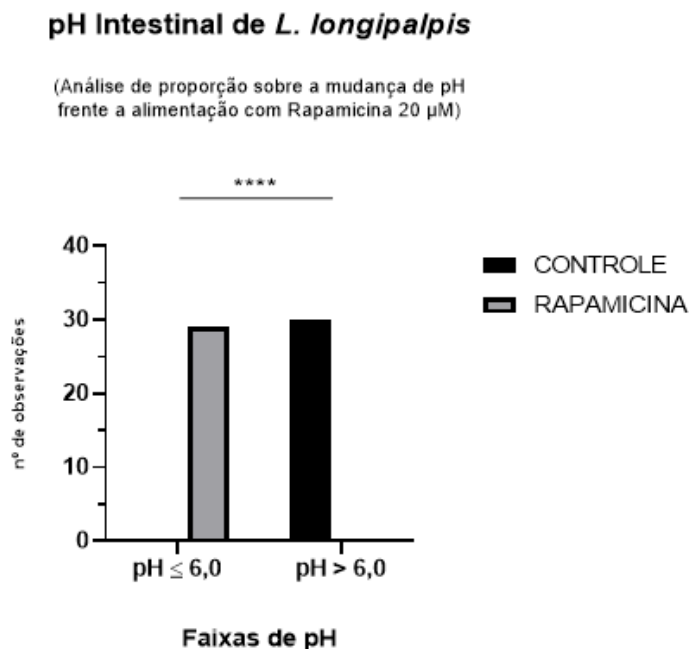


Figura 33 – Análise da proporção de intestinos de *L. longipalpis* fêmeas que sofreram alteração de pH quando alimentadas com Rapamicina à 20 μ M. Gráfico de proporção onde observa-

se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após alimentação com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + Rapamicina 20 μ M (Grupo Rapamicina). Como grupo controle temos o pH indicado pelo intestino de fêmeas alimentadas com solução de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM. Os intestinos foram dissecados e sua cor comparada com escala padrão para o corante indicador. Teste de proporção de Fisher. **** - $p < 0,0001$.

Com base em resultados anteriores do nosso grupo, já havíamos incriminado a via TOR como sendo um ponto crucial no processo de alcalinização intestinal (NEPOMUCENO, 2019) (**Figura 32**), diante do fato de PEG 8.000 iniciar a alcalinização intestinal de uma forma diferente daquela realizada pela hemolinfa após a alimentação com sangue (dado o fato de não encontrarmos ação de ILPs na hemolinfa dos insetos alimentados com PEG 8.000), passamos então a procurar por transportadores e segundos mensageiros que poderiam atuar durante o processo de alcalinização disparado pela alimentação com PEG 8.000, buscando dessa forma uma maneira de elucidar se a via de alcalinização, após a ativação do sistema TOR (**Figura 34**), é a mesma via envolvida na alcalinização promovida por outros estímulos como a ingestão de sangue. Realizamos então ensaios de alimentação com diferentes inibidores, sendo os primeiros deles focados na inibição dos transportadores $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$.

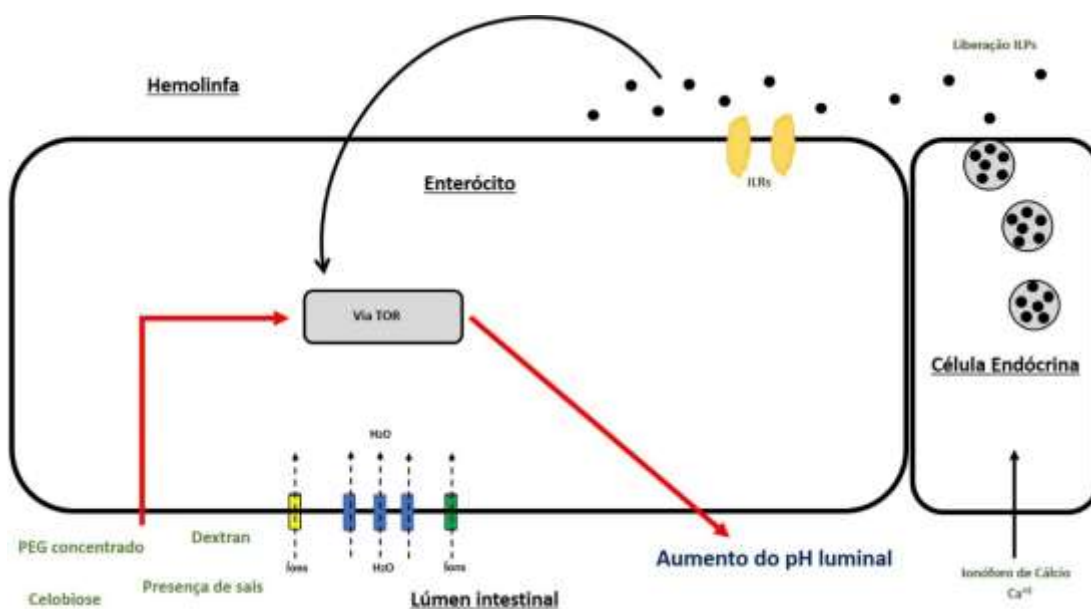


Figura 34 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular relacionadas com a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal com destaque para a via TOR. Ilustração das

vias de sinalização intracelular ativadas a partir da alimentação com PEG 8.000. Destaca-se a descoberta de que a alcalinização induzida por PEG 8.000 ativa de uma maneira ainda desconhecida a via TOR, levando à alcalinização intestinal.

5.18 Efeito da alimentação com DIDS, NPPB e H89 no processo de alcalinização intestinal disparado por PEG 8.000

Conforme descrito no **item 4.9** da metodologia deste trabalho, os ensaios para determinar a participação dos transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ no processo de alcalinização, foram realizados por meio de alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, PEG 8.000 10 mM com os inibidores DIDS 0,1 mM ou NPPB 0,1 mM, ambos inibidores seletivos dos transportadores $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$.

Nossos resultados mostraram que tanto o inibidor DIDS quanto o NPPB foram eficientes em inibir a alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*, ambos apresentaram inibição significativa quanto comparados com o grupo controle (**Tabela 2**). Esses resultados mostraram que de fato a potencialização da alcalinização no intestino de fêmeas de *L. longipalpis* passa pela ação dos transportadores que fazem o antiporte $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (**Figura 35**).

Tabela 2 - Valores de pH intestinal de insetos alimentados com DIDS/NPPB

Tratamento	Insetos	Faixa de pH		Valor de p
		pH < 7,0	pH ≥ 7,0	
Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM (Controle)	Fêmeas	0	10	–
Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + DIDS 0,1 mM	Fêmeas	13	23	0,0006
Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + NPPB 0,1 mM	Fêmeas	16	24	0,0202

Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentados com os inibidores DIDS e NPPB. Tabela de análise do pH intestinal de *L. longipalpis* alimentados com solução contendo: Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, PEG 8.000 10 mM e DIDS 0,1 mM ou NPPB 0,1 mM (**Grupo Rapamicina**). Como controle foram utilizados os dados obtidos a partir da alimentação das fêmeas de *L. longipalpis* somente com Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 10 mM (**Grupo Controle**). Foram realizados testes de proporção de Fisher dos grupos DIDS e NPPB com relação com grupo controle. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

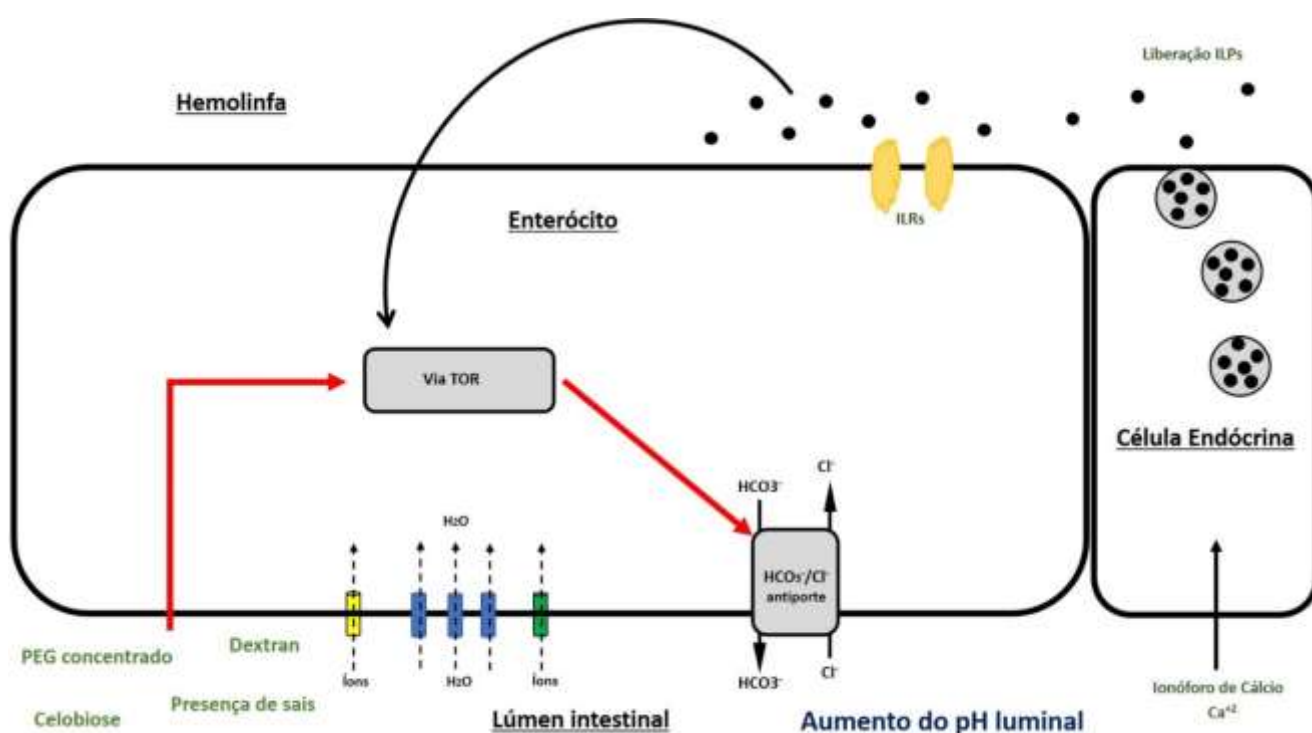


Figura 35 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular relacionadas com a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal com destaque para o transportador HCO₃⁻/Cl⁻. Ilustração das vias de sinalização intracelular ativadas a partir da alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com PEG 8.000. Destaca-se a descoberta de que a alcalinização induzida por PEG 8.000 (desequilíbrio osmótico) é dependente da ativação dos transportadores de HCO₃⁻/Cl⁻, levando ao processo de alcalinização intestinal.

Realizamos também ensaio de alimentação com o inibidor H89, este, diferente do que acontece para os outros, atua inibindo a fosforilação dos transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, atuando diretamente na enzima PKA – “*Protein Kinase A*” (PKA é a fosforilase que ativa o antiporte $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$). Conforme descrito no **item 4.9** da metodologia deste trabalho, a alimentação dos insetos com o inibidor foi realizada em alimentador artificial com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM e H89 10 μM .

Nossos resultados mostraram que, assim como esperado, H89 mostrou capacidade de inibir a alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com PEG 8.000 (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Valores de pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentados H89

Tratamento	Grupo	Faixa de pH		Valor de p
		pH < 7,0	pH ≥ 7,0	
Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM (Controle)	Controle	0	10	–
Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + H89 10 μM	H89	15	5	p = 0,0002

Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com o inibidor H89. Tabela de análise do pH intestinal de *L. longipalpis* alimentados com solução contendo: Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, PEG 8.000 10 mM e H89 10 μM (**Grupo H89**). Como controle foram utilizados os dados obtidos a partir da alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* somente com Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 10 mM (**Grupo Controle**). Foram realizados testes de proporção de Fisher para o grupo H89 com relação com grupo controle. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Esse resultado reforça o resultado mostrado anteriormente, onde DIDS e NPPB também mostraram a capacidade de inibição do processo de alcalinização. Além disso podemos notar que a alimentação com H89 mostrou maior poder de inibição, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato dessa molécula atuar diretamente no bloqueio à fosforilação dos transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$.

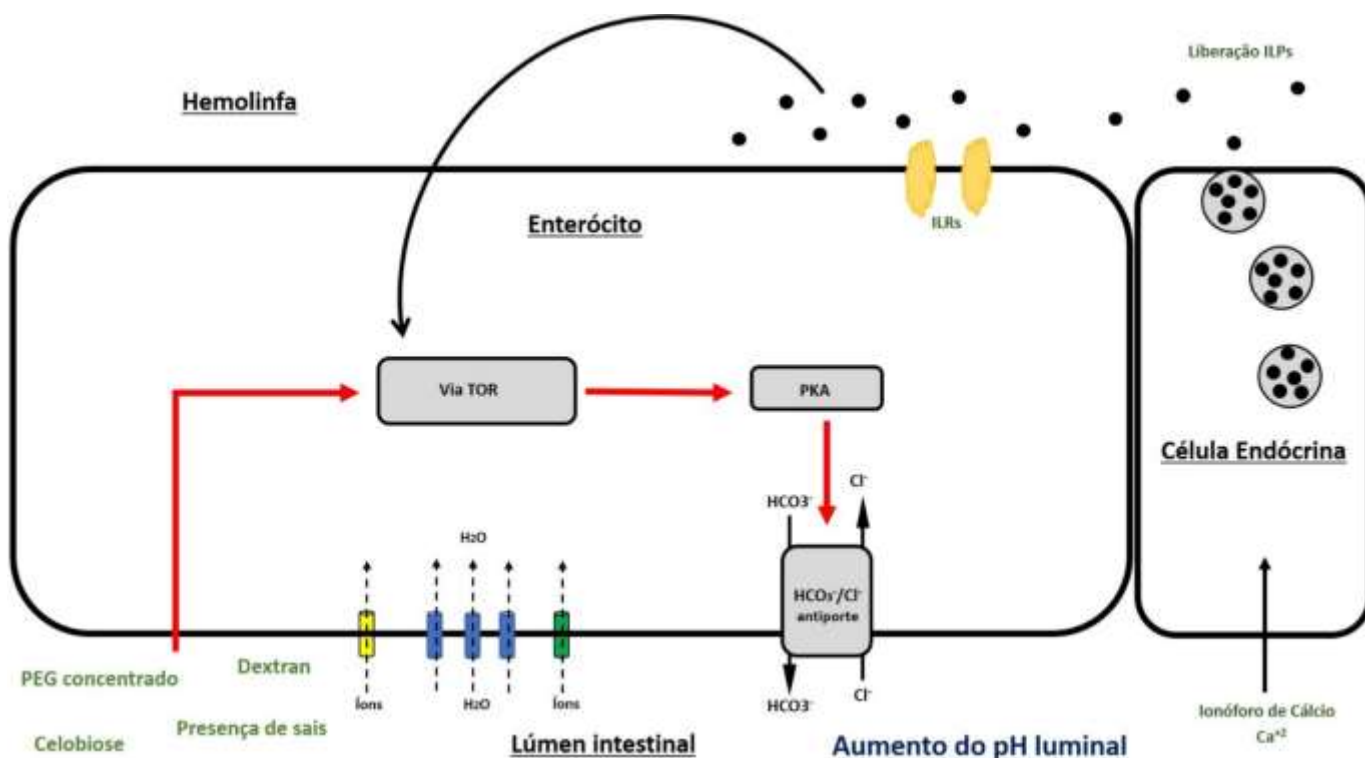


Figura 36 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular relacionadas com a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal com destaque para a participação de PKA. Ilustração das vias de sinalização intracelular ativadas a partir da alimentação com PEG 8.000. Destaca-se a descoberta de que a alcalinização induzida por PEG 8.000 passa pela participação de PKA, que fosforila os transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, levando ao processo de alcalinização intestinal.

Uma vez determinada a participação central dos transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ no processo de alcalinização, passamos a buscar por alvos que estivessem localizados de modo

“*upstream*” nessa via de sinalização. Decidimos então realizar experimentos que buscassem identificar a participação de cAMP nesse processo.

A molécula de cAMP é um importante segundo mensageiro de vias de sinalização, por isso a escolha mais lógica seria entender o papel dessa molécula nos processos de alcalinização intestinal. Com base em resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, já sabíamos que cAMP está envolvido no processo de alcalinização disparado pela ingestão de proteínas e atuaria nos transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, por isso realizamos ensaios onde um análogo permeável de cAMP foi oferecido a insetos que haviam se alimentado de inibidores do processo de alcalinização, como, por exemplo, Rapamicina (assim como demonstrado no **item 5.17**).

5.19 Avaliação da capacidade de reversão do bloqueio de alcalinização intestinal através da alimentação com cAMP-análogo

Como demonstrado anteriormente, a alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com Rapamicina foi capaz de bloquear a alcalinização intestinal. Esse bloqueio tem relação direta com a inibição de uma importante via de sinalização celular, a via TOR. Partindo das observações obtidas por Nepomuceno, 2019, onde ficou evidenciada por meio de outras metodologias a participação de cAMP no processo de alcalinização intestinal, resolvemos testar se a suplementação com cAMP de uma alimentação contendo Rapamicina, seria capaz de reverter a inibição de alcalinização provocada por esta última.

Para isso, conforme descrito no **item 4.9**, os insetos foram alimentados com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + Rapamicina 20 μM + cAMP 2,8 mM, todos dissolvidos em IS. Como grupo controle para esse ensaio, realizamos separadamente a alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + Rapamicina 20 μM , também com todos dissolvidos em IS.

Nossos resultados mostraram que cAMP é capaz de reverter a inibição do processo de alcalinização intestinal ocasionada pela alimentação com Rapamicina (**Figura 37**). Tal resultado nos mostrou que a ação de cAMP se coloca “*downstream*” a mTOR, ou seja, abaixo

dos estímulos iniciais que ativam a via TOR, nos dando indícios de que TOR controla a Adenilato Ciclase (enzima que transforma ATP em cAMP).

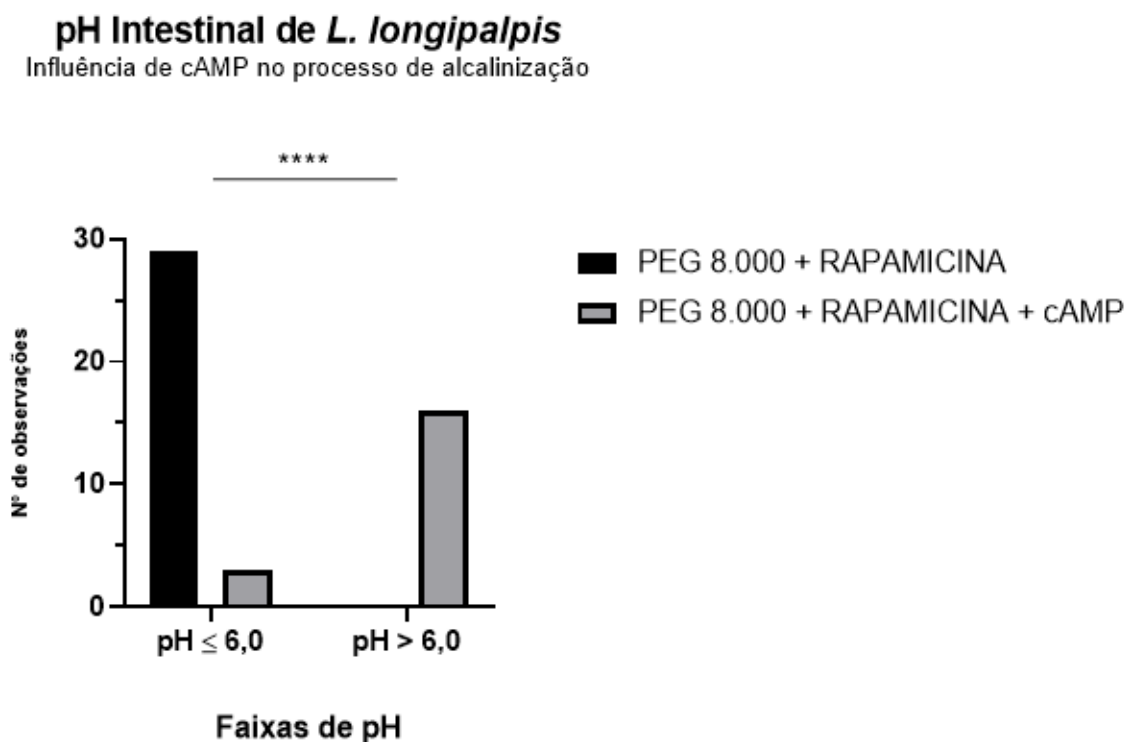


Figura 37 – Análise da proporção de reversão do processo inibitório de alcalinização ocasionado por Rapamicina frente suplementação com cAMP. Gráfico de proporção onde observa-se a alteração do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* após alimentação com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + Rapamicina 20 µM + cAMP 2,8 mM (**Grupo Rapamicina + cAMP**). Como grupo controle temos fêmeas alimentadas com solução de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + Rapamicina 20 µM (**Grupo Rapamicina**). Os intestinos foram dissecados e sua cor comparada com escala padrão para o corante indicador. Teste de proporção de Fisher. **** - $p < 0,0001$.

De forma complementar, realizamos ensaios para verificar se o bloqueio da Adenilato ciclase por DDA, seria capaz de inibir o processo de alcalinização intestinal disparado pela alimentação com PEG 8.000.

Para isso, conforme descrito no **item 4.9** da metodologia deste trabalho, realizamos alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + DDA 2 mM.

Nossos resultados mostraram que as fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com solução contendo DDA à 2 mM, perdem significativamente a capacidade de alcalinização diante de uma alimentação contendo PEG 8.000 (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Valores de pH intestinal de insetos alimentados com DDA

Tratamento	Insetos	Faixa de pH		Valor de p
		pH < 7,0	pH ≥ 7,0	
Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM (Controle)	Fêmeas	0	10	–
Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + DDA 2 mM (DDA)	Fêmeas	14	8	0,0013

Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentados com DDA. Tabela de análise do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentados com solução contendo: Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, PEG 8.000 10 mM e DDA 2 mM (**Grupo DDA**). Como controle foram utilizados os dados obtidos a partir da alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* somente com Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 10 mM (**Grupo Controle**). Foram realizados testes de proporção de Fisher para o grupo DDA com relação ao grupo controle. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Esse resultado confirma aquele apresentado na **Figura 37**, onde mostramos que a presença de cAMP reverte uma inibição por nós provocada no processo de alcalinização,

mostrando assim, de duas formas diferentes, que a presença de cAMP é essencial para a efetividade e eficiência do processo de alcalinização intestinal em fêmeas de *L. longipalpis*.

Resolvemos então realizar mais um ensaio de confirmação sobre a participação da via TOR nos mecanismos de alcalinização intestinal. Para isso realizamos a alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com o carboidrato galactosamina, o qual, em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, se mostrou um inibidor da via TOR, afetando a síntese de enzimas intestinais durante o processo de digestão de sangue (SILVA FERNANDES et al., 2020).

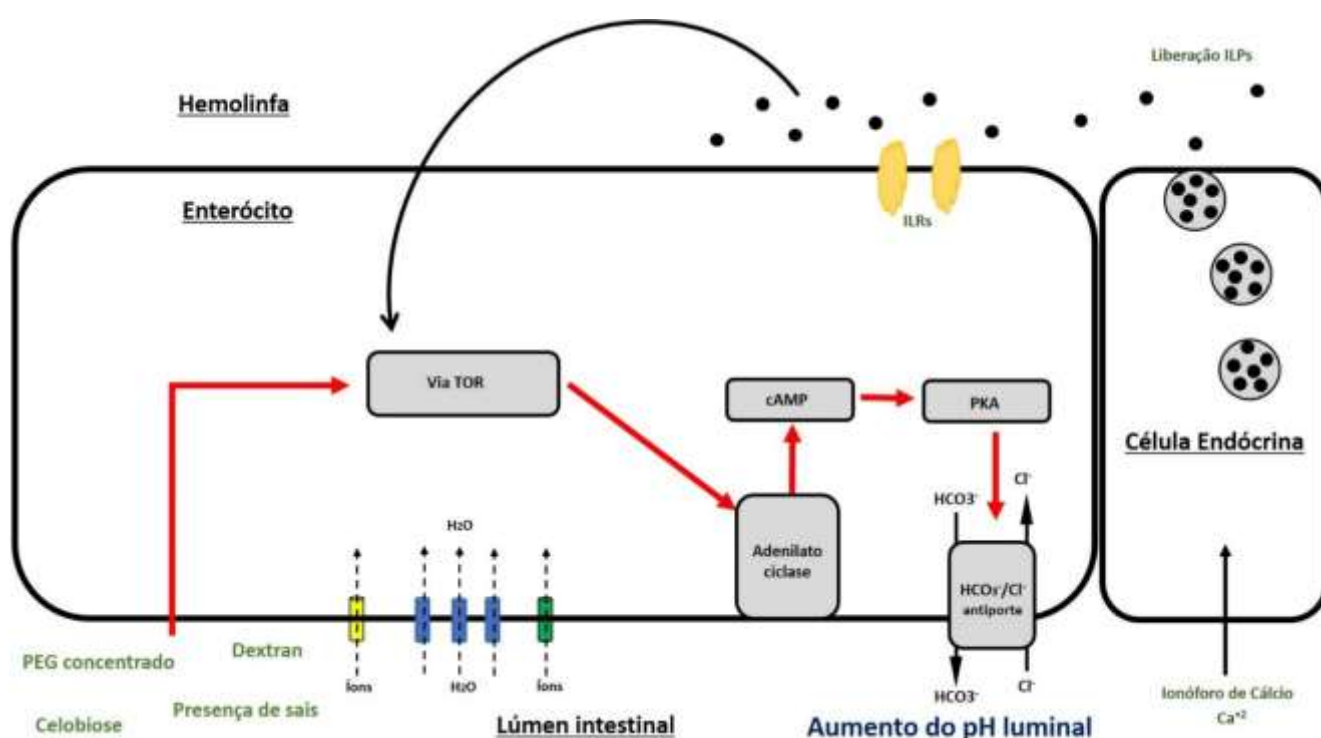


Figura 38 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular relacionadas com a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal com destaque para a participação da Adenilil Ciclase e de cAMP. Ilustração das vias de sinalização intracelular ativadas a partir da alimentação com PEG 8.000. Destaca-se a descoberta de que a alcalinização induzida por PEG 8.000 passa pela participação da enzima adenilil ciclase e de cAMP.

5.20 Efeito da alimentação com Galactosamina no processo de alcalinização intestinal disparado pela alimentação com PEG 8.000

Conforme descrito no **item 4.9** da metodologia deste trabalho, realizamos alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com solução contendo Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + Galactosamina 30 mM, todos dissolvidos em solução IS, como grupo controle foram utilizados insetos que se alimentaram de Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM, também dissolvidos em IS. Os insetos, após o período de alimentação, foram dissecados e a cor adquirida pelo intestino médio comparada com escala padrão para o corante indicador.

Nossos resultados mostraram que, assim como aconteceu para os insetos alimentados com Rapamicina, as fêmeas de *L. longipalpis* alimentados com Galactosamina à 30 mM tiveram bloqueio significativo do processo de alcalinização intestinal (**Tabela 5**). Este resultado confirma mais uma vez nossa hipótese de que a via TOR tem papel central nos processos envolvendo a alcalinização intestinal em *L. longipalpis*.

Conforme demonstrado nos resultados anteriores, ficou claro que o processo de alcalinização intestinal disparado pelo desbalanço osmótico entre lúmen e enterócitos no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* passa pela ativação da via TOR. Como TOR atua também na síntese de enzimas intestinais envolvidas no processo de digestão de *L. longipalpis*, nos perguntamos se a alimentação de fêmeas com PEG 8.000 à 10 mM, afetaria de alguma maneira a atividade de tripsina no intestino médio daqueles insetos. Diante disso resolvemos realizar ensaio de atividade enzimática para tripsina no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* que haviam se alimentado de solução contendo PEG 8.000.

Tabela 5 - Valores de pH intestinal de insetos alimentados com Galactosamina

Tratamento	Insetos	Faixa de pH		Valor de p
		pH < 7,0	pH ≥ 7,0	
Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM (Controle)	Fêmeas	0	10	–
Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM + Galactosamina 30 mM (Galactosamina)	Fêmeas	16	1	p < 0,0001

Determinação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentados com Galactosamina. Tabela de análise do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentados com solução contendo: Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1%, PEG 8.000 10 mM e Galactosamina 30 mM (**Grupo Galactosamina**). Como controle foram utilizados os dados obtidos a partir da alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* somente com Sacarose 15%, Azul de Bromotimol 0,1% e PEG 8.000 10 mM (**Grupo Controle**). Foram realizados testes de proporção de Fisher para o grupo Galactosamina com relação com grupo Controle. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

5.21 Avaliação da atividade tripsinolítica em intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com PEG 8.000

Dado que a alimentação com PEG 8.000 ativa o mecanismo de alcalinização de *L. longipalpis*, e que este mecanismo é afetado pela inibição da via TOR (envolvido com a síntese de proteases intestinais), resolvemos realizar ensaio enzimático para verificar se de alguma maneira, a alimentação com PEG 8.000 é capaz de estimular a atividade de enzimas intestinais,

mais especificamente, de tripsinas. Para isso, realizamos os ensaios conforme descrito no **item 4.13** da metodologia deste trabalho.

Nossos resultados mostraram que a alimentação com PEG 8.000 à 10 mM é capaz de aumentar a atividade de tripsinas no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* (**Figura 39**). Este resultado mostra mais uma vez que ocorre a ativação da via TOR durante o processo de alimentação com PEG 8.000, reforçando a ideia de que a alcalinização observada a partir de um desbalanço osmótico passa também pela ativação daquela via.

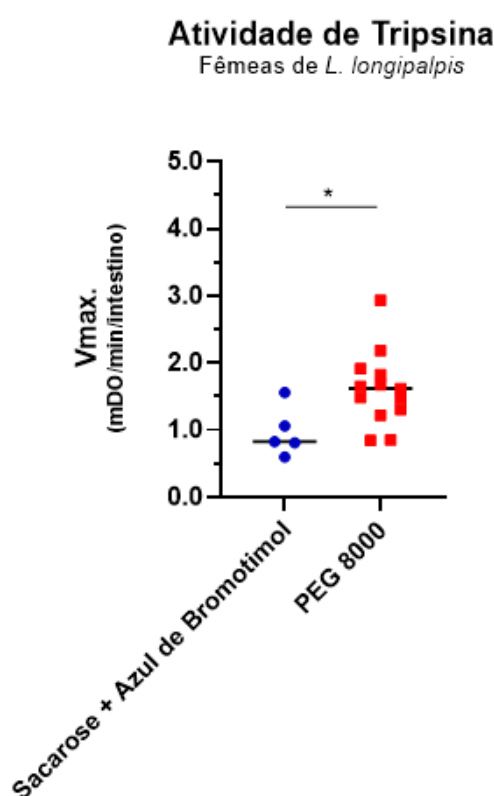


Figura 39 – Atividade de Tripsina no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*. Atividade tripsinolítica no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* submetidas a dois tipos de alimentação: Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% (**em azul**); e Sacarose 15% + Azul de Bromotimol 0,1% + PEG 8.000 10 mM (**em vermelho**). Atividade expressa em mDO/minuto/intestino. Teste *t-student* onde $p = 0,0301$.

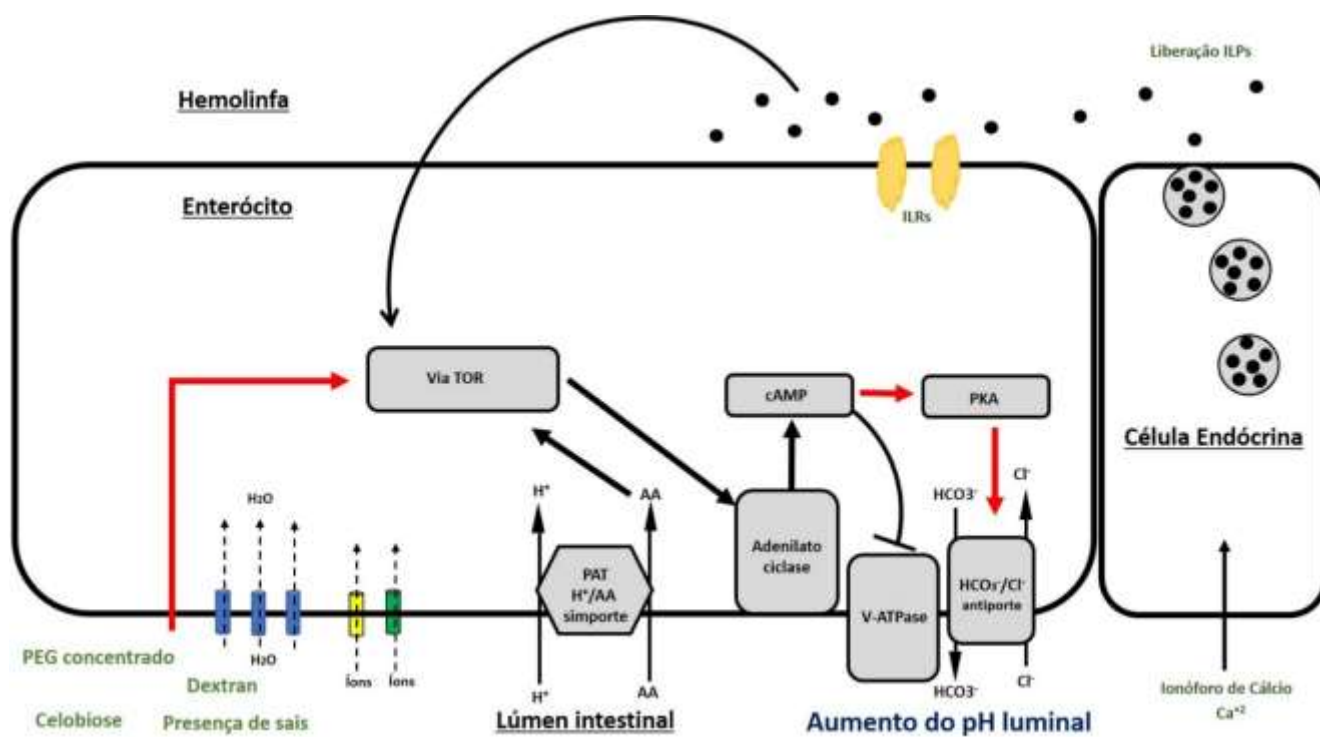


Figura 40 – Esquema ilustrativo evidenciando a descoberta de novos passos de sinalização nos mecanismos de alcalinização intestinal de *L. longipalpis*. Vias de sinalização intracelulares onde observa-se os caminhos através dos quais *L. longipalpis* alcaliniza seu intestino médio. Em preto temos as vias de sinalização anteriormente descritas por Santos, 2010 e Nepomuceno, 2019. Em vermelho, temos as vias de sinalização e seus efetores descobertos neste trabalho. Evidencia-se a diferença de osmolaridade entre enterócitos e lúmen que provoca um choque osmótico capaz de ativar a via TOR. O sistema TOR por sua vez ativa a enzima adenilato ciclase, provocando o aumento de cAMP citoplasmático que leva a ativação da quinase PKA, responsável pela fosforilação e ativação dos transportadores de HCO₃⁻/Cl⁻. Apesar do choque osmótico não provocar a liberação de moléculas alcalinizantes pelas células endócrinas, evidencia-se aqui que as mesmas podem ser estimuladas a secretar tais moléculas a partir de um influxo de Ca²⁺. Aqui destacamos também o papel das aquaporinas no processo de alcalinização intestinal, bem como a participação de *Insulin-like peptides* (ILPs) e dos *Insulin-like receptors* (ILRs).

6. DISCUSSÃO

Nosso grupo de pesquisa possui ampla experiência no estudo da fisiologia digestiva de insetos hematófagos, com destaque para fêmeas de *L. longipalpis* (GONTIJO et al., 1998; NEPOMUCENO et al., 2020, 2022b, 2022a; SANTOS et al., 2008, 2011). Dentre os principais componentes envolvidos no processo digestivo, o pH intestinal chama grande atenção, uma vez que grande parte dos processos celulares dependem de um ambiente favorável para que possam ocorrer (CASEY; GRINSTEIN; ORLOWSKI, 2010; DEMAUREX, 2002; KURKDJIAN; GUERN, 1989; TERRA; FERREIRA; SILVA, 2023). Sabemos que fêmeas de *L. longipalpis* possuem um pH intestinal ácido ($\text{pH} \leq 6,0$), o qual é mantido nesse valor de forma ativa, através da ação de bombas eletrogênicas (V-ATPases) (NEPOMUCENO et al., 2017b; SANTOS et al., 2008). O valor de pH intestinal ácido encontrado nesses insetos coincide com o valor ótimo de atividade de uma das principais enzimas envolvidas na digestão de carboidratos entre os insetos, as alfa-glicosidases (GONTIJO et al., 1998; MALTA, 2021). Portanto, o pH intestinal ácido é encontrado nas fêmeas de *L. longipalpis* justamente no período em que essas fêmeas estão se alimentando de açúcares. Como destacado anteriormente, as fêmeas necessitam de uma alimentação com sangue para maturação de seus ovócitos possa ocorrer de forma efetiva (ADAMS, 1999). Essa mudança no padrão alimentar coincide também com uma mudança no valor de pH intestinal, o qual, nas primeiras horas após a alimentação com sangue, nas fêmeas de *L. longipalpis*, atinge valores próximos a 8,15 (GONTIJO et al., 1998; SANTOS et al., 2008, 2011, 2014). Vale destacar que nosso grupo de pesquisa descreveu as mesmas mudanças de pH intestinal para fêmeas de *A. aegypti* e fêmeas de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (NEPOMUCENO et al., 2017a; SAAB, 2023).

Até o momento, três eram os principais mecanismos descritos relacionados com o processo de alcalinização intestinal (todos descritos em fêmeas de *L. longipalpis*) (NEPOMUCENO et al., 2020; SANTOS et al., 2008, 2011), sendo eles: a volatilização de CO_2 durante o processo de alimentação do inseto. Provavelmente, a movimentação do sangue pelas peças bucais do inseto permite uma perda de CO_2 . Esta saída de CO_2 leva ao consumo de H^+ ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$), com isso o sangue já chega ao intestino do inseto com um valor de pH acima do encontrado no próprio hospedeiro; o segundo mecanismo tem relação direta com o desligamento das V-ATPases e com a ativação de transportadores de HCO_3^- ; o

terceiro mecanismo consiste em um sistema de transporte do tipo simporte, em que certos aminoácidos são transportados conjuntamente com íons H^+ do lúmen intestinal para o citoplasma dos enterócitos (sistema PAT), o que resulta na alcalinização do lúmen intestinal e acidificação do citoplasma dos enterócitos (NEPOMUCENO et al., 2020) (**item 1.2 da introdução deste trabalho**).

Brevemente, retomando a contextualização já exposta no início dos resultados apresentados neste trabalho, partindo da ampla experiência no nosso grupo de pesquisa nos processos envolvendo pH intestinal de insetos hematófagos, a hipótese inicial do presente trabalho partiu da observação de que fêmeas de *L. longipalpis* alcalinizavam seu intestino quando alimentadas com moléculas de origem proteica, independentemente de sua natureza (SANTOS, 2010). Como, mesmo em insetos hematófagos que nunca se alimentaram de sangue, existe uma pequena atividade proteolítica, basicamente atividade tripsinolítica (TELLERIA et al., 2007), pensamos que faria sentido biológico que padrões moleculares fossem o gatilho inicial para o processo de alcalinização, esse padrão molecular seria composto basicamente por peptídeos gerados pela atividade proteolítica inicial do intestino médio de insetos hematófagos. Como ficou demonstrado que qualquer proteína é capaz de disparar o mecanismo de alcalinização intestinal, e tendo em mente que, por exemplo, as tripsinas sempre clivam proteínas em resíduos de arginina ou lisina, os produtos de clivagem gerados a partir daquela atividade tripsinolítica poderiam ser reconhecidos por receptores que identificassem a extremidade carboxila de resíduos de lisina e arginina, dando início aos eventos responsáveis pela alcalinização.

Contudo, esta hipótese não se mostrou verdadeira. Em vários ensaios testamos sobre intestinos de fêmeas de *L. longipalpis*, tanto abertos quanto fechados, produtos de digestão tripsinolítica de diferentes tipos de proteínas, porém nenhuma resposta de alcalinização foi observada (dados não apresentados). Vale destacar também que os produtos de digestão foram gerados tanto a partir da digestão por tripsina comercial, como pela ação proteolítica do conteúdo intestinal das fêmeas de *L. longipalpis*.

Durante o processo de alimentação de alguns insetos hematófagos, quando estes ainda se encontram sobre os hospedeiros, um evento que chama bastante atenção é a diurese quase

instantânea realizada ainda enquanto o inseto se alimenta. Esse processo tem como uma de suas finalidades, a eliminação de água do bolo alimentar, o que faz com que elementos do sangue ingerido se concentrem no tubo digestivo do inseto (BRIEGEL; REZZONICO, 1985; NIJHOUT; CARROW, 1978; VAUGHAN; NODEN; BEIER, 1991; WILLIAMS; HAGEDORN; BEYENBACH, 1983). Levando em consideração esta última observação e que nossa hipótese inicial havia sido refutada, surgiu então a ideia de que um choque osmótico produzido pela retirada de íons e água do lúmen intestinal poderia ser o estímulo primário responsável pelo disparo do processo de alcalinização intestinal.

Ainda em 2010, Santos demonstrou em experimentos preliminares que a alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com PEG 8.000, uma molécula sintética, não proteica, não tóxica e com peso molecular semelhante ao de proteínas pequenas, de uma maneira não esclarecida, era capaz de induzir o processo de alcalinização em insetos que viessem a ingerir esse composto. À época a molécula foi utilizada para testar uma hipótese onde acreditava-se que a dilatação intestinal durante o processo de alimentação do inseto seria o componente central capaz de disparar os mecanismos de alcalinização e desligar aqueles relacionados com a acidificação. Contudo, apesar de alcalinos, os intestinos dos insetos alimentados com PEG não apresentavam-se dilatados após a alimentação. Um forte indício de que o PEG ingerido havia sido concentrado com a retirada de água. Os experimentos pararam por aí e nada se esclareceu quanto aos estímulos intestinais provocados por PEG que levaram a alcalinização daqueles intestinos.

Portanto, para iniciar os experimentos, agora com foco no processo de concentração do bolo alimentar, escolhemos a molécula de PEG 8.000 como fonte alimentar para as fêmeas de *L. longipalpis*. Essa molécula apresenta uma estrutura simples, com repetições de um mesmo motivo, é de fácil manipulação em soluções, sendo palatável para os insetos (D'SOUZA; SHEGOKAR, 2016). Todas essas características mostravam-se interessantes para inicialmente testarmos a hipótese do choque osmótico entre lúmen e enterócitos como gatilho para o processo de alcalinização intestinal, bem como para investigarmos o porquê de uma molécula não proteica gerar uma resposta esperada apenas para moléculas de origem proteica.

Nossos primeiros resultados corroboraram o achado por Santos, 2008, onde, assim como neste trabalho, ficou demonstrada a capacidade que a molécula de PEG 8.000 tem de disparar o mecanismo de alcalinização intestinal em fêmeas de *L. longipalpis* (**Figura 9**). Inicialmente nossos experimentos foram realizados utilizando uma solução de PEG 8.000 na concentração de 10 mM, a qual foi oferecida ao inseto em solução contendo sacarose 15% e o corante indicador de pH Azul de Bromotimol 0,1%.

Vale destacar que todos esses solutos foram dissolvidos em água destilada e como grupo controle foram utilizadas fêmeas que se alimentaram de solução sem a presença de PEG 8.000. Todos os intestinos retirados das fêmeas que se alimentaram de PEG 8.000 apresentaram-se alcalinos, ao contrário do observado para os intestinos das fêmeas do grupo controle, onde todos apresentaram-se com pH intestinal $\leq 6,0$. Como destacado no início da discussão deste trabalho, a molécula de PEG é sintética, podendo ser encontrada sobre diferentes tamanhos de polimerização, essa versatilidade faz com que essa molécula seja utilizada para os mais variados fins, como por exemplo, para a confecção de resinas de purificação proteica. Até o momento, porém, não existem outros estudos que tenham utilizado tal molécula para fins de elucidação de processos fisiológicos de insetos. Destacamos também que não existem evidências de enzimas intestinais de insetos capazes de digerir em algum grau o polímero formado pela unidade básica de etileno glicol.

Devido ao fato de grande parte dos intestinos das fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com a solução de PEG 8.000 à 10 mM terem atingido um grau de alcalinização intestinal considerado eficiente por nós (mais da metade dos intestinos nas faixas de valores pH $\geq 7,0$), nos perguntamos qual seria a concentração mínima da solução de PEG 8.000 capaz de disparar o mecanismo de alcalinização intestinal das fêmeas de *L. longipalpis*. Diante disso realizamos a alimentação de novas fêmeas, dessa vez com concentrações menores (1 mM e 3 mM), além da já utilizada concentração de 10 mM. Assim como na primeira alimentação, todas as soluções de PEG 8.000 foram preparadas em solução contendo Azul de Bromotimol 0,1% e sacarose 15%, todos dissolvidos em água destilada. Nossos resultados foram animadores (**Figura 10**), uma vez que mostraram que nossa hipótese inicial poderia estar certa. Como esperado, soluções menos concentradas de PEG 8.000, possuem menor capacidade de alcalinização intestinal. Esses resultados mostram que a concentração da solução a partir da qual o inseto se alimenta e

não sua natureza, é o que dita a mudança no seu padrão fisiológico no que diz respeito ao pH intestinal.

Mais uma vez, destacamos aqui o pioneirismo do presente trabalho na utilização da molécula de PEG para a elucidação de mecanismos fisiológicos de insetos hematófagos, mais especificamente, de fêmeas de *L. longipalpis*. Nepomuceno, 2019, mostrou, também em fêmeas de *L. longipalpis*, que a aplicação “*ex vivo*” de solução comercial de aminoácidos, era capaz de induzir o processo de alcalinização intestinal, porém de forma dependente de concentração. As fêmeas só mostram boa eficiência de alcalinização quando foi aplicada solução com alta concentração de aminoácidos (172 mM). Embora a pressão osmótica exercida por moléculas com transportadores ativos no intestino provavelmente seja menor, o contato imediato de uma solução concentrada pode atuar ativando o mecanismo de choque osmótico, isso poderia explicar os achados de Nepomuceno, onde, utilizando técnica mais sensível de detecção, foi possível observar a alcalinização luminal em intestinos estimulados com solução de aminoácidos à 10 mM. Esses achados reforçam ainda mais nossa hipótese de que o gatilho para ativação dos mecanismos envolvidos no processo de alcalinização intestinal é a concentração de moléculas no bolo alimentar do inseto. Essa concentração estaria então relacionada com um desbalanço osmótico entre o lúmen intestinal e citoplasma dos enterócitos.

Até então, todas as alimentações por nós realizadas haviam sido feitas com os solutos sendo dissolvidos em água destilada, uma vez que o epitélio intestinal de insetos (por consequência o de *L. longipalpis*) é repleto de transportadores de íons (os quais variam em quantidade, tipo e expressão), nos perguntamos se a presença de sais na solução a partir da qual as fêmeas se alimentam teria influência no potencial de alcalinização das mesmas. Essa hipótese surgiu levando em consideração que a presença de sais no bolo alimentar do inseto poderia potencializar o efeito osmótico, podendo favorecer algum tipo de transporte.

Nossos resultados mostraram, assim como esperado, que fêmeas de *L. longipalpis* que se alimentaram de soluções contendo sais, apresentam maior eficiência de alcalinização quando comparadas com as fêmeas que se alimentaram das soluções que não continham sais (**Figuras 10 e 11**). Como exemplo do importante papel realizado pelos íons nos processos digestivos, a presença de Na^+ e K^+ na solução de alimentação é extremamente importante para ativação das

bombas Na^+/K^+ -ATPases, as quais são responsáveis pela manutenção da energização da membrana intestinal durante a alimentação com sangue em *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* (Liston, 1901) e *L. longipalpis* (MACVICKER; BILLINGSLEY; DJAMGOZ, 1993; NEPOMUCENO et al., 2022b). Essa energização pode representar um ponto essencial para que movimentos entre lúmen e enterócitos possam ocorrer, bem como pode auxiliar em eventos de cascada intracelular.

A exemplo do que aconteceu para presença de sais na solução de alimentação de fêmeas de *L. longipalpis*, mostramos também que a presença de sacarose na solução a partir da qual as fêmeas se alimentam, tem seu papel na eficiência do processo de alcalinização (**Figura 12**). Fêmeas que se alimentaram somente de solução contendo PEG 8.000 e Azul de Bromotimol, ambos dissolvidos em solução contendo sais, apresentam menor capacidade de alcalinização quando comparadas com as fêmeas que se alimentaram da solução que, além dos produtos anteriormente mencionados, apresentava também sacarose a 15%. Esse resultado pode indicar duas coisas: a primeira é que a solução de sacarose a 15%, de alguma maneira, contribui para o aumento da pressão osmótica luminal, o que por sua vez, favorece o desbalanço osmótico com relação ao citoplasma dos enterócitos, que por consequência, auxilia no disparo dos mecanismos de alcalinização intestinal. Este primeiro cenário seria pouco provável, ou só teria uma importância nos momentos iniciais pós-alimentação, uma vez que a sacarose é prontamente digerida pelas alfa-glicosidases intestinais, resultando no aumento de glicose e frutose, os quais são rapidamente transportados para os enterócitos; em segundo lugar, a presença de sacarose 15% na solução de alimentação das fêmeas pode levar a um favorecimento de eventos intra e extracelulares, uma vez que a digestão de sacarose, aumentando os níveis de glicose e frutose pode funcionar como aporte energético para as células intestinais.

Diante dos resultados até aqui expostos e para confirmar de vez nossa hipótese de que, para que ocorra a ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal não importa a natureza da molécula ingerida, mas a pressão osmótica que a mesma exerce no intestino do inseto, resolvemos realizar alimentações com outros compostos, sendo eles: Dextran, PEG 100.000 e Celobiose. Todos esses compostos foram inicialmente escolhidos devido ao fato de que acreditávamos não existirem enzimas digestivas em *L. longipalpis* capazes de digerir-los, mesmo que em pequeno grau. A digestão dos compostos oferecidos durante a alimentação

poderia ocasionar uma perda na pressão osmótica exercida pelo bolo alimentar. Isto é o que ocorre por exemplo com a sacarose. A digestão das moléculas ingeridas resultaria em uma menor eficiência do processo de alcalinização.

A molécula de Dextran é um polímero de glicose com ligações predominantemente do tipo α -1,6, podendo apresentar ramificações α -1,2, α -1,3 e α -1,4 (PRIYA et al., 2022, 2024). Não existem evidências de que insetos produzam enzimas capazes de degradar moléculas de dextran a partir de suas ligações principais. Os resultados aqui obtidos a partir da alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com Dextran 10.000 à 10 mM, mostraram que, à semelhança do que ocorre para a alimentação com PEG 8.000 à 10 mM, o dextran também é capaz de disparar os mecanismos de alcalinização intestinal. Porém, vale ressaltar que os valores de pH obtidos para as fêmeas que se alimentaram de Dextran, mostraram-se menores quanto diretamente comparados para os resultados obtidos para PEG (nestes últimos a eficiência de alcalinização mostrou-se maior) (**Figuras 11 e 13**). Muito provavelmente essa diferença pode ser explicada pela quebra de ramificações e ligações secundárias nas moléculas de dextran, principalmente as ramificações com ligações do tipo α -1,4, as quais podem ser reconhecidas pelas alfa-glicosidases dos insetos (GONTIJO et al., 1998; TERRA; FERREIRA, 1994; TERRA; FERREIRA; SILVA, 2023).

Ainda interessados em provar que a natureza da molécula não é um fator determinante para o início dos processos de alcalinização intestinal, realizamos a alimentação das fêmeas de *L. longipalpis* com moléculas de PEG 100.000, composto este que se difere de PEG 8.000 apenas pela quantidade de monômeros ligados em uma mesma molécula. Como PEG 100.000 é uma molécula maior, a mesma, em solução, se mostra altamente viscosa, o que fez com fosse inviável a realização de experimentos de alimentação onde pudéssemos utilizá-la na concentração de 10 mM. Com isso os insetos foram alimentados com uma solução daquela molécula à 1 mM, e os resultados obtidos comparados com aqueles referentes a alimentação com PEG 8.000 também a 1 mM. De forma muito interessante, os resultados obtidos para alimentação com PEG 100.000 1 mM foram muito semelhantes aos obtidos para PEG 8.000 1 mM (**Figuras 11 e 14**). Se alguma característica estrutural de PEG fosse parte do estímulo para alcalinização, PEG 100.000 deveria ser tão eficiente quanto PEG 8.000 10 mM uma vez que teriam em suas moléculas quase o mesmo número de segmentos polimerizados. Esse resultado

reforça ainda mais nossa ideia de que a pressão osmótica encontrada no lúmen intestinal é o gatilho para iniciar os processos de alcalinização intestinal.

A celobiose é um dissacarídeo formado por duas unidades de glicose com ligação do tipo β -1,4 (BENTLEY, 1959; HASKINS; HANN; HUDSON, 1942). Inicialmente escolhemos essa molécula porque acreditávamos que as fêmeas de *L. longipalpis* não seriam capazes de digerir-las, contudo tivemos uma surpresa quando analisamos os resultados obtidos para a alimentação com solução de celobiose à 10 mM. Levando em consideração que a molécula não seria digerida e que seria oferecida numa concentração semelhante as alimentações realizadas com PEG 8.000 à 10 mM, achamos que grande parte dos intestinos dissecados se apresentariam alcalinos, contudo a maior parte dos intestinos mostrou baixa capacidade de alcalinização (**Figura 15**). Diante desse resultado buscamos por informações na literatura que pudessem nos indicar o que estaria acontecendo, foi quando nos deparamos com o trabalho de Ferreira e colaboradores, 2018, onde os mesmos encontraram uma pequena atividade de β -glicosídeses no intestino médio de *L. longipalpis*. Essa atividade de β -glicosídeses, mesmo que baixa, pode levar a degradação das moléculas de celobiose oferecidas durante a alimentação, levando a uma queda na pressão osmótica do bolo alimentar, o que por sua vez reduz a capacidade do mesmo em ativar os mecanismos de alcalinização intestinal. Além disso, já ficou demonstrada a presença de transportadores de dissacarídeos no intestino e em outros órgãos de insetos, um exemplo desses transportadores são aqueles relacionados ao transporte de trehalose (HOLTOF et al., 2019; KANAMORI et al., 2010; KIKAWADA et al., 2007). A atuação inespecífica desses transportadores sobre as moléculas de celobiose pode também explicar a baixa capacidade que essa molécula tem em induzir os mecanismos de alcalinização intestinal. A saída de moléculas de celobiose do lúmen para os enterócitos acaba reduzindo a pressão osmótica do bolo alimentar.

Todos os resultados apresentados até aqui corroboram nossa hipótese inicial de que um choque osmótico provocado pela solução de alimentação oferecida às fêmeas de *L. longipalpis* é o principal gatilho para ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal. Num trabalho anterior do nosso grupo (Santos et al. 2008) nós chegamos a descartar a hipótese de que a alcalinização teria relação com a pressão osmótica no interior do lúmen intestinal. Isto se deu porque a concentração molar das proteínas ingeridas era pequena (aproximadamente 3 mM ou

até menor). Nesta época não estávamos considerando o fato depois estabelecido de que estas proteínas eram concentradas no lúmen pelo transporte de água e íons para o interior dos enterócitos. Além disso, soluções de lisozima e caseína (na concentração em que elas foram ingeridas) aplicadas do lado exterior do intestino não produziam alcalinização.

Diante disso, resolvemos testar novamente a capacidade de resposta de intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* à soluções hiperosmóticas, aplicadas externamente aos intestinos. Para isso foram realizadas aplicações das seguintes soluções: Sacarose 2,5 M; PEG 8.000 100 mM; e PEG 8.000 em pó. Chamamos atenção para concentração das soluções aplicadas, bem como para o fato de aplicarmos um soluto puro sobre os intestinos. Nossos resultados mostraram que nenhum dos intestinos testados, para todas as aplicações, apresentou resposta de alcalinização intestinal (**Tabela 1**). Esses resultados vão em acordo com os achados de Santos, 2008, porém os mesmos não são suficientes para descartar a ideia de que o gatilho para que se iniciem os processos de alcalinização intestinal são choques osmóticos, a única conclusão que conseguimos tirar a partir dessas observações, é que os intestinos não são responsivos a uma aplicação/choque osmótico externo em preparações *ex vivo*. Fato é que Santos, 2008, descartou a hipótese de choque osmótico por acreditar que o intestino reconheceria padrões moleculares provenientes de proteínas, contudo nossos resultados mostraram que, independentemente da natureza da molécula utilizada, existe um padrão de resposta de alcalinização com relação a concentração do produto ingerido dentro do lúmen intestinal. Esses resultados nos permitem ainda inferir a existência de um padrão diferente de distribuição de sensores ao longo do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*, os quais, por sua vez, devem encontrar-se dispostos sobre a superfície apical dos enterócitos, reconhecendo então um desbalanço osmótico entre lúmen e o citoplasma dos enterócitos.

Nas células de grande parte dos animais já foi demonstrada a presença dos chamados *Transient receptor potencial* (TRP), os quais respondem a diversos estímulos externos, incluindo estímulos osmóticos (HUANG et al., 2023; LIEDTKE, 2006; ROSENBAUM; ISLAS, 2023). Dentre os diversos tipos de TRPs, chamamos atenção para os TRPVs (*Vanilloid transient receptor potencial*), os quais foram apontados como importantes sensores osmóticos entre os invertebrados (HUANG et al., 2023; LIEDTKE, 2006; MUTAI; HELLER, 2003). Não sabemos ao certo se ocorre a participação de tais transportadores na ativação osmótica dos

mecanismos de alcalinização intestinal, porém futuros experimentos que visem elucidar essa participação mostram-se extremamente promissores.

Quando oferecemos aos insetos uma solução de alimentação rica em um composto que não pode ser digerido ou metabolizado, faz sentido a concentração desse composto permaneça minimamente constante no tubo digestivo ou até aumente com a retirada de água do lúmen. Porém quando as fêmeas se alimentam, por exemplo, do sangue de seus hospedeiros, para que o bolo alimentar atinja uma dada concentração capaz de disparar os mecanismos de alcalinização intestinal, é de se esperar que haja um processo de eliminação de água. Já é muito bem descrito entre os insetos hematófagos o processo de diurese, que acontece ainda quando o inseto está se alimentando (BRIEGEL; REZZONICO, 1985; COAST, 2009; DRAKE; RODRIGUEZ; HANSEN, 2015a; NIJHOUT; CARROW, 1978). Esse processo tem por finalidade inicial promover a eliminação de água do bolo alimentar, elevando a contração de elementos figurados do sangue no tubo digestivo do inseto (BRIEGEL; REZZONICO, 1985; VAUGHAN; NODEN; BEIER, 1991). Essa eliminação de água acontece majoritariamente pela participação de transportadores conhecidos como aquaporinas (BENOIT et al., 2014; SPRING; ROBICHAUX; HAMLIN, 2009). Algo que até então não havia sido discutido é que essa eliminação de água poderia favorecer outros processos fisiológicos dos insetos, não estando relacionada somente com uma questão de melhora nutricional. Neste trabalho a eliminação de água do bolo alimentar pela ação das aquaporinas casa perfeitamente com a ideia de uma elevação do potencial osmótico luminal ao longo do processo de alimentação e digestão, induzindo assim o disparo que leva ao início dos processos de alcalinização intestinal. Realizando a alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com um inibidor de aquaporinas, mostramos que o bloqueio na ação desses transportadores afeta de forma clara a capacidade das fêmeas em atingir uma alcalinização intestinal eficiente (**Figura 16**). Ressaltamos aqui que o inibidor por nós utilizado (Bumetanide) não é um inibidor específico de aquaporinas, o mesmo atua no bloqueio de transportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (HAAS; MCMANUS, 1983; ISENRIK; FORBUSH, 1997). Contudo, alguns trabalhos apontam que o bloqueio de aquaporinas por esse inibidor, aumenta à medida em que aumentamos a concentração do mesmo (ressaltamos que usamos uma concentração considerada eficiente no bloqueio de aquaporinas) (MIGLIATI et al., 2009; WANG; SOLENOV; YANG, 2023). Vale destacar também que o bloqueio dos

transportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ podem ter ajudado a diminuir a concentração osmótica do bolo alimentar, uma vez que a retenção de íons pode refletir numa retenção de água no conteúdo intestinal, portanto desfavorecendo o desbalanço osmótico. Fêmeas que se alimentaram de soluções nas mesmas concentrações, tendo como única variável a presença do inibidor de aquaporinas, mostraram respostas completamente diferentes quanto a capacidade de alcalinização, reforçando a participação do transporte de água no processo de alcalinização.

Esse é mais um resultado que reforça ainda mais a ideia inicial de que os mecanismos de alcalinização intestinal apresentam dependência com relação a um desbalanço osmótico luminal para que possam ocorrer.

No início da discussão deste trabalho, retomamos os principais mecanismos de alcalinização intestinal até então descritos (NEPOMUCENO, 2015; NEPOMUCENO et al., 2017a, 2020, 2022b, 2022a; SAAB, 2023; SANTOS et al., 2008, 2011). Dentre aqueles, o que sempre chamou muito a atenção do nosso grupo de pesquisa é aquele envolvido com a liberação de uma molécula na hemolinfa de fêmeas que acabaram de se alimentar de sangue, esse mecanismo foi primeiramente descrito em fêmeas de *L. longipalpis*, sendo posteriormente discutido e demonstrado também em fêmeas de *A. aegypti* (NEPOMUCENO, 2015; SANTOS et al., 2008, 2011). Trabalhando com fêmeas de *L. longipalpis* Santos, 2008, demonstrou por meio de uma metodologia de extração de peptídeos que essa molécula alcalinizante já está presente nas células intestinais de fêmeas que ainda não se alimentaram de sangue, o que, à época, fez com que pensassem que essa molécula poderia ter origem hormonal, sendo armazenada em células enteroendócrinas, sendo liberada por meio de vesículas após um estímulo, no caso, a alimentação com sangue. É interessante ressaltar ainda que essa molécula recuperada da hemolinfa de fêmeas recém alimentadas com sangue mostrou-se extremamente conservada em suas funções, uma vez que, a aplicação dessa molécula recuperada de fêmeas de *L. longipalpis* mostrou efeito positivo de alcalinização sobre intestinos de fêmeas de *A. aegypti* e sobre o intestino de fêmeas de *Clogmia albipunctata* (Williston, 1893), um díptero não hematófago pertencente à família Psychodidae (MALTA et al., 2024a; NEPOMUCENO et al., 2017a).

Dada a capacidade da alimentação com PEG 8.000 de disparar os mecanismos de alcalinização, nos perguntamos então se, após a alimentação com PEG 8.000, encontraríamos na hemolinfa das fêmeas recém alimentadas, a mesma molécula com efeito alcalinizante recuperada da hemolinfa das fêmeas que se alimentaram de sangue. Contudo nossos resultados mostraram que a hemolinfa das fêmeas alimentadas com PEG 8.000 não apresenta capacidade de alcalinizar outros intestinos ácidos (**Figura 17**), portanto essas fêmeas não liberam na sua hemolinfa a chamada molécula alcalinizante. Esse resultado, contudo, nos permitiu inferir que, os mecanismos de alcalinização intestinal disparados pelo desbalanço osmótico entre lúmen e enterócitos segue, pelo menos nas fases iniciais, um caminho diferente daquele até então descrito para ação de moléculas liberadas na hemolinfa do inseto, as quais são liberadas a partir da degranulação das células enteroendócrinas. Ao que tudo indica, o desbalnço osmótico não é capaz de estimular essa degranulação.

Esse último resultado nos mostra que, para que uma fêmea saudável de *L. longipalpis*, após um repasto sanguíneo satisfatório, atinja seu ponto máximo de alcalinização (pH = 8,15), é necessário que ocorra um somatório de fatores relacionados a processos de alcalinização, os quais podem ser parcial ou totalmente independentes entre si, mas que apresentam uma mesma finalidade, a elevação do pH intestinal. Os três mecanismos anteriormente descritos por Santos e Nepomuceno, podem agora somar-se a um quarto, aqui descrito como mecanismo de concentração osmótica.

Durante o processo de alimentação com sangue uma fêmeas de *L. longipalpis* pode aumentar de três a dez vezes o seu peso corporal (GRAÇA-SOUZA et al., 2006). A distensão da região abdominal durante o processo de alimentação com sangue, representa um aumento no volume total do intestino médio do inseto, local de digestão do sangue ingerido (GENEROSO, 2022; TERRA; FERREIRA, 1994). Diante dos fatos anteriormente expostos, nos perguntamos se essa expansão do intestino médio das fêmeas de *L. longipalpis* durante o processo de alimentação com sangue, poderia de alguma maneira auxiliar nos processos de alcalinização intestinal. Vale destacar que Santos, 2008, buscou responder a esse questionamento através da alimentação das fêmeas com PEG 8.000, contudo, ficou demonstrado que as fêmeas que se alimentavam de PEG não apresentavam aumento significativo do seu volume intestinal, apesar de apresentarem resposta de alcalinização. Como

mentionado anteriormente, Santos e colaboradores não se debruçaram sobre o porquê de a molécula de PEG, mesmo não distendendo o intestino, ocasionar uma reposta de alcalinização (o que agora, com os resultados aqui apresentados, conseguimos entender). Além disso, como não houve a distensão do intestino das fêmeas, não ficou descartada a hipótese de que esse aumento de volume poderia de alguma forma auxiliar na elevação do pH intestinal.

Aqui nós realizamos dois tipos de estímulos mecânicos relacionados à distensão abdominal das fêmeas de *L. longipalpis*: o primeiro deles foi um estiramento mecânico dos intestinos. Não houve diferença significativa entre grupo controle e grupo teste (**Figura 18**); o segundo estímulo foi a distensão intestinal direta a partir da alimentação com microesferas de látex. Também não observamos diferença significativa entre o grupo controle e o grupo de fêmeas alimentadas com a microesferas (**Figura 19**). Agora com esses resultados em mãos podemos afirmar que a distensão do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*, apesar de importante para o aumento da quantidade de nutrientes ingeridos em uma só alimentação (ADAMS, 1999; LEHANE, 2009), não tem participação direta na ativação dos processos de alcalinização intestinal. Contudo, vale ressaltar que, uma alimentação com grande volume de sangue, pode representar, após a diurese do inseto, uma maior pressão osmótica luminal, o que então teria papel fundamental no disparo dos mecanismos de alcalinização.

Levando em consideração o volume de sangue que os insetos hematófagos são capazes de ingerir, e que grande parte desse sangue é composto por proteínas, é de se esperar que, iniciado o processo de digestão, os níveis de aminoácidos livres venham a aumentar, tanto no lúmen intestinal, quando nos enterócitos, como também na hemolinfa do inseto (CAROCI; NORIEGA, 2003; TERRA; FERREIRA, 1994). A presença de aminoácidos tanto no lúmen intestinal como na hemolinfa já foi apontada como um fator determinante para o aumento da atividade proteolítica de insetos hematófagos, como, por exemplo, *A. aegypti* (BRANDON et al., 2008; CAROCI; NORIEGA, 2003; SANTOS et al., 2011).

Como as moléculas alcalinizantes presentes na hemolinfa de *L. longipalpis* são encontradas livres justamente em fêmeas que acabaram de se alimentar de sangue (SANTOS et al., 2008, 2011), nos questionamos se não seriam esses aminoácidos moléculas adjuvantes no processo de ativação dos mecanismos de alcalinização intestinal. Para verificar essa hipótese,

realizamos ensaios onde foram coletadas amostras de hemolinfa de fêmeas que haviam se alimentado somente de sacarose 15%, de fêmeas com período máximo de 2 horas após alimentação com sangue, e de fêmeas que haviam se alimentado de sangue a no mínimo 24 horas. Nossos resultados apontaram que uma diferença significativa nos níveis de aminoácidos livres na hemolinfa só é detectada na hemolinfa daquelas fêmeas com período pós-alimentação com sangue de 24 horas (**Figura 20**).

Diante do fato de não existir diferença significativa nos níveis de aminoácidos livres presentes na hemolinfa de fêmeas que se alimentaram de sacarose (sem a molécula alcalinizante livre) e entre as fêmeas recém alimentadas com sangue (que possuem a molécula alcalinizante livre), nós descartamos a hipótese de que os aminoácidos livres poderiam ser uma molécula adjuvante no processo de alcalinização estimulada pela hemolinfa coletada de fêmeas ingurgitadas com sangue. Destacamos aqui que os valores obtidos para a concentração de aminoácidos reflete a concentração que nossa técnica nos permite detectar, podendo a concentração desse aminoácidos na hemolinfa dos insetos apresentar-se maior (parte dos aminoácidos podem ser perdidos no processo de obtenção da hemolinfa).

Como todos os nossos resultados pareciam indicar que, provavelmente a molécula liberada na hemolinfa das fêmeas recém alimentadas com sangue e que tem papel na ativação dos processos de alcalinização intestinal, não tem sua origem relacionada com o processo de alimentação/digestão em si, voltamos a pensar que eram grandes as chances dessa molécula ter uma origem hormonal. Já é sabido que o influxo de Ca^{+2} é um dos mecanismos envolvidos na degradação vesicular de diferentes linhagens celulares (CHEN et al., 2017; SUDHOF, 2012; TOJYO et al., 2014), dentre esses tipos celulares, podemos citar as células endócrinas, onde o influxo culmina com a liberação desses hormônios na circulação do organismo, permitindo que realizem sua função.

Diante disso resolvemos realizar um ensaio onde intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas somente com sacarose 15% (portanto com a molécula alcalinizante ainda presente nas células intestinais), foram estimulados com ionóforo de cálcio. Nossos resultados mostraram que, assim como esperado, a entrada de cálcio nas células intestinais foi capaz de deflagrar a liberação de vesículas que continham a molécula alcalinizante (**Figuras 21, 22 e**

23). Esse resultado nos permitiu mostrar e confirmar a origem hormonal da molécula alcalinizante que, até o momento, não fazíamos ideia do que se tratava.

Dentre os principais hormônios envolvidos na sinalização celular de invertebrados, dois ganham grande destaque: os peptídeos semelhantes à insulina (ILPs) e a serotonina que é liberada durante o repasto sanguíneo (COAST, 2007; KRIEGER et al., 2004; ORCHARD, 2006; WU; BROWN, 2006). Ambos os hormônios apresentam funções das mais diversas, atuando como neurotransmissores, estimuladores de processos anabólicos, bem como participando da síntese e liberação de outros hormônios. Por se tratarem de moléculas tão bem conservadas entre diferentes grupos animais (ORCHARD, 2006; SMIT, 1998; WU; BROWN, 2006), e por apresentarem tão ampla gama funcional, nos perguntamos se nossa molécula alcalinizante poderia ser algum desses hormônios.

Com destaque para os ILPs, destacamos que entre as fêmeas de mosquitos existe uma ativação da via de sinalização relacionada a insulina logo após a alimentação com sangue. A ativação dessa via leva a uma cascata de eventos que culmina com a absorção de nutrientes, a produção de hormônios ecdisteróides e a produção de vitelogenina (ARIK et al., 2009; BROWN et al., 1998, 2008; GULIA-NUSS et al., 2011; ROY; HANSEN; RAIKHEL, 2007; SIM; DENLINGER, 2008; WEN et al., 2010). Como os ILPs tem relação direta com o metabolismo de digestão entre os insetos hematófagos (BROWN et al., 2008), eles se tornaram ótimos candidatos a serem a nossa molécula alcalinizante.

Os eventos fisiológicos coordenados pela serotonina (5-hidroxitriptamina) são muito bem estudados principalmente entre os Hemiptera (ORCHARD, 2006), porém existem estudos que mostram a atuação dessa molécula também em outros invertebrados (LENT; DICKINSON; MARSHALL, 1989; LONG; MURDOCK, 1983; NASSEL, 1988). Entre os hemíptera essa molécula já foi apontada como sendo efetora em processos como, indução de plasticização, neuro-comunicação, diurese, aumento da expressão de aquaporinas (ORCHARD, 2006) dentre tantos outros, sendo que para nós, a participação nos dois últimos processos, mostrou que a serotonina poderia ter relação com nossa molécula alcalinizante, uma vez que, como demonstrado na **figura 16**, a inibição de aquaporinas inibe em certo nível a capacidade de alcalinização das fêmeas de *L. longipalpis*.

Com essas informações em mãos, realizamos ensaios onde, sobre intestinos ácidos de fêmeas de *L. longipalpis*, aplicamos tanto serotonina, como insulina bovina (**item 4.10 da metodologia**) (ambas as moléculas são extremamente conservadas entre os metazoários). Destacamos que a insulina bovina já foi utilizada em ensaios com mosquitos (WEN et al., 2010). Nossos resultados mostraram que somente a aplicação de insulina foi capaz de induzir o processo de alcalinização intestinal (**Figuras 24, 25 e 26**). Vale ressaltar que os valores de pH atingidos pelos intestinos estimulados com a aplicação de insulina, foram semelhantes aos valores de pH atingidos quando realizamos os ensaios de aplicação da hemolinfa das fêmeas recém alimentadas com sangue. Esse resultado nos mostrou que provavelmente a molécula alcalinizante já identificada como hormônio, poderia se tratar de um ILP presente no intestino médio das fêmeas de *L. longipalpis*.

Apesar de nossos resultados mostrarem que a serotonina não apresentou potencial de disparar a alcalinização intestinal, acreditamos que a mesma pode atuar como um adjuvante do processo de elevação do pH quando em conjunto com a insulina. Ensaios futuros poderão nos dar essa resposta.

A insulina humana é um peptídeo hormonal de 51 aminoácidos após o processamento de suas duas cadeias, atingindo um peso molecular de aproximadamente 5.794 Da (THOMAS; THEVIS, 2019; PubChem CID 70678557). De maneira semelhante, a insulina bovina, após o processamento de suas cadeias, possui peso molecular de aproximadamente 5.734 Da (PubChem CID 90478612). Com esses dados em mãos, e tendo em vista a ausência de dados referentes aos tamanhos de ILPs processados de invertebrados, nos propusemos a identificar, por meio de espectrometria de massa, o tamanho da molécula alcalinizante liberada na hemolinfa das fêmeas de *L. longipalpis* recém alimentadas com sangue, para isso realizamos experimento conforme descrito no **item 4.15 da metodologia** deste trabalho.

Nossos resultados foram animadores, uma vez que, quando comparadas as análises de grupo controle e grupo teste (**Figura 27**), fica claro haver entre os dados do grupo teste a presença de dois peptídeos não encontrados entre o grupo controle (**Figura 28**). Curiosamente, a massa/carga (m/z) desses peptídeos (4.845 Da e 4.998 Da) se mostra semelhante a massa da insulina humana ou de bovinos. A diferença de valores encontradas pode refletir a perda de

alguns aminoácidos pelas moléculas encontradas nas fêmeas de *L. longipalpis*. A fim de mostrar de maneira mais sistemática essa observação, por meio de análises de bioinformática, propusemos o que seria uma ILP de *L. longipalpis* semelhante a insulina humana no que diz respeito ao tamanho e processamento de suas cadeias (**Figura 41**).

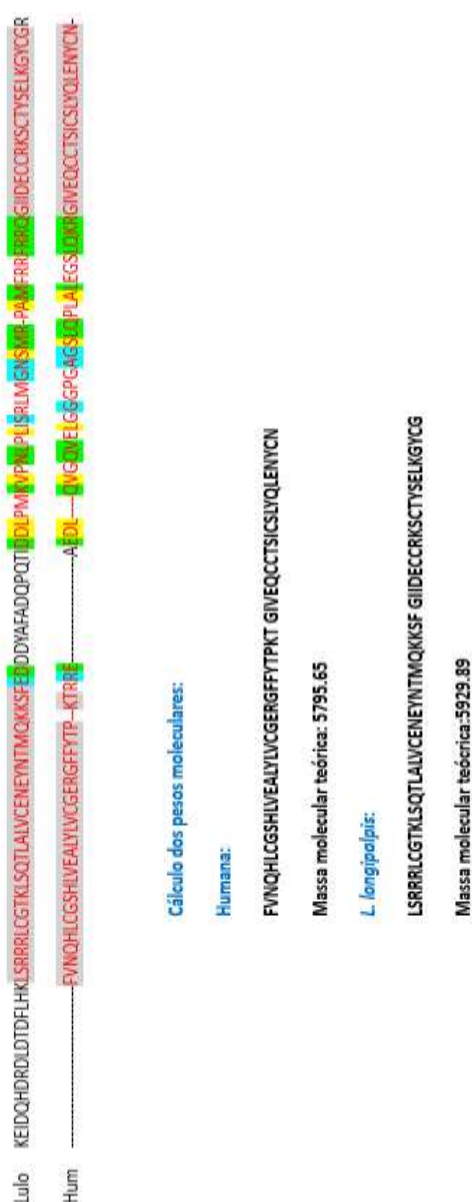


Figura 41 – Análise das prováveis cadeias A e B do ILP de *L. longipalpis*. Determinação das prováveis cadeias A e B da ILP de *L. longipalpis* com base na homologia com as cadeias A e B da

insulina humana. As sequências das cadeias A e B de humano foram obtidas a partir dos dados disponíveis no bando de dados PubChem (nº de acesso 70678557). As análises de similaridade/alinhamento sofram realizados no software <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>, e os pesos moleculares foram calculados no software https://web.expasy.org/compute_pi/.

Considerando os dados obtidos na espectrometria de massa e os dados obtidos para o provável tamanho do ILP de *L. longipalpis*, muito provavelmente a diferença entre as massas observadas reflete a perda de alguns aminoácidos na ILP real com relação a ILP predita. Além disso, essa diferença pode, em parte, refletir pequenos desvios de calibragem do equipamento.

Aqui, de maneira inovadora, mesmo que de forma teórica, propusemos e identificamos quais seriam as sequências de aminoácidos das cadeias A e B de um ILP de *L. longipalpis*. Além disso, a somatória dos resultados apresentados nos levam a afirmar que a molécula alcalinizadora primeiramente identificada por Santos, 2008 pode ser um ILP (*Insulin-like peptide*), o qual tem ação direta sobre os mecanismos de alcalinização intestinal.

Como destacado na introdução deste trabalho, entre os insetos pertencentes a ordem Diptera, os ILPs são muito bem conhecidos principalmente em *D. melanogaster*, onde são produzidos por sete genes bem caracterizados, com suas expressões variando conforme o tecido e o estágio de desenvolvimento do inseto (BROGIOLO et al., 2001). Sete foram os genes de ILPs encontrados em *A. gambiae* (KRIEGER et al., 2004), e oito os encontrados em *A. aegypti* (RIEHLE et al., 2006), dos quais acredita-se que os ILP3 e ILP4 sejam aqueles que participam diretamente da ativação das vias de sinalização relacionadas com a digestão do inseto. Ambos os peptídeos tem sua quantidade aumentada na hemolinfa momentos após a alimentação com sangue (BROWN et al., 2008; CASTILLO; BROWN; STRAND, 2011).

Apesar de bem estudados em organismos como *D. melanogaster* e em alguns mosquitos, os ILPs são pouco conhecidos e estudadas em flebotomíneos. Da mesma forma, isso é verdade quando procuramos por dados da literatura referentes aos ILRs (*Insulin-like receptors*), que são os receptores responsáveis pelo reconhecimento dos ILPs, participando da cascata de ativação da via fosfoinositol-3-quinase/AKT. Devido à escassez de informação com relação aos ILPs e

ILRs de *L. longipalpis*, buscamos caracterizá-los nas fêmeas destes organismos através da busca de sequências ortólogas com relação a *D. melanogaster* (CHOPRA; KAUSHIK; KAIN, 2022; TELEMANN, 2010; VEENSTRA; AGRICOLA; SELLAMI, 2008; WU; BROWN, 2006) (**item 4.11 da metodologia**).

Uma vez identificadas as sequências, realizamos uma série de experimentos onde ficou demonstrada de forma inédita, a presença no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* tanto do gene relacionado ao ILP como do gene relacionado ao ILR. Como apontado em mosquitos, há um aumento na expressão de ILPs nesses insetos logo após a alimentação com sangue (BURSALI; TOURAY, 2024), dessa forma realizamos ensaios onde comparamos a expressão tanto qualitativa como quantitativa dos genes relacionados aos ILPs e aos ILRs em fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas ou não alimentadas com sangue (**Figuras 29 e 30**).

Nossos resultados mostraram que há expressão tanto de ILPs como de ILRs no intestino médio dos dois grupos de fêmeas analisadas (alimentadas e não alimentadas com sangue).

Como todo hormônio peptídico, provavelmente os ILPs de *L. longipalpis* são produzidos e armazenados em vesículas intracelulares até que sua degranulação seja ativada, dessa forma, apesar de identificarmos por meio de PCR convencional a expressão do seu gene no intestino médio tanto das fêmeas que se alimentaram de sangue, como das fêmeas que não se alimentaram de sangue, não esperávamos encontrar diferença com relação a expressão quantitativa desse gene em fêmeas submetidas aos tratamentos anteriormente citados, isso porque, no intestino médio, a insulina já deve encontrar-se pronta para realizar sua função assim que o inseto se alimenta de sangue, sendo os níveis de mRNA aumentados somente quando a fêmea se prepara para uma nova alimentação. Durante o processo de digestão, outros ILPs produzidos em órgãos diferentes do intestino médio, devem atuar para manutenção do pH intestinal alcalino. Contudo, com relação ao gene dos ILRs, era de se esperar que em fêmeas alimentadas com sangue, a expressão desses receptores fosse aumentada, uma vez que estas mesmas fêmeas deveriam se tornar mais sensíveis e responsivas aos ILPs liberados na hemolinfa dos insetos.

Nossos resultados mostraram que, apesar de ocorrer um aumento na expressão desse gene entre as fêmeas que se alimentaram de sangue, o mesmo não é significativo se comparada

a expressão do gene nas fêmeas que não se alimentaram de sangue. Por se tratar de uma sinalização hormonal, a resposta e sensibilidade das fêmeas com relação aos ILPs liberados na hemolinfa do inseto, deve ser rápida, dessa forma não é de se espantar que os ILRs se encontrem em quantidade suficiente nas células intestinais dos insetos, prontos para responder a um estímulo imediato.

Uma vez demonstrado que um dos gatilhos para a alcalinização intestinal em fêmeas de *L. longipalpis* é um desbalanço osmótico entre lúmen e enterócitos, e que, apesar de começarem por efetores diferentes, a liberação de ILPs na hemolinfa do inseto também é capaz de disparar a alcalinização intestinal, nos perguntamos quais seriam os mecanismos de sinalização intracelular envolvidos no processo de elevação do pH.

Apesar de sabermos que o influxo de cálcio nas células enteroendócrinas é o responsável pela liberação dos ILPs, ainda não ficou claro para nós, qual é o efector natural durante a alimentação com sangue que faz com que aquelas células degranulem.

Com relação aos próximos passos após a ativação dos IRPs dos enterócitos, acreditamos que a ativação da via fosfoinositol-3-quinase/AKT, leva a uma ativação da via TOR, que em mosquitos e em *L. longipalpis* já foi apontada como tendo participação em vários processos digestivos (CARPENTER et al., 2012; HANSEN et al., 2004; SILVA FERNANDES et al., 2020). Nepomuceno, 2021 mostrou que, o tratamento de intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* com rapamicina, era capaz de torna-los insensíveis aos ILPs (os quais ainda não haviam sido identificados).

Com isso, nosso próximo passo foi mostrar que, assim como acontece com os ILPs, o gatilho osmótico de alcalinização intestinal também passa pela ativação da via TOR. Nossos resultados mostraram que a alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* com solução contendo PEG 8.000 e Rapamicina foi capaz de inibir totalmente o processo de alcalinização intestinal (**Figura 33**). Esse resultado vai em acordo ao encontrado por Nepomuceno e colaboradores 2020, 2021, onde ficou demonstrada a capacidade de aminoácidos em ativar a via TOR. Esse resultado nos permite afirmar que um dos primeiros passos após o reconhecimento de um desbalanço osmótico pelo intestino, é a ativação do complexo de TOR.

Nepomuceno e colaboradores, 2022, mostraram ainda que, para fêmeas de *L. longipalpis* que tiveram seus intestinos estimulados com aminoácidos, os próximos passos após a ativação da via TOR, é a ativação da enzima adenilato ciclase, responsável pela produção de cAMP, um importante segundo mensageiro, que por sua vez atua ativando os transportadores $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, os quais, localizados na superfície apical do intestino médio, atuam jogando HCO_3^- para o lúmen intestinal em troca de íons cloreto, resultando assim no processo de alcalinização (NEPOMUCENO et al., 2022a).

Diante disso buscamos mostrar de forma sistemática que, apesar de se iniciarem de forma diferente, tanto o gatilho da entrada de aminoácidos nos enterócitos, como o desbalanço osmótico entre lúmen e enterócitos, seguem um mesmo caminho de sinalização intracelular, culminando com a alcalinização do intestino. Dessa forma, primeiramente realizamos ensaios de alimentação de fêmeas de *L. longipalpis* onde aos insetos foram oferecidos diferentes inibidores para o transportador de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (a saber, NPPB e DIDS).

Assim como encontrado por Nepomuceno, nossos resultados mostraram que a inibição dos transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ afeta de forma significativa o processo de alcalinização intestinal, contudo, vale destacar que, apesar de mostrar baixa eficiência no processo de alcalinização, os intestinos não se encontravam totalmente ácidos, o que é um indicativo de que outros processos relevantes à alcalinização permaneceram ativos ou mesmo que a inibição pelas moléculas por nós escolhidas não foi completa.

Seguindo os passos de alcalinização propostos por Nepomuceno, o próximo passo a ser investigado seria a participação de cAMP no processo de alcalinização induzida pelo desbalanço osmótico, porém como a ativação de transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ costuma ser dependente de fosforilação por PKA (BRETT et al., 2002), decidimos verificar a ocorrência deste passo na via de sinalização que leva à alcalinização intestinal. Para isso realizamos a alimentação de fêmeas com PEG 8.000 acrescido de um inibidor de PKA (H89) (**item 4.9 da metodologia**). Nossos resultados mostraram a participação de PKA no processo de alcalinização intestinal de *L. longipalpis* (**Tabela 3**).

Vale destacar que PKA, a enzima responsável pela fosforilação dos transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, é também conhecida como “*cAMP-dependent protein kinase*” (BRETT et al., 2002),

o que mostra que a mesma é regulada pela presença de cAMP no citoplasma celular. Diante disso e levando em consideração que Nepomuceno já havia demonstrado a importância de cAMP no processo de alcalinização disparado pela entrada de aminoácidos nas células, realizamos ensaio onde buscamos reverter a inibição da alcalinização intestinal ocasionada pela alimentação com rapamicina. A reversão do bloqueio foi pensada através de uma alimentação onde juntamente com rapamicina, foi oferecida suplementação de um análogo permeável e comercial de cAMP (**item 4.9 da metodologia**). Desse modo a reversão não seria direta, partindo de uma reativação de TOR, mas por um “pulo” ao bloqueio, passando a etapas posteriores a ativação de TOR.

Nossos resultados mostraram exatamente o que esperávamos, apontando a localização “*downstream*” de cAMP com relação a TOR no processo de alcalinização intestinal de *L. longipalpis* disparado pelo desbalanço osmótico (**Figura 38**). A caráter de confirmação com relação a importância e participação de cAMP nesse processo de alcalinização, realizamos um segundo ensaio onde a atividade da adenilato ciclase (enzima responsável pela produção de cAMP), foi bloqueada pelo inibidor DDA. Os insetos alimentados com esse inibidor (**item 4.9 da metodologia**), apresentaram-se significativamente menos eficientes em realizar a alcalinização intestinal (**Tabela 4**). Esses resultados somados aos já encontrados por Nepomuceno, reforçam os processos intracelulares envolvidos com a alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*.

Uma vez determinados os principais passos intracelulares envolvidos no processo de alcalinização intestinal disparado através de um desbalanço osmótico em fêmeas de *L. longipalpis*, decidimos reforçar experimentalmente o passo que diz respeito a participação da via TOR no processo. Em fêmeas de *L. longipalpis* ficou demonstrado que tratamento desses insetos com galactosamina, uma hexosamina derivada da galactose, reduz a atividade de tripsina de fêmeas alimentadas com sangue de maneira semelhante à rapamicina (SILVA FERNANDES et al., 2020). Portanto, levando em consideração o bloqueio da via TOR realizado pela alimentação com galactosamina, realizamos alimentação onde juntamente com PEG 8.000, oferecemos solução de galatosamina (**item 4.9 da metodologia**). De maneira semelhante aos achados de Silva Fernandes e colaboradores, 2020, nossos resultados mostraram, através do bloqueio do processo de alcalinização intestinal, que a galactosamina

afeta o funcionamento da via TOR atuando como um inibidor competitivo no sítio de ligação de aminoácidos, e que TOR definitivamente participa do processo de alcalinização intestinal (**Tabela 5**).

Por fim, mas de maneira não menos importante, nos propusemos a demonstrar de alguma forma a ligação entre o processo de alcalinização intestinal e o processo de digestão em si nas fêmeas de *L. longipalpis*. Como TOR atua diretamente na síntese de enzimas digestivas (DE VIRGILIO; LOEWITH, 2006b; FINGAR; BLENIS, 2004; LOEWITH et al., 2002; SILVA FERNANDES et al., 2020; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006) e como nossos resultados indicam que o desbalanço osmótico que leva à alcalinização intestinal passa pela ativação de TOR, nos perguntamos se a alimentação das fêmeas de *L. longipalpis* com PEG 8.000, seria capaz de induzir em certo grau a atividade tripsinolítica daquelas fêmeas. Nossos resultados mostraram que, de forma significativa, há um aumento na atividade tripsinolítica nos intestinos das fêmeas que se alimentam com PEG 8.000 (**Figura 39**), mostrando-se assim mais uma evidência da intercomunicação entre os processos de alcalinização intestinal, digestão e ativação da via TOR.

Analisados em conjunto, todos os resultados apresentados neste trabalho trazem fortes evidências de descobertas inéditas com relação ao processo de alcalinização intestinal em fêmeas de *L. longipalpis*. Aqui demonstramos de maneira sistemática a existência de um novo processo de alcalinização intestinal, o qual tem por gatilho um desbalanço osmótico entre lúmen intestinal e enterócitos. Ficou claro também que esse processo leva à ativação da via TOR, resultado em uma cascata de sinalização celular que culmina com a ativação de transportadores de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, os quais são aqui apontados como grande efetores da elevação do pH intestinal (aqui vale ressaltar que ao que tudo indica, mas de maneira ainda não esclarecida, podem existir outros transportadores que potencializem o processo de alcalinização). Além disso, mostramos que a ativação do processo de alcalinização intestinal disparado a partir de um desbalanço osmótico não resulta na liberação de uma ou mais moléculas alcalinizadoras na hemolinfa dos insetos. E pela primeira vez trouxemos evidências claras de que a molécula liberada na hemolinfa de fêmeas recém alimentadas com sangue é um ILP, o qual pode ser reconhecido por ILRs do intestino médio daquelas fêmeas, desencadeando uma cascata de sinalização celular

que converge em direção a via TOR, potencializando assim o processo de alcalinização intestinal.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho buscamos entender e elucidar alguns passos dos mecanismos de alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis*, os resultados aqui obtidos nos permitiram obter duas grandes conclusões, sendo elas: que um dos mecanismos envolvidos no início do processo de alcalinização intestinal não tem relação com a natureza da molécula ingerida pelo inseto, mas sim com o potencial osmótico que a mesma atinge no interior do intestino médio (mostrando dependência com relação a sais, por exemplo). Contribuindo com este mecanismos, ficou demonstrada a participação das aquaporinas no processo que denominamos concentração do bolo alimentar, onde ocorre a retirada de água do lúmen em direção ao citoplasma dos enterócitos, o que eleva ainda mais o potencial osmótico do conteúdo intestinal. Essa diferença de potencial osmótico entre lúmen e enterócitos leva a uma ativação da via TOR, levando, por fim, à ativação de transportadores $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, elevando o pH do lúmen intestinal; e, por fim, que a molécula alcalinizadora liberada na hemolinfa de fêmeas recém alimentadas com sangue tem características de peso e resposta semelhante as insulinas e aos ILPs, nos fazendo acreditar que tal molécula é um ILP ainda não caracterizado de *L. longipalpis*. Além disso, podemos concluir que o mecanismo de alcalinização intestinal disparado pelo desbalanço osmótico não provoca a degranulação de células enteroendócrinas, nas quais encontramos as moléculas alcalinizadoras. Isso mostra que, apesar de levarem a um mesmo propósito (a elevação do pH intestinal), o desbalanço osmótico e a ativação dos enterócitos pelos ILPs, apresentam etapas iniciais diferentes entre si.

PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios para determinar quais são os transportadores ou receptores envolvidos com o reconhecimento do desbalanço osmótico entre lúmen e enterócitos do intestino médio das fêmeas de *L. longipalpis*. Uma de nossas hipóteses é que transportadores do tipo TRP-V possam atuar nesse processo.
- Determinar o papel de outros transportadores de íons no processo de alcalinização intestinal, como por exemplo, o papel dos transportadores de Na⁺/K⁺. O papel Na⁺/K⁺-ATPase na manutenção de um potencial energético de membrana já foi demonstrado nas fêmeas de *L. longipalpis*, porém a alta disponibilidade desses íons durante a digestão do sangue nos faz acreditar que os mesmos podem atuar de outras maneiras resultando numa potencialização da alcalinização intestinal.
- Realizar análises MS/MS daqueles peptídeos recuperados de intestinos estimulados com ionóforo de cálcio e que apresentam massa/carga semelhante às insulinas, permitindo assim a confirmação quanto a identidade dos mesmos.
- Realizar ensaios de alimentação com soluções hiperosmóticas de sacarose, a fim de determinar se essa alimentação de alguma forma atrapalharia o processo de manutenção de pH ácido das fêmeas de *L. longipalpis*.
- Aminoácidos diferentes interagem de forma diferente com transportadores do intestino médio, ativando diferentes mecanismos de alcalinização intestinal, diante disso gostaríamos de realizar ensaios que nos permitam entender e elucidar os mecanismos de alcalinização intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* com relação aos aminoácidos de forma individual.
- Realizar ensaios com machos de *L. longipalpis*, elucidando os mecanismos de alcalinização intestinal nesses organismos, o que nos permitirá fazer inferências evolutivas com relação aos mecanismos de alcalinização intestinal. Esses experimentos poderão também ser realizados em insetos não hematófagos (*C. albipunctata*), o que aumentaria o potencial comparativo dos resultados de pH intestinal, elevando a discussão a um nível de adaptações à hematofagia dentro de Psychodidae, por exemplo.

- Realizar ensaios que nos permitam entender o processo de acidificação/re-acidificação do intestino médio de *L. longipalpis*..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, R. T.; WIEDERRECHT, GJ. Immunopharmacology of rapamycin. **Annu Rev Immunol**, [S. l.], v. 14, p. 483–510, 1996.

ADAMS, T. S. Hematophagy and hormone release. **Annals of the Entomological Society of America**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 1–13, 1999. DOI: 10.1093/aesa/92.1.1.

AGRE, P.; PRESTON, G. M.; SMITH, B. L.; JUNG, J. S.; RAINA, S.; MOON, C.; GUGGINO, W. B.; NIELSEN, S. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. l.], v. 265, n. 4, p. F463–F476, 1993. DOI: 10.1152/ajprenal.1993.265.4.F463. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.1993.265.4.F463>.

ANDRADE-FILHO, J. D.; SCHOLTE, R. G. C.; AMARAL, A. L. G.; SHIMABUKURO, P. H. F.; CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L. Occurrence and probability maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, [S. l.], v. 54, n. 5, p. 1430–1434, 2017. DOI: 10.1093/jme/tjx094.

APPLEBAUM, W. S. **Biochemistry of digestion. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. [s.l: s.n.].

ARIK, Anam J.; RASGON, Jason L.; QUICKE, Kendra M.; RIEHLE, Michael A. Manipulating insulin signaling to enhance mosquito reproduction. **BMC Physiology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 15, 2009. DOI: 10.1186/1472-6793-9-15. Disponível em: <https://bmcpphysiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6793-9-15>.

BAILEY, Frederick E.; KOLESKE, Joseph V. Polyoxyalkylenes. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, [S. l.], 2000. DOI: 10.1002/14356007.a21_579.

BATES, P. A.; TETLEY, L. *Leishmania mexicana*: Induction of Metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at Acidic pH. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 76, n. 4, p. 412–423, 1993. DOI: 10.1006/expr.1993.1050. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489483710507>.

BATES, Paul A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007. b. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751907001269>.

BAUZER, Luiz GSR; SOUZA, Nataly A.; MAINGON, Rhayza DC; PEIXOTO, Alexandre A. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 1–12, 2007. DOI: 10.1590/S0074-02762007000100001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762007000100001&lng=en&tlng=en.

BENOIT, Joshua B.; HANSEN, Immo A.; SZUTER, Elise M.; DRAKE, Lisa L.; BURNETT, Denielle L.; ATTARDO, Geoffrey M. Emerging roles of aquaporins in relation to the physiology of blood-feeding arthropods. **Journal of Comparative Physiology B**, [S. l.], v. 184, n. 7, p. 811–825, 2014. DOI: 10.1007/s00360-014-0836-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00360-014-0836-x>.

BENTLEY, R. The conformations of the disaccharides, cellobiose and maltose. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 81, n. 8, p. 1952–1956, 1959.

BOLL, Michael; DANIEL, Hannelore; GASNIER, Bruno. The SLC36 family: proton-coupled transporters for the absorption of selected amino acids from extracellular and intracellular proteolysis. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, [S. l.], v. 447, n. 5, p. 776–779, 2004. DOI: 10.1007/s00424-003-1073-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00424-003-1073-4>.

BOLL, Michael; FOLTZ, Martin; RUBIO-ALIAGA, Isabel; KOTTRA, Gabor; DANIEL, Hannelore. Functional Characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 277, n. 25, p. 22966–22973, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M200374200. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819668997>.

BOROVSKY, Dov. Biosynthesis and control of mosquito gut proteases. **IUBMB Life**,

[S. l.], v. 55, n. 8, p. 435–441, 2003. DOI: 10.1080/15216540310001597721.

BOUDKO, Dmitri Y. Molecular basis of essential amino acid transport from studies of insect nutrient amino acid transporters of the SLC6 family (NAT-SLC6). **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 433–449, 2012. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.12.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.018>.

BOUDKO, Dmitri Y.; KOHN, Andrea B.; MELESHKEVITCH, Ella A.; DASHER, Michelle K.; SERON, Theresa J.; STEVENS, Bruce R.; HARVEY, William R. Ancestry and progeny of nutrient amino acid transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 5, p. 1360–1365, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0405183101.

BOUDKO, Dmitri Y.; TSUJIMOTO, Hitoshi; RODRIGUEZ, Stacy D.; MELESHKEVITCH, Ella A.; PRICE, David P.; DRAKE, Lisa L.; HANSEN, Immo A. Substrate specificity and transport mechanism of amino-acid transceptor Slimfast from *Aedes aegypti*. **Nature Communications**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 8546, 2015. DOI: 10.1038/ncomms9546. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms9546>.

BRANDON, Michelle C.; PENNINGTON, James E.; ISOE, Jun; ZAMORA, Jorge; SCHILLINGER, Anne-Sophie; MIESFELD, Roger L. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 38, n. 10, p. 916–922, 2008. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.07.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174808001288>.

BRETT, Christopher L.; KELLY, Tony; SHELDON, Claire; CHURCH, John. Regulation of Cl⁻ – HCO₃⁻ exchangers by cAMP-dependent protein kinase in adult rat hippocampal CA1 neurons. **The Journal of Physiology**, [S. l.], v. 545, n. 3, p. 837–853, 2002. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.027235. Disponível em: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.2002.027235>.

BRIEGEL, Hans; REZZONICO, Licia. Concentration of host blood protein during feeding by anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae)¹. **Journal of Medical Entomology**, [S.

l.], v. 22, n. 6, p. 612–618, 1985. DOI: 10.1093/jmedent/22.6.612. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/22.6.612>.

BROGIOLO, Walter; STOCKER, Hugo; IKEYA, Tomoatsu; RINTELEN, Felix; FERNANDEZ, Rafael; HAFEN, Ernst. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. **Current Biology**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 213–221, 2001. DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00068-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982201000689>.

BROWN, Mark R.; CLARK, Kevin D.; GULIA, Monika; ZHAO, Zhangwu; GARCZYNSKI, Stephen F.; CRIM, Joe W.; SUDERMAN, Richard J.; STRAND, Michael R. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 15, p. 5716–5721, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0800478105. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0800478105>.

BROWN, Mark R.; GRAF, Rolf; SWIDEREK, Kristine M.; FENDLEY, Dan; STRACKER, Travis H.; CHAMPAGNE, Donald E.; LEA, Arden O. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 7, p. 3967–3971, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.7.3967. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925817471584>.

BURSALI, Fatma; TOURAY, Mustapha. The complexities of blood-feeding patterns in mosquitoes and sandflies and the burden of disease: A minireview. **Veterinary Medicine and Science**, [S. l.], v. 10, n. 5, 2024. DOI: 10.1002/vms3.1580. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/vms3.1580>.

CAROCI, Abraham S.; NORIEGA, Fernando G. Free amino acids are important for the retention of protein and non-protein meals by the midgut of *Aedes aegypti* females. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 49, n. 9, p. 839–844, 2003. DOI: 10.1016/S0022-1910(03)00134-3.

CARPENTER, Victoria K.; DRAKE, Lisa L.; AGUIRRE, Sarah E.; PRICE, David P.; RODRIGUEZ, Stacy D.; HANSEN, Immo A. SLC7 amino acid transporters of the yellow fever

mosquito *Aedes aegypti* and their role in fat body TOR signaling and reproduction. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 513–522, 2012. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2012.01.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.01.005>.

CASEY, Joseph R.; GRINSTEIN, Sergio; ORLOWSKI, John. Sensors and regulators of intracellular pH. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 50–61, 2010. DOI: 10.1038/nrm2820. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm2820>.

CASTILLO, Julio; BROWN, Mark R.; STRAND, Michael R. Blood feeding and insulin-like peptide 3 stimulate proliferation of hemocytes in the mosquito *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. e1002274, 2011. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002274. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002274>.

CHANIOTIS, Byron N. Sugar-Feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **Journal of Medical Entomology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 73–79, 1974. DOI: 10.1093/jmedent/11.1.73. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/11.1.73>.

CHEN, Andrew C.; FRIEDMAN, Stanley. Hormonal regulation of trehalose metabolism in the blowfly, *Phormia regina*: Interaction between hypertrehalosemic and hypotrehalosemic hormones. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 1223–1232, 1977. DOI: 10.1016/0022-1910(77)90063-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022191077900634>.

CHEN, Ying-Chi; CHANG, Yu-Chung; CHANG, Heng-Ai; LIN, Yu-Shan; TSAO, Chiung-Wen; SHEN, Meng-Ru; CHIU, Wen-Tai. Differential Ca^{2+} mobilization and mast cell degranulation by $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ - and GPCR-mediated signaling. **Cell Calcium**, [S. l.], v. 67, p. 31–39, 2017. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.08.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143416017300854>.

CHOPRA, Gouri; KAUSHIK, Shivam; KAIN, Pinky. Nutrient sensing via gut in *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 2694, 2022. DOI: 10.3390/ijms23052694. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/5/2694>.

CLAEYS, Ilse; SIMONET, Gert; POELS, Jeroen; VAN LOY, Tom; VERCAMMEN, Linda; DE LOOF, Arnold; VANDEN BROECK, Jozef. Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. **Peptides**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 807–816, 2002. DOI: 10.1016/S0196-9781(01)00666-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978101006660>.

COAST, Geoffrey. The endocrine control of salt balance in insects. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 152, n. 2–3, p. 332–338, 2007. DOI: 10.1016/j.ygcen.2007.02.018.

COAST, Geoffrey M. Neuroendocrine control of ionic homeostasis in blood-sucking insects. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 212, n. 3, p. 378–386, 2009. DOI: 10.1242/jeb.024109.

D'SOUZA, Anisha A.; SHEGOKAR, Ranjita. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1257–1275, 2016. DOI: 10.1080/17425247.2016.1182485. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>.

DAMES, Petra; ZIMMERMANN, Bernhard; SCHMIDT, Ruth; REIN, Julia; VOSS, Martin; SCHEWE, Bettina; WALZ, Bernd; BAUMANN, Otto. cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H⁺-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. [S. l.], v. 103, n. 10, p. 1–6, 2006.

DE VIRGILIO, Claudio; LOEWITH, Robbie. The TOR signalling network from yeast to man. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 38, n. 9, p. 1476–1481, 2006. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.02.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272506000720>.

DEMAUREX, Nicolas. pH homeostasis of cellular organelles. **News in Physiological Sciences**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–5, 2002. DOI: 10.1152/physiologyonline.2002.17.1.1.

DENECKE, Shane M.; DRIVA, Olympia; LUONG, Hang Ngoc Bao; IOANNIDIS, Panagiotis; LINKA, Marc; NAUEN, Ralf; GEIBEL, Sven; VONTAS, John. The identification and evolutionary trends of the solute carrier superfamily in arthropods. **Genome Biology and**

Evolution, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 1429–1439, 2020. DOI: 10.1093/gbe/evaa153. Disponível em: <https://academic.oup.com/gbe/article/12/8/1429/5873520>.

DOSTÁLOVÁ, Anna; VOLF, Petr. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 276, 2012. DOI: 10.1186/1756-3305-5-276. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-276>.

DRAKE, Lisa L.; RODRIGUEZ, Stacy D.; HANSEN, Immo A. Functional characterization of aquaporins and aquaglyceroporins of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 7795, 2015. DOI: 10.1038/srep07795. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep07795>.

DUSZENKO, Michael et al. Autophagy in protists. **Autophagy**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 127–158, 2011. DOI: 10.4161/auto.7.2.13310. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.7.2.13310>.

DUVE, Hanne. The presence of a hypoglucemic and hypotrehalocemic hormone in the neurosecretory system of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 102–110, 1978. DOI: 10.1016/0016-6480(78)90055-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0016648078900552>.

EVANS, Amy M.; AIMANOVA, Karlygash G.; GILL, Sarjeet S. Characterization of a blood-meal-responsive proton-dependent amino acid transporter in the disease vector, *Aedes aegypti*. [S. l.], p. 3263–3271, 2009. DOI: 10.1242/jeb.029553.

FERREIRA, Tainá Neves; PITA-PEREIRA, Daniela; COSTA, Samara Graciane; BRAZIL, Reginaldo Peçanha; MORAES, Caroline Silva; DÍAZ-ALBITER, Hector Manuel; GENTA, Fernando Ariel. Transmission blocking sugar baits for the control of *Leishmania* development inside sand flies using environmentally friendly beta-glycosides and their aglycones. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 614, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-3122-z. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3122-z>.

FERRO, Cristina; PARDO, Raul; TORRES, Mariela; MORRISON, Amy C. Larval

Microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in colombia. **Journal of Medical Entomology**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 719–728, 1997. DOI: 10.1093/jmedent/34.6.719.

FINGAR, Diane C.; BLENIS, John. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. **Oncogene**, [S. l.], v. 23, n. 18, p. 3151–3171, 2004. DOI: 10.1038/sj.onc.1207542. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1207542>.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Entomologia médica: 4º volume: psychodidae. phlebotominae. leishmanioses. bartoneloze**. 4º Volume ed. [s.l: s.n.].

GEMETCHU, T. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 111–124, 1974. DOI: 10.1080/00034983.1974.11686930. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00034983.1974.11686930>.

GENEROSO, Laura Aquino. **OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE DE IMAGEM PARA ESTIMAR O TAMANHO DO REPASTO DE *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Phlebotominae) E AVALIAÇÃO DO PARAFILM® TRATADO EM ALIMENTADOR ARTIFICIAL**. 2022. Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2022.

GONTIJO, Nelder F.; ALMEIDA-SILVA, Samuel; COSTA, Fabrício F.; MARESGUIA, Marcos L.; WILLIAMS, Paul; MELO, Maria N. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 90, n. 3, p. 212–219, 1998. DOI: 10.1006/expr.1998.4336.

GOODING, R. H. THE DIGESTIVE PROCESSES OF HAEMATOPHAGOUS INSECTS: IV. SECRETION OF TRYPSIN BY *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE). **The Canadian Entomologist**, [S. l.], v. 105, n. 4, p. 599–603, 1973. DOI: 10.4039/Ent105599-4. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0008347X0002191X/type/journal_article.

GRAÇA-SOUZA, Aurélio V.; MAYA-MONTEIRO, Clarissa; PAIVA-SILVA, Gabriela O.; BRAZ, Glória R. C.; PAES, Márcia C.; SORGINE, Marcos H. F.; OLIVEIRA, Marcus F.; OLIVEIRA, Pedro L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 36, n. 4 SPEC. ISS., p. 322–335, 2006. DOI: 10.1016/j.ibmb.2006.01.009.

GULIA-NUSS, Monika; ROBERTSON, Anne E.; BROWN, Mark R.; STRAND, Michael R. Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. e20401, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0020401. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020401>.

HAAS, M.; MCMANUS, T. J. Bumetanide inhibits ($\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$) co-transport at a chloride site. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, [S. l.], v. 245, n. 3, p. C235–C240, 1983. DOI: 10.1152/ajpcell.1983.245.3.C235. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.1983.245.3.C235>.

HAEGER, Gerrit; BONGAERTS, Johannes; SIEGERT, Petra. A convenient ninhydrin assay in 96-well format for amino acid-releasing enzymes using an air-stable reagent. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 654, p. 114819, 2022. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114819. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269722002755>.

HANSEN, Immo A. et al. AaCAT1 of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 286, n. 12, p. 10803–10813, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M110.179739. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820539033>.

HANSEN, Immo A.; ATTARDO, Geoffrey M.; PARK, Jong-Hwa; PENG, Quan; RAIKHEL, Alexander S. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 101, n. 29, p. 10626–10631, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0403460101. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0403460101>.

HANSEN, Immo A.; ATTARDO, Geoffrey M.; ROY, Saurabh G.; RAIKHEL,

Alexander S. Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 280, n. 21, p. 20565–20572, 2005. DOI: 10.1074/jbc.M500712200. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820640583>.

HARHAY, Michael O.; OLLIARO, Piero L.; COSTA, Dorcas Lamounier; COSTA, Carlos Henrique Nery. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011. DOI: 10.1016/j.pt.2011.04.001.

HARRISON, Jon F. Insect acid-base physiology. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 221–250, 2001. DOI: 10.1146/annurev.ento.46.1.221. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.46.1.221>.

HARVEY, William R. Voltage coupling of primary H⁺ V-ATPases to secondary Na⁺ - or K⁺ -dependent transporters. [S. l.], p. 1620–1629, 2009. DOI: 10.1242/jeb.031534.

HASKINS, W. T.; HANN, R. M.; HUDSON, C. S. Synthesis of cellobiose. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 64, n. 6, p. 1289–1291, 1942.

HOLTOF, Michiel; LENAERTS, Cynthia; CULLEN, Darron; VANDEN BROECK, Jozef. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019. DOI: 10.1007/s00441-019-03031-9. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-019-03031-9>.

HUANG, Zengqing; SUN, Zhonghe; LIU, Jiayi; JU, Xiaoli; XIA, Hengchuan; YANG, Yanhua; CHEN, Keping; WANG, Qiang. Insect transient receptor potential vanilloid channels as potential targets of insecticides. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 148, n. March, p. 104899, 2023. DOI: 10.1016/j.dci.2023.104899. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104899>.

HUBERT, Jean-François; THOMAS, Daniel; CAVALIER, Annie; GOURANTON, Jean. Structural and biochemical observations on specialized membranes of the “filter chamber”, a water-shunting complex in sap-sucking homopteran insects. **Biology of the Cell**, [S. l.], v. 66, n. 1–2, p. 155–163, 1989. DOI: 10.1111/j.1768-322X.1989.tb00829.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1768-322X.1989.tb00829.x>.

IN, Crosstalks; RELATIONSHIPS, Host. *Leishmania* life cycle in the sandfly. **Africa**, [S. l.], v. 15, n. August, p. 237–243, 2008. Disponível em: http://parasite-journal.org/dwld/Parasite08-3_237-243_Volf.pdf.

INOKI, Ken; OUYANG, Hongjiao; LI, Yong; GUAN, Kun-Liang. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 79–100, 2005. DOI: 10.1128/mmbr.69.1.79-100.2005.

ISENRING, Paul; FORBUSH, Bliss. Ion and Bumetanide Binding by the Na-K-Cl Cotransporter. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 272, n. 39, p. 24556–24562, 1997. DOI: 10.1074/jbc.272.39.24556. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819636343>.

ISHIBASHI, Kenichi; KONDO, Shintaro; HARA, Shigeki; MORISHITA, Yoshiyuki. The evolutionary aspects of aquaporin family. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 300, n. 3, p. R566–R576, 2011. DOI: 10.1152/ajpregu.90464.2008. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.90464.2008>.

JIN, Xiangyang; AIMANOVA, Karlygash; ROSS, Linda S.; GILL, Sarjeet S. Identification, functional characterization and expression of a LAT type amino acid transporter from the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 33, n. 8, p. 815–827, 2003. DOI: 10.1016/S0965-1748(03)00081-X.

JOBLING, Boris. **Anatomical drawing of biting flies**. London: British Museum, 1987.

JOCHIM, Ryan C.; TEIXEIRA, Clarissa R.; LAUGHINGHOUSE, Andre; MU, Jianbing; OLIVEIRA, Fabiano; GOMES, Regis B.; ELNAIEM, Dia Eldin; VALENZUELA, Jesus G. The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: Comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum* chagasi-infected sand flies. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 9, p. 1–24, 2008. DOI: 10.1186/1471-2164-9-15.

JUNG, J. S.; PRESTON, G. M.; SMITH, B. L.; GUGGINO, W. B.; AGRE, P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 269, n. 20, p. 14648–14654, 1994. DOI:

10.1016/S0021-9258(17)36674-7. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925817366747>.

KANAMORI, Yasushi et al. The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 30–37, 2010. DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.12.006. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174809001787>.

KANDASAMY, Palanivel; GYIMESI, Gergely; KANAI, Yoshikatsu; HEDIGER, Matthias A. Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 43, n. 10, p. 752–789, 2018. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.05.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000418301014>.

KIKAWADA, Takahiro; SAITO, Ayako; KANAMORI, Yasushi; NAKAHARA, Yuichi; IWATA, Ken-ichi; TANAKA, Daisuke; WATANABE, Masahiko; OKUDA, Takashi. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 104, n. 28, p. 11585–11590, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0702538104. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0702538104>.

KIM, Joungmok; GUAN, Kun-Liang. Amino acid signaling in TOR activation. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 1001–1032, 2011. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062209-094414. Disponível em:
<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-062209-094414>.

KRIEGER, M. J. B.; JAHAN, N.; RIEHLE, M. A.; CAO, C.; BROWN, M. R. Molecular characterization of insulin-like peptide genes and their expression in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 305–315, 2004. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00489.x. Disponível em:
<https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0962-1075.2004.00489.x>.

KRUSE, Elisabeth; UEHLEIN, Norbert; KALDENHOFF, Ralf. The aquaporins. **Genome Biology**, [S. l.], v. 7, n. 2, 2006. DOI: 10.1186/gb-2006-7-2-206.

KURKDJIAN, A.; GUERN, J. Intracellular pH: Measurement and Importance in Cell Activity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 271–303, 1989. DOI: 10.1146/annurev.pp.40.060189.001415. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pp.40.060189.001415>.

LAINSON, Ralph; RANGEL, Bizabeth F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005. DOI: 10.1590/S0074-02762005000800001.

LEHANE, M. J. **Blood Sucking**. Second Edi ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2009. DOI: 10.1016/B978-0-12-374144-8.00037-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00037-0>.

LEITE, A. C. R.; EVANGELISTA, L. G. Ultrastructure of Endocrine Cells from the Abdominal Midgut Epithelium of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 749–752, 2001. DOI: 10.1603/0022-2585-38.5.749. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/0022-2585-38.5.749>.

LENT, CHARLES M.; DICKINSON, MICHAEL H.; MARSHALL, CAMERON G. Serotonin and leech feeding behavior: obligatory neuromodulation. **American Zoologist**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 1241–1254, 1989. DOI: 10.1093/icb/29.4.1241. Disponível em: <https://academic.oup.com/icb/article-lookup/doi/10.1093/icb/29.4.1241>.

LI, Jing; KIM, Sang Gyun; BLENIS, John. Rapamycin: One Drug, Many Effects. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 373–379, 2014. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.01.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413114000072>.

LI, Yaofeng; CHEN, Xiangyun; TANG, Xiaofang; ZHANG, Chundong; WANG, La; CHEN, Peng; PAN, Minhui; LU, Cheng. DNA synthesis during endomitosis is stimulated by insulin via the PI3K/Akt and TOR signaling pathways in the silk gland cells of *Bombyx mori*. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 6266–6280, 2015. DOI: 10.3390/ijms16036266. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/3/6266>.

LIEDTKE, Wolfgang. Transient receptor potential vanilloid channels functioning in transduction of osmotic stimuli. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 191, n. 3, p. 515–523, 2006. DOI: 10.1677/joe.1.07000.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>.

LOEWITH, Robbie; JACINTO, Estela; WULLSCHLEGER, Stephan; LORBERG, Anja; CRESPO, José L.; BONENFANT, Débora; OPPLIGER, Wolfgang; JENOE, Paul; HALL, Michael N. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 457–468, 2002. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00636-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276502006366>.

LONG, Thomas F.; MURDOCK, Larry L. Stimulation of blowfly feeding behavior by octopaminergic drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 80, n. 13, p. 4159–4163, 1983. DOI: 10.1073/pnas.80.13.4159. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.80.13.4159>.

MACVICKER, B. Y. J. A. K.; BILLINGSLEY, P. F.; DJAMGOZ, M. B. A. ATPase Activity in the midgut of the mosquito, *Anopheles stephensi*: biochemical characterisation of ouabain-sensitive and ouabain-insensitive activities. [S. l.], v. 183, p. 167–183, 1993.

MAINGON, Rhayza D. C.; WARD, Richard D.; HAMILTON, James G. C.; BAUZER, Luiz G. S. R.; PEIXOTO, Alexandre A. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 12–17, 2008. DOI: 10.1016/j.pt.2007.10.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492207002826>.

MALTA, Luccas Gabriel Ferreira. ***Clogmia albipunctata*: a hematofagia sob uma perspectiva exaptativa**. 2021. Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2021.

MALTA, Luccas Gabriel Ferreira; KOERICH, Leonardo Barbosa; D'ÁVILA PESSOA,

Grasielle Caldas; ARAUJO, Ricardo N.; SANT'ANNA, Mauricio Roberto Viana; PEREIRA, Marcos H.; GONTIJO, Nelder Figueiredo. *Clogmia albipunctata* (Williston, 1893) midgut physiology: pH control and functional relationship with Lower Diptera (nematoceran) especially with hematophagous species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [S. l.], v. 290, p. 111584, 2024. a. DOI: 10.1016/j.cbpa.2024.111584. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643324000114>.

MALTA, Luccas Gabriel Ferreira; SANT'ANNA, Maurício Roberto Viana; PEREIRA, Marcos Horário; GONTIJO, Nelder Figueiredo. A brief look at sexual dimorphism in the midgut morphology of lower Diptera and its implications for hematophagy. **Zoologischer Anzeiger**, [S. l.], v. 313, p. 115–119, 2024. b. DOI: 10.1016/j.jcz.2024.10.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044523124000937>.

MAYER, John P.; ZHANG, Faming; DIMARCHI, Richard D. Insulin structure and function. **Peptide Science**, [S. l.], v. 88, n. 5, p. 687–713, 2007. DOI: 10.1002/bip.20734. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bip.20734>.

MELESHKEVITCH, Ella A.; ROBINSON, Marvin; POPOVA, Lyudmila B.; MILLER, Melissa M.; HARVEY, William R.; BOUDKO, Dmitri Y. Cloning and functional expression of the first eukaryotic Na⁺-tryptophan symporter, AgNAT6. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 212, n. 10, p. 1559–1567, 2009. DOI: 10.1242/jeb.027383. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jeb/article/212/10/1559/18284/Cloning-and-functional-expression-of-the-first>.

MIGLIATI, Elton; MEURICE, Nathalie; DUBOIS, Pascale; FANG, Jennifer S.; SOMASEKHARAN, Suma; BECKETT, Elizabeth; FLYNN, Gary; YOOL, Andrea J. Inhibition of Aquaporin-1 and Aquaporin-4 water permeability by a derivative of the loop diuretic bumetanide acting at an internal pore-occluding binding site. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 105–112, 2009. DOI: 10.1124/mol.108.053744. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026895X24019758>.

MUTAI, Hideki; HELLER, Stefan. Vertebrate and invertebrate TRPV-like mechanoreceptors. **Cell Calcium**, [S. l.], v. 33, n. 5–6, p. 471–478, 2003. DOI: 10.1016/S0143-

4160(03)00062-9.

NASSEL, D. Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 1–85, 1988. DOI: 10.1016/0301-0082(88)90002-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0301008288900020>.

NEPOMUCENO, Denise Barguil. **Controle do pH no tubo digestivo de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em diferentes condições fisiológicas**. 2015. Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2015.

NEPOMUCENO, Denise Barguil. **ESTUDO DOS MECANISMOS DE ALCALINIZAÇÃO INTESTINAL EM FÊMEAS DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:PSYCHODIDAE)**. 2019. Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2019.

NEPOMUCENO, Denise Barguil; D'ÁVILA PESSOA, Grasielle Caldas; KOERICH, Leonardo Barbosa; PEREIRA, Marcos Horácio; SANT'ANNA, Mauricio Roberto Viana; ARAÚJO, Ricardo Nascimento; GONTIJO, Nelder Figueiredo. cAMP: A second messenger involved in the mechanism of midgut alkalization in *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Science**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 1059–1070, 2022. a. DOI: 10.1111/1744-7917.12980.

NEPOMUCENO, Denise Barguil; PAIM, Rafaela Magalhães Macedo; ARAÚJO, Ricardo Nascimento; PEREIRA, Marcos Horácio; PESSOA, Grasielle Caldas D. Ávil.; KOERICH, Leonardo Barbosa; SANT'ANNA, Mauricio Roberto Viana; GONTIJO, Nelder Figueiredo. The role of LuloPAT amino acid/proton symporters in midgut alkalization in the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera – Psychodidae). **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 120, p. 103973, 2020. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2019.103973. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103973>.

NEPOMUCENO, Denise Barguil; PESSOA, Grasielle Caldas Dávila; ARAÚJO, Ricardo Nascimento; KOERICH, Leonardo Barbosa; SANT'ANNA, Mauricio Roberto Viana; PEREIRA, Marcos Horácio; GONTIJO, Nelder Figueiredo. Na⁺/K⁺-ATPase Activation by cAMP in the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912; Diptera: Psychodidae). **Journal of Insect Science**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 1–4, 2022. b. DOI: 10.1093/jisesa/ieac008.

NEPOMUCENO, Denise Barguil; SANTOS, Vânia Cristina; ARAÚJO, Ricardo Nascimento; PEREIRA, Marcos Horácio; SANT'ANNA, Maurício Roberto; MOREIRA, Luciano Andrade; GONTIJO, Nelder Figueiredo. pH control in the midgut of *Aedes aegypti* under different nutritional conditions. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 220, n. 18, p. 3355–3362, 2017. b. DOI: 10.1242/jeb.158956.

NEWTON, Alexandra C.; BOOTMAN, Martin D.; SCOTT, John D. Second Messengers. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. a005926, 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a005926. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a005926>.

NIJHOUT, H. Frederi.; CARROW, Grant M. Diuresis after a bloodmeal in female *Anopheles freeborni*. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 293–298, 1978. DOI: 10.1016/0022-1910(78)90025-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022191078900252>.

NORMANN, TOM CHRISTIAN. Neurosecretory cells in insect brain and production of hypoglycaemic hormone. **Nature**, [S. l.], v. 254, n. 5497, p. 259–261, 1975. DOI: 10.1038/254259a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/254259a0>.

OLDHAM, Sean; HAFEN, Ernst. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 79–85, 2003. DOI: 10.1016/S0962-8924(02)00042-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892402000429>.

ORCHARD, Ian. Serotonin: A coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [S. l.], v. 144, n. 3, p. 316–324, 2006. DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.11.010.

PRIYA, Sakshi; BATRA, Unnati; R.N., Samshritha; SHARMA, Sudhanshu; CHAURASIYA, Akash; SINGHVI, Gautam. Polysaccharide-based nanofibers for pharmaceutical and biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 218, p. 209–224, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.118.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813022015501>.

PRIYA, Sakshi; CHOUDHARI, Manisha; TOMAR, Yashika; DESAI, Vaibhavi Meghraj; INNANI, Srinath; DUBEY, Sunil Kumar; SINGHVI, Gautam. Exploring polysaccharide-based bio-adhesive topical film as a potential platform for wound dressing application: A review. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 327, p. 121655, 2024. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121655. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861723011207>.

RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; PITALUGA, A. N.; TELLERIA, E. L.; MARQUES, C.; SOUZA, A. A.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Cloning and characterization of a V-ATPase subunit C from the American visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* modulated during development and blood ingestion. [S. l.], v. 102, n. June, p. 509–515, 2007.

RANGEL, Elizabeth Ferreira; LAINSON, Ralph. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: Aspects of their biology and vectorial competence. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 104, n. 7, p. 937–954, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000700001.

RIBEIRO, José M. C.; ROWTON, Edgar D.; CHARLAB, Rosane. Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 271–277, 2000. DOI: 10.1016/S0965-1748(99)00119-8.

RIEHLE, Michael A.; FAN, Yongliang; CAO, Chun; BROWN, Mark R. Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: Expression, cellular localization, and phylogeny. **Peptides**, [S. l.], v. 27, n. 11, p. 2547–2560, 2006. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.07.016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019697810600341X>.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, [S. l.], v. 124, n. 5, p. 495–507, 2002. DOI: 10.1017/S0031182002001439. Disponível em:

https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182002001439/type/journal_article.

ROGERS, Matthew E.; HAJMOVÁ, Martina; JOSHI, Manju B.; SADLOVA, Jovana; DWYER, Dennis M.; VOLF, Petr; BATES, Paul A. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 1363–1372, 2008. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2008.01132.x.

ROSENBAUM, Tamara; ISLAS, León D. Molecular physiology of TRPV channels: controversies and future challenges. **Annual Review of Physiology**, [S. l.], v. 85, p. 293–316, 2023. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030222-012349.

ROY, Saurabh G.; HANSEN, Immo A.; RAIKHEL, Alexander S. Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 37, n. 12, p. 1317–1326, 2007. DOI: 10.1016/j.ibmb.2007.08.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174807002081>.

RUDIN, W.; HECKER, H. Functional morphology of the midgut of a sandfly as compared to other hematophagous nematocera. **Tissue and Cell**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 751–758, 1982. DOI: 10.1016/0040-8166(82)90063-5.

SAAB, Natália Alvim. **Estudo do pH intestinal de *Lutzomyia longipalpis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em diferentes condições fisiológicas**. 2023. Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2023.

SAGNÉ, Corinne; AGULHON, Cendra; RAVASSARD, Philippe; DARMON, Michèle; HAMON, Michel; EL MESTIKAWY, Salah; GASNIER, Bruno; GIROS, Bruno. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 98, n. 13, p. 7206–7211, 2001. DOI: 10.1073/pnas.121183498. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.121183498>.

SANTOS, Vânia C.; ARAUJO, Ricardo N.; MACHADO, Luciane A. D.; PEREIRA, Marcos H.; GONTIJO, Nelder F. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its

control. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 211, n. 17, p. 2792–2798, 2008. DOI: 10.1242/jeb.019836. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jeb/article/211/17/2792/17738/The-physiology-of-the-midgut-of-Lutzomyia>.

SANTOS, Vânia C.; NUNES, Cássio A.; PEREIRA, Marcos H.; GONTIJO, Nelder F. Mechanisms of pH control in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*: Roles for ingested molecules and hormones. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 214, n. 9, p. 1411–1418, 2011. DOI: 10.1242/jeb.051490.

SANTOS, Vania Cristina et al. Host modulation by a parasite: How *Leishmania infantum* modifies the intestinal environment of *Lutzomyia longipalpis* to favor its development. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0111241.

SANTOS, Vânia Cristina. **Caracterização do mecanismo de controle do pH no tubo digestivo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) e sua importância no desenvolvimento de *Leishmania* Ross, 1903**. 2010. Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2010.

SCHEWE, Bettina; SCHMÄLZLIN, Elmar; WALZ, Bernd. Intracellular pH homeostasis and serotonin-induced pH changes in *Calliphora* salivary glands : the contribution of V-ATPase and carbonic anhydrase. [S. l.], p. 805–815, 2008. DOI: 10.1242/jeb.002667.

SCHMELZLE, Tobias; HALL, Michael N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 253–262, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00117-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400001173>.

Second Messengers. In: **Cell Biology**. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 443–462. DOI: 10.1016/B978-0-323-34126-4.00026-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323341264000268>.

SHAW, Jeffrey J.; RANGEL, Elizabeth F. **Brazilian sand flies: Biology, taxonomy, medical importance and control**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-75544-1.

SHERLOCK, Ítalo Rodrigues de Araújo et al. Importância médico-veterinária. A

importância dos flebotomíneos. In: **Importância médico-veterinária**. [s.l.] : Editora Fiocruz, 2003.

SILVA FERNANDES, Tatiana Lima et al. Galactosamine reduces sandfly gut protease activity through TOR downregulation and increases *Lutzomyia* susceptibility to *Leishmania*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 122, p. 103393, 2020. DOI: 10.1016/j.ibmb.2020.103393. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174820300825>.

SIM, Cheolho; DENLINGER, David L. Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 18, p. 6777–6781, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0802067105. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0802067105>.

SMIT, A. Towards understanding the role of insulin in the brain: lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 35–54, 1998. DOI: 10.1016/S0301-0082(97)00063-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008297000634>.

SOARES, Rodrigo P. P.; TURCO, Salvatore J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): A Review. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 301–330, 2003. DOI: 10.1590/S0001-37652003000300005.

SPRING, Jeffrey H.; ROBICHAUX, S. Renee; HAMLIN, John A. The role of aquaporins in excretion in insects. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 212, n. 3, p. 358–362, 2009. DOI: 10.1242/jeb.024794. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jeb/article/212/3/358/9586/The-role-of-aquaporins-in-excretion-in-insects>.

STARCHER, Barry. A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. [S. l.], v. 129, p. 125–129, 2001. DOI: 10.1006/abio.2001.5050.

SUDHOF, T. C. Calcium control of neurotransmitter release. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. a011353–a011353, 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a011353. Disponível em:

<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a011353>.

TELEMAN, Aurelio A. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 425, n. 1, p. 13–26, 2010. DOI: 10.1042/BJ20091181. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/425/1/13/45375/Molecular-mechanisms-of-metabolic-regulation-by>.

TELLERIA, Erich Loza; PITALUGA, André Nóbrega; ORTIGÃO-FARIAS, João Ramalho; DE ARAÚJO, Adriana Pereira Oliveira; RAMALHO-ORTIGÃO, José Marcelo; TRAUB-CSEKO, Yara Maria. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 53–63, 2007. DOI: 10.1002/arch.20198.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of Digestion. In: **Comprehensive Molecular Insect Science**. [s.l.] : Elsevier, 2005. p. 171–224. DOI: 10.1016/B0-44-451924-6/00053-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0444519246000533>.

TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, [S. l.], v. 109, n. 1, p. 1–62, 1994. DOI: 10.1016/0305-0491(94)90141-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0305049194901414>.

TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. **Biochemistry and Molecular Biology of Digestion**. [s.l.] : Elsevier B.V., 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-384747-8.10011-X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10011-X>.

TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clelia; SILVA, Carlos P. Midgut pH buffering, nutrient absorption, fluid fluxes, and enzyme recycling. In: [s.l.: s.n.]. p. 87–104. DOI: 10.1007/978-3-031-39233-7_6. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-39233-7_6.

THOMAS, Andreas; THEVIS, Mario. Recent advances in the determination of insulins from biological fluids. In: [s.l.: s.n.]. p. 115–167. DOI: 10.1016/bs.acc.2019.07.003. Disponível

em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242319300605>.

TOJYO, Yosuke; MORITA, Takao; NEZU, Akihiro; TANIMURA, Akihiko. Key components of store-operated Ca^{2+} entry in non-excitabile cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 125, n. 4, p. 340–346, 2014. DOI: 10.1254/jphs.14R06CP. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/125/4/125_14R06CP/_article.

UCHIDA, Keikichi; OHMORI, Daijiro; YAMAKURA, Fumiyuki; SUZUKI, Katsuhiko. Changes in free amino acid concentration in the hemolymph of the female *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae), after a blood meal. **Journal of Medical Entomology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 302–308, 1990. DOI: 10.1093/jmedent/27.3.302. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/27.3.302>.

VAUGHAN, Jefferson A.; NODEN, Bruce H.; BEIER, John C. Concentration of human erythrocytes by anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) during feeding. **Journal of Medical Entomology**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 780–786, 1991. DOI: 10.1093/jmedent/28.6.780. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/28.6.780>.

VEENSTRA, Jan A. Do insects really have a homeostatic hypotrehalosaemic hormone? **Biological Reviews**, [S. l.], v. 64, n. 4, p. 305–316, 1989. DOI: 10.1111/j.1469-185X.1989.tb00678.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-185X.1989.tb00678.x>.

VEENSTRA, Jan A.; AGRICOLA, Hans Jürgen; SELLAMI, Azza. Regulatory peptides in fruit fly midgut. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 334, n. 3, p. 499–516, 2008. DOI: 10.1007/s00441-008-0708-3.

VERKMAN, A. S. Aquaporins. **Current Biology**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. R52–R55, 2013. DOI: 10.1016/j.cub.2012.11.025. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982212013693>.

VIGODER, Felipe M.; ARAKI, Alejandra S.; BAUZER, Luiz G. S. R.; SOUZA, Nataly A.; BRAZIL, Reginaldo P.; PEIXOTO, Alexandre A. Lovesongs and period gene polymorphisms indicate *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) as a sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912) complex. **Infection, Genetics and Evolution**,

[S. l.], v. 10, n. 6, p. 734–739, 2010. DOI: 10.1016/j.meegid.2010.05.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134810001140>.

WALLBANKS, K. R.; MOORE, J. S.; BENNETT, L. R.; SOREN, R.; MOLYNEUX, D. H.; CARLIN, J. M.; PEREZ, J. E. Aphid derived sugars in the neotropical sandfly *Lutzomyia peruensis*. **Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)**, Department of Biological Sciences, University of Salford, UK., v. 42, n. 1, p. 60–62, 1991. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/2052859>.

WALLER, D. ...; SAMPSON, A. ... Principles of pharmacology and mechanisms of drug action. **Medical Pharmacology and Therapeutics**, [S. l.], p. 3–31, 2018.

WANG, Shuyuan; SOLENOV, Evgeniy I.; YANG, Baoxue. Aquaporin Inhibitors. In: [s.l.: s.n.]. p. 317–330. DOI: 10.1007/978-981-19-7415-1_22. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-981-19-7415-1_22.

WEN, Zhimou; GULIA, Monika; CLARK, Kevin D.; DHARA, Animesh; CRIM, Joe W.; STRAND, Michael R.; BROWN, Mark R. Two insulin-like peptide family members from the mosquito *Aedes aegypti* exhibit differential biological and receptor binding activities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 328, n. 1–2, p. 47–55, 2010. DOI: 10.1016/j.mce.2010.07.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720710003643>.

WIECZOREK, Helmut; BEYENBACH, Klaus W.; HUSS, Markus; VITAVSKA, Olga. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. [S. l.], p. 1611–1619, 2009. DOI: 10.1242/jeb.030007.

WILLIAMS, James C.; HAGEDORN, Henry H.; BEYENBACH, Klaus W. Dynamic changes in flow rate and composition of urine during the post-bloodmeal diuresis in *Aedes aegypti* (L.). **Journal of Comparative Physiology ■ B**, [S. l.], v. 153, n. 2, p. 257–265, 1983. DOI: 10.1007/BF00689629.

WU, Qi; BROWN, Mark R. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 1–24, 2006. DOI:

10.1146/annurev.ento.51.110104.151011. Disponível em:
<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.51.110104.151011>.

WULLSCHLEGER, Stephan; LOEWITH, Robbie; HALL, Michael N. TOR Signaling in Growth and Metabolism. **Cell**, [S. l.], v. 124, n. 3, p. 471–484, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406001085>.

YOUNG, David G.; DUNCAN, Margo A. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. [s.l.: s.n.]. v. 89 DOI: 10.1016/0035-9203(95)90687-8.

ZIMMERMANN, Bernhard et al. Distribution and serotonin-induced activation of vacuolar-type H⁺-ATPase in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. [S. l.], p. 1867–1876, 2003. DOI: 10.1242/jeb.00376.

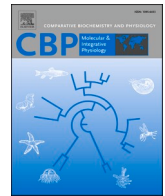
ANEXOS

Artigos publicados como primeiro autor durante o período de doutoramento:

- MALTA, Luccas Gabriel Ferreira et al. *Clogmia albipunctata* (Williston, 1893) midgut physiology: pH control and functional relationship with Lower Diptera (nematoceran) especially with hematophagous species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 290, p. 111584, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111584>

- MALTA, Luccas Gabriel Ferreira et al. A brief look at sexual dimorphism in the midgut morphology of lower Diptera and its implications for hematophagy. *Zoologischer Anzeiger*, v. 313, p. 115-119, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2024.10.002>

- MALTA, Luccas Gabriel Ferreira et al. Intestinal flow and digestive parameters of *Lutzomyia longipalpis* larvae. *Journal of Insect Physiology*, v. 161, p. 104748, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2025.104748>



Research Article

Clogmia albipunctata (Williston, 1893) midgut physiology: pH control and functional relationship with Lower Diptera (nematoceran) especially with hematophagous species

Luccas Gabriel Ferreira Malta, Leonardo Barbosa Koerich, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa, Ricardo N. Araujo, Mauricio Roberto Viana Sant'Anna, Marcos H. Pereira, Nelder Figueiredo Gontijo^{*}

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Edited by Michael Hedrick

Keywords:

Clogmia albipunctata
Hematophagy
Intestinal physiology
Exaptation
Midgut pH

ABSTRACT

Clogmia albipunctata (Williston, 1893) is a non-hematophagous insect belonging to the order Diptera, suborder Nematocera (Lower Diptera) and family Psychodidae. In the present work, we investigated how *C. albipunctata* control their midgut pH under different physiological conditions, comparing their midgut physiology with some nematoceran hematophagous species. The *C. albipunctata* midgut pH was measured after ingestion of sugar, protein and under the effect of the alkalinizing hormone released in the hemolymph of the hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis* obtained just after a blood meal. The midgut pH of unfed or sugar-fed *C. albipunctata* is 5.5–6, and its midgut underwent alkalization after protein ingestion or under treatment with hemolymph collected from blood fed *L. longipalpis*. These results suggested that in nematocerans, mechanisms for pH control seem shared between hematophagous and non-hematophagous species. This kind of pH control is convenient for successful blood digestion. The independent evolution of many hematophagous groups from the Lower Diptera suggests that characteristics involved in midgut pH control were already present in non-hematophagous species and represent a readiness for adaptation to this feeding mode.

1. Introduction

Clogmia albipunctata (Williston, 1893) is a dipteran belonging to the Lower Diptera (the ancient suborder Nematocera), infraorder Psychodomorpha, and family Psychodidae, and is commonly known as moth fly, drain fly, sewer fly, or bathroom fly. Although some publications still refer to this species as *Telmatoctopus albipunctatus*, *C. albipunctata* is considered the valid name by most taxonomists. *C. albipunctata* is a synanthropic and cosmopolitan insect with a holometabolous life cycle. Its semi-aquatic larvae feed on decaying sludge (Jiménez-Guri et al., 2014; Marshall, 2012). There are no descriptions in the literature about what adults normally eat. It is likely that, in their wild condition, they feed on nectar or other sugar-rich compounds. On the other hand, adults may survive perfectly well, drinking only water and using the nutritional reserves accumulated during the larval stage.

Although it is not a hematophagous insect, adult *C. albipunctata* may

act as potential mechanical vectors of pathogens (Faulde and Spiesberger, 2012, 2013), and their larvae also have the potential to cause pseudomyiasis (El-Badry et al., 2014; El-Dib et al., 2017; Mokhtar et al., 2016). The ancient suborder Nematocera is a paraphyletic group, and this taxonomic category has fallen into disuse, with some authors referring to this group as Lower Diptera (Blagoderov et al., 2007; Oosterbroek and Courtney, 1995; Sinclair, 1992; Wiegmann et al., 2011; Yeates et al., 2007). In this group of numerous insects, we find several species with hematophagous females (6188 species in 71 genera - Ribeiro and Arcà, 2009), such as mosquitoes (Culicidae), sandflies (Psychodidae), black midges (Simuliidae), biting midges (Ceratopogonidae), and frog-biting midges (Corethrellidae). All these hematophagous families belong to the Culicomorpha infraorder, except the sandflies which are from the family Psychodidae and Infraorder Psychodomorpha. Currently, there are no blood-sucking species in the family Chironomidae (Infraorder Culicomorpha); however, some

^{*} Corresponding author.

E-mail address: nelder@icb.ufmg.br (N.F. Gontijo).

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111584>

Received 28 November 2023; Received in revised form 11 January 2024; Accepted 12 January 2024

Available online 14 January 2024

1095-6433/© 2024 Elsevier Inc. All rights reserved.

species in this family have well-developed mouth parts similar to those observed in blood-sucking insects (Azar and Nel, 2012). Into the Lower Diptera, hematophagy appeared independently in these families (Wiegmann et al., 2011), and it is associated with the development of oocytes inside the female ovary (Adams, 1999). The independent appearance of hematophagy suggests adaptation readiness for this feeding mode among the species of the group.

As a consequence of the Lower Diptera phylogenetic proximity, insects within this group may share several physiological mechanisms, including those involved in midgut functioning. For years, our research group has been studying how some hematophagous Diptera, such as the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Infraorder Psychodomorpha, Family Psychodidae, Subfamily Phlebotominae) (Barguil Nepomuceno et al., 2022; Gontijo et al., 1998; Nepomuceno et al., 2020; Santos et al., 2008, 2011, 2014), and the mosquito *Aedes aegypti* (Infraorder Culicomorpha, Family Culicidae, Subfamily Culicinae) (Nepomuceno et al., 2017), control their midgut pH in different physiological conditions. In these studies, we observed the following pattern between the two hematophagous species studied to date: The pH of the unfed female midgut is actively maintained at 6, even when the insect is challenged by the ingestion of buffered solutions with an alkaline pH. This pH -6.0 maintenance is associated with the functioning of V-ATPases, which are present in the apical region of the midgut cells. Its function is to pump H^+ ions from the midgut cell's cytoplasm to the gut lumen whenever necessary to bring the pH back to 6.0 (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2008, 2011).

When females ingest blood or even purified proteins, their abdominal midgut undergoes a drastic change in which the pH -6.0 maintenance mechanism is turned off, and the midgut undergoes alkalinization by a set of physiological mechanisms working together. The first mechanism involves the CO_2 release from the ingested blood, a process similar to respiratory alkalosis (Santos et al., 2008). The second involves amino acid transporters (PAT carriers) that perform amino acid/ H^+ symport. In the alkalinization promoted by PAT carriers, the uptake of amino acids into the midgut cells from blood digestion removes H^+ ions from the gut lumen (Nepomuceno et al., 2020). The third mechanism involves pumping bicarbonate ions into the lumen linked with the pH -6.0 maintenance mechanism shuts down (Santos et al., 2008). This third mechanism is stimulated by one or more alkalinizing hormones released by endocrine cells of the gut (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2008, 2011). It is possible that hormones from other endocrine organs also influence this process (Adams, 1999; Orchard and Lange, 2006). Curiously, alkalinizing hormones from the sand fly *L. longipalpis* stimulate the midgut alkalinization of female *A. aegypti* in ex vivo preparations (Nepomuceno et al., 2017). This alkalinization highlights the physiological similarity between species of different Lower Diptera Infraorders (Psychodomorpha and Culicomorpha). No study has been carried out involving males of these two species. Males are not hematophagous and, consequently, are not vectors of vertebrate pathogens.

In the current study, we investigated some aspects of midgut pH control in *C. albipunctata* with the objective of comparing a non-hematophagous species with the two hematophagous species already studied: *L. longipalpis* and *A. aegypti*. Our results indicate that *C. albipunctata* seems similar to these hematophagous insects regarding pH control. Considering the results, we hypothesize that midgut pH control mechanisms among Lower Diptera may be evolutionary conserved, at least within the Culicomorpha and Psychodomorpha infraorders.

2. Material and methods

2.1. Insects

C. albipunctata (Williston, 1893) used in the experiments originated from a laboratory colony obtained from insects captured in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The colony is kept at 25 °C in plastic pots

containing sand and water. The sand is arranged at the bottom of the recipients with an inclination, so the water covers half of its surface. Adults captured in the bathroom or originating from the colony are transferred to the pots where they lay eggs. In these conditions, it is not necessary to feed them. The larvae are fed with powdered laboratory mouse chow every three days. Probably any kind of animal lab chow will be satisfactory. The humidity inside the pot is enough for adults to be fine until they are transferred to the cloth cages used for sand fly breeding (Modi and Tesh, 1983). It is sufficient to offer the adults water soaked in cotton. The cages are placed in plastic bags with a sponge soaked in water inside, but not in contact with the insects in the cage. The experiments were performed with 3- to 6-day-old insects.

The sandflies *L. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) were obtained from a laboratory colony originated in Teresina, Piauí, Brazil, and maintained according to standard procedures as described by Modi and Tesh (1983). Three-to-four-day-old females were used in the experiments for hemolymph collection. The sand fly maintenance protocol was approved by the ethics committee on animal experimentation (CETEA/UFMG) under protocol number 001/2017.

2.2. Midgut pH measurement

Midgut pH measurement followed the protocol established by Gontijo et al. (1998). Briefly, adult insects (males and females) were fasted for 24 h and fed on a 30% sucrose solution through soaked cotton wool containing 0.1% of the indicator dye bromothymol blue (Sigma-Aldrich code 18470) ($pK_a = 7.4$) or bromocresol purple (Sigma-Aldrich code 860891) ($pK_a = 6.3$). The unbuffered solutions of bromothymol blue and bromocresol purple had their pH adjusted to pH 7.5 and pH 6.5, respectively. The next day, the insects were dissected in 0.9% saline using a stereomicroscope, and the insect midgut color was compared with standards containing the dyes in buffered solutions (Fig. 1). To show that sucrose does not influence the pH control in the midgut, a control group received only water containing either 0.1% bromothymol blue or bromocresol purple.

In some experiments, the ingested sucrose solutions were buffered with 30 mM HEPES (Sigma-Aldrich code 183264) at pH 7.5. These buffered solutions were used to check whether the guts of *C. albipunctata* were able to overcome the buffering capacity of these solutions and restore the normal gut pH (pH 6.0).

To study the effect of proteins and amino acids on the *C. albipunctata*



Fig. 1. Standard colors of Bromothymol Blue and Bromocresol Purple at different pH. (A) Buffered standard solutions from pH 6.0 to pH 8.0 containing 0.1% Bromothymol Blue. (B) Buffered standard solutions from pH 5.0 to pH 7.0 containing 0.1% Bromocresol Purple. (C) Buffered standard solutions from pH 6.0 to pH 8.0 containing 0.1% Bromothymol Blue and serum. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

gut pH, we offered the insects inactivated human serum (heated at 56 °C for 30 min) containing 0.1% bromothymol blue (serum pH adjusted to pH 6.0). pH measurements were estimated by comparing the color obtained in dissected midguts with standard buffered solutions containing serum (Santos et al., 2011) (Fig. 1C).

2.3. Effect of *L. longipalpis* hemolymph on male and female *C. albipunctata* midgut pH

In our experiments, the hemolymph of female *L. longipalpis* was used as a source of alkalinizing hormones. To this end, three female *L. longipalpis* were washed with PBS containing a drop of common dish detergent to remove the bristles. The insects were immediately washed in saline without detergent and transferred to a microscope slide containing a drop of PBS (1 µL), where their thorax was disrupted under a dissecting microscope with care to avoid gut rupture. The hemolymph was carefully collected with a pipette and was then applied to a dissected midgut of male or female *C. albipunctata*, which was previously fed with 30% sucrose containing 0.1% bromothymol blue. Only guts that initially had a normal pH (pH 6.0) were used in the experiments. Midgut desiccation was avoided by placing the guts on 0.5% agarose blocks prepared with insect saline (119.7 mmol L⁻¹ NaCl, 2.68 mmol L⁻¹ KCl, 1.36 mmol L⁻¹ CaCl₂, and 0.56 mmol L⁻¹ glucose) (Santos et al., 2011). The midgut pH was measured five minutes after hemolymph addition, comparing the color observed in the midgut with standard pH solutions containing the indicator dye. As a control, hemolymph collected from unfed females was used.

2.4. Statistical analysis

The Fisher's exact test was performed to analyze changes in proportion after treatment with *L. longipalpis* hemolymph (Tables 3 and 4), using the software GraphPad PRISM 7. The results were considered significant at $p \leq 0.05$. Each insect analyzed was an independent experiment.

3. Results

3.1. The pH of male and female *C. albipunctata* midguts is acidic (pH 5.5–6.0)

In line with previous work investigating the midgut pH of *L. longipalpis* and *A. aegypti* (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2008), the midgut of female *C. albipunctata* is acidic, with a pH between 5.5 and 6.0. Male midguts presented the same pH pattern observed for females (Table 1). In flies that ingested water without sucrose, the pH measurements generated similar results, indicating that sucrose do not influence *C. albipunctata* midgut pH (Table 1).

Table 1
Male and Female *C. albipunctata* midgut pH.

Treatment	Male/ Female	N for BP		N for BB	
		pH ≤ 5.5	pH > 5.5	pH ≤ 6.0	pH > 6.0
0.1% Bromocresol Purple	Male	14	1	–	–
+30% Sucrose	Female	15	0	–	–
0.1% Bromothymol Blue	Male	–	–	16	4
+30% Sucrose	Female	–	–	13	2
0.1% Bromothymol Blue +	Male	–	–	15	0
Water	Female	–	–	9	1

The midgut pH of male and female *C. albipunctata* was measured after ingestion of a 30% sucrose solution containing 0.1% of the indicator dyes bromothymol blue or bromocresol purple, and the midgut pH was measured in males and females fed on 0.1% bromothymol blue with water. N: number of observations; BP: bromocresol purple; BB: bromothymol blue.

3.2. *C. albipunctata* midgut pH is actively maintained at 5.5–6.0

The acidic pH found in the midguts of male and female *C. albipunctata* is actively maintained within the range of pH 5.5–6.0, similarly to what was observed for other hematophagous species (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2011). This physiological mechanism was evident when insects were challenged with 30 mM HEPES pH 7.5 mixed with a 30% sucrose solution containing the indicator dye bromothymol blue. The mechanism responsible for pH 5.5–6.0 maintenance was able to re-acidify the buffered solution, restoring the normal pH in both males and females. Since the crop pH is not physiologically controlled, the ingested HEPES solution remained at pH 7.5 (Table 2).

3.3. The gut alkalization mechanism is activated when female *C. albipunctata* ingests inactivated human serum

Male and female *C. albipunctata* were able to alkalinize their midguts after ingestion of a protein-rich diet containing amino acids and proteins such as inactivated human serum, similarly to what was observed with female *L. longipalpis* and *A. aegypti* (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2011). This human serum had its pH previously adjusted to pH 6.0, so any alkalization observed in this experiment must be attributed to a physiological alkalization mechanism. According to the results presented in Table 3, the observed number of alkalinized midguts was higher in females than in males.

3.4. *C. albipunctata* female midguts undergo alkalization when exposed to the hemolymph of blood fed *L. longipalpis* females

In a previous study, dissected guts of female *L. longipalpis* and *A. aegypti* containing the indicator dye bromothymol blue and exposed to the hemolymph of blood-fed female *L. longipalpis* underwent gut alkalization (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2011). To investigate whether *C. albipunctata* has a similar pH control influenced by the hemolymph of blood-fed *L. longipalpis*, male and female guts of *C. albipunctata* were also exposed to *L. longipalpis* hemolymph. The results presented in Table 4 showed that only female midguts responded to the *L. longipalpis* hemolymph, becoming more alkaline. As expected, hemolymph from unfed *L. longipalpis* females was inefficient in modulating *C. albipunctata* luminal pH.

4. Discussion

The Lower Diptera group encompasses different infraorders, including the infraorders Culicomorpha and Psychodomorpha, corresponding to many families (Oosterbroek and Courtney, 1995; Trautwein et al., 2012; Wiegmann et al., 2011; Yeates et al., 2007). The hematophagous insects included within these two important infraorders are mosquitoes, sandflies, black midges, biting midges, and frog-biting midges, belonging to the families Culicidae, Psychodidae, Simuliidae,

Table 2
Male and Female *C. albipunctata* midgut pH fed on buffered solution.

Treatment	Male/ Female	Anatomical localization	N	
			pH ≤ 6.0	pH > 6.0
0.1% Bromothymol blue + 30% Sucrose	Male	Crop	0	15
		Midgut	14	1
	Female	Crop	0	20
		Midgut	20	0

The pH in the midgut of sugar-fed *C. albipunctata* is actively maintained at 5.5–6.0. The midgut pH of male and female *C. albipunctata* was measured after ingestion of a 30% sucrose solution containing 0.1% of the indicator dye bromothymol blue buffered with 30 mM HEPES pH 7.5. N – Number of observations.

Table 3

Midgut alkalization of male and female *C. albipunctata*.

Treatment	Male/ Female	Number of observations for control		Number of observations for HS		p Value
		pH ≤ 6.0	pH > 6.0	pH ≤ 6.0	pH > 6.0	
0.1% Bromothymol blue +30% Sucrose (Control)	Male	16	4	—	—	—
	Female	13	2	—	—	—
0.1% Bromothymol Blue + Inactivated Human Serum (HS)	Male	—	—	5	10	< 0.01
	Female	—	—	1	12	< 0.0001

Midgut alkalization of male and female *C. albipunctata* after ingestion of inactivated human serum. The pH was measured in male and female midguts after ingestion of a 30% sucrose solution containing 0.1% bromothymol blue (control) or after ingestion of inactivated human serum (HS) containing 0.1% bromothymol blue with a pH previously adjusted to 6.0. Sucrose intake does not influence the gut pH (Table 1). For this reason, sucrose was not added to the serum. The Fisher's exact test was performed to compare the proportions observed between each treatment. The *p* value is shown in the table.

Table 4

Midgut alkalization under treatment with *Lutzomyia longipalpis* hemolymph.

Treatment	Male/ Female	N BHA		N AHA		p Value
		pH ≤ 6.0	pH > 6.0	pH ≤ 6.0	pH > 6.0	
Before hemolymph application (Control)	Male	15	0	—	—	—
	Female	21	0	—	—	—
After blood-fed hemolymph application	Male	—	—	8	0	1
	Female	—	—	3	9	<0.0001
After non blood-fed hemolymph application	Male	—	—	6	1	0.3182
	Female	—	—	7	2	0.0828

The effect of blood-fed and non-blood-fed *L. longipalpis* female hemolymph's on the midgut pH of male and female *C. albipunctata*. The pH was inferred based on the color presented in the midgut lumen in comparison to standards. The control group indicates the pH value before hemolymph application. The number of observations in each treatment was compared with that of the control using the Fisher's exact test. N BHA - Number of observations before hemolymph application; N AHA - Number of observations after hemolymph application.

Ceratopogonidae, and Corethrellidae, respectively. In hematophagous species within these families, only females ingest blood that is used for the development of their ovaries. According to most recent phylogenetic studies (Hedges et al., 2015; Wiegmann et al., 2011; Yeates et al., 2007), the insects from the Culicomorpha infraorder and Psychodidae family (from Psychodomorpha infraorder) separated approximately 250 million years ago during the Triassic period (the timeline was calculated at www.timetree.org/) (Kumar et al., 2017).

Despite such a long divergence period, our studies showed that the gut physiology regarding pH control seems similar between species of these two infraorders (*L. longipalpis* and *A. aegypti*). Interestingly, in the current study, we showed that the non-hematophagous species *C. albipunctata* might share the basic mechanisms involved in midgut pH control with *L. longipalpis* and *A. aegypti* females. If species belonging to two different infraorders with different eating habits have similar characteristics regarding pH control in the midgut, these characteristics might be evolutionarily conserved. In fact, the characteristics of the digestive process in insects have a strong relationship with phylogeny (Terra and Ferreira, 2020).

The pH is a characteristic of great importance for many biological functions (Applebaum, 1985; Terra and Ferreira, 1994; Wolfson and

Murdock, 1990). Consequently, it is finely controlled in different organs and cellular compartments to guarantee homeostasis (Demaurex, 2002). During digestion, the pH in the lumen of the insect digestive tract has a central role, as digestive enzymes have maximum activity in a well-defined pH range (Applebaum, 1985; Harrison, 2001; Terra and Ferreira, 1994). That is the case of the Lower Diptera. In the current study, we observed that the midguts of male and female *C. albipunctata*, are acidic, with pH around 5.5–6.0. To date, only the gut pH of female *L. longipalpis* and *A. aegypti* had been investigated in detail (Gontijo et al., 1998; Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2008). In these blood-sucking females, the acidic pH is related to the ingestion of plant sap, flower nectar, and secretions from aphids, all sugar-rich diets (Gontijo et al., 1998). One of the main classes of enzymes involved in carbohydrate digestion in those insects are alpha-glucosidases, which have their maximum activity in acidic pH (Gontijo et al., 1998; Santos et al., 2011). In *C. albipunctata*, both sexes have the same midgut pH value when fed on sucrose or when insects were offered just water. That is not surprising, as *C. albipunctata* males and females share the same ecological niche and therefore ingests the same type of food. Males of hematophagous species probably have the same gut pH pattern, but this remains to be investigated.

In Lower Diptera, midgut alkalization after protein ingestion is relevant because proteolytic enzymes responsible for protein digestion (trypsin and chymotrypsin) work at an alkaline pH (Lopes et al., 2004; Terra and Ferreira, 1994). Curiously, non-hematophagous female *C. albipunctata* undergoes gut alkalization after feeding with serum. This alkalization occurred when they ingested inactivated serum at pH 6.0 (Table 3). Such alkalization seems less effective in males. It is not known whether *C. albipunctata* can digest proteins as well as female *L. longipalpis* and *A. aegypti* (Isoe et al., 2009; Noriega et al., 2002; Noriega and Wells, 1999; Soares et al., 2011; Telleria et al., 2007). In our colony, *C. albipunctata* adults can normally reproduce by ingesting only pure water. Although they accept a sugar meal, it seems that they prefer water. However, they alkalize the midgut, as hematophagous females do after protein ingestion. In our experiments, it was necessary to force the ingestion of serum by keeping the insects fasting for 24 h.

In unpublished experiments, we observed that *C. albipunctata* unfed females present a small trypsinolytic activity in the midgut, similar to the early trypsin from *L. longipalpis* (Telleria et al., 2007) and *A. aegypti* (Noriega and Wells, 1999) unfed adults. Curiously, serum ingestion by *C. albipunctata*, instead of promoting an increase in this activity, does the opposite. In *L. longipalpis* and *A. aegypti* the early trypsin drops down after blood ingestion and is substituted by a digestive trypsin (the late trypsin). Something like this could happen when *C. albipunctata* ingests proteins; the production of its early trypsin drops, but this species probably does not have a late trypsin whose production could be activated. A study on the production of digestive proteases may clarify this issue.

According to Yang and Davies (1968a, 1968b), sucrose and blood digestion occur in the midguts of some species of simuliids (Lower Diptera Culicomorpha family Simuliidae), similarly as in other hematophagous species such as *L. longipalpis* and *A. aegypti*. Although these authors did not measure the pH in insects fed and not fed with blood, the optimum pH of the enzymes responsible for sucrose and blood digestion is 6.2 and 8.4, respectively. As in mosquitoes and sandflies, the digestion of these nutrients is compartmentalized. While blood would be digested in the abdominal midgut, surrounded by a type I peritrophic membrane (Reid and Lehane, 1984), sucrose digestion would occur in the thoracic midgut. These results indicate that the simuliids abdominal midgut undergoes alkalization for blood digestion. Probably, the thoracic midgut remains acidic during blood digestion, as in *L. longipalpis* (Santos et al., 2008) and *A. aegypti* (Nepomuceno et al., 2017). Since the blood-fed *L. longipalpis* hemolymph induces alkalization in female *C. albipunctata* and *A. aegypti*, we can assume that the biochemical apparatus responsible for alkalization via hormonal action must be shared between these three species and is restricted to the females.

The gut pH control mechanisms observed in our studies are only applicable to adults of the Lower Diptera, as the immature forms are profoundly different in relation to their morphology and physiology. In fact, the gut morphology and physiology of *A. aegypti* and *L. longipalpis* larvae are very different from the gut morphology and physiology of adult insects. These larvae have a tubular midgut that is highly alkaline in their anterior portion and practically do not stop feeding in order to store nutrients necessary for metamorphosis (Moffett et al., 2012; Onken et al., 2008, 2009a, 2009b). Their peritrophic membranes are also tubular and are continuously formed from the anterior extremity of the midgut (Edwards and Jacobs-Lorena, 2000; Secundino et al., 2005). There are no published studies on digestion in *C. albipunctata* larvae, but the morphology of the larval gut is very different from the morphology of the adult gut, like what occurs between the two hematophagous species above mentioned (our unpublished observation).

Unlike the Lower Diptera, many adult insects from the suborder Brachycera, Infraorder Muscomorpha, and subsection Calyptratae have gut morphology and physiology very similar to that of the larvae from the same group (Barroso et al., 2020; Boonsriwong et al., 2011; Cezar, 2021; Terra and Regal, 1995; and our personal observation). That is the case of *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala* and other flies. These insects have a relatively long and tubular midgut divided into three portions: a slightly acidic anterior region, an acidic middle portion (nearby pH 3), and a slightly acidic posterior portion. As larvae, the adults present a tubular midgut with a tubular peritrophic membrane disposed along the midgut (Waterhouse, 1953). A neotenic retention of these larval characteristics occurred in this group of insects. To the best of our knowledge, there is no published information on the gut morphology and physiology of Lower Brachycera species.

Due to the physiological importance of pH in the midgut, it is actively and finely controlled in blood-sucking insects. In these insects, the action of proton pumps (V-ATPases) exists to reacidify the midgut if its pH rises above pH 6.0 in insects that have not ingested blood (Nepomuceno et al., 2017; Patrick et al., 2006; Santos et al., 2011). Our results suggest that this fine and active control is also present in *C. albipunctata* males and females, which were able to reacidify a buffered alkaline solution as soon as it was ingested (Table 2). To be able to reacidify the midgut, V-ATPases need to pump H^+ ions into the lumen. This means that these pumps are located in the apical region of the midgut cells, as in adult mosquitoes and in *L. longipalpis* (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2008). As soon as pH 6.0 is restored, the V-ATPases stop pumping H^+ ions to the lumen (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2008). In an alkalinized midgut, V-ATPases must remain turned off; otherwise, they would prevent lumen alkalinization and protein digestion. In *L. longipalpis*' midgut and probably in the other Lower Diptera adult hematophagous, the membrane potential is maintained by the Na^+/K^+ -ATPase (Barguil Nepomuceno et al., 2022), probably localized at the basolateral side of the midgut cells.

The maintenance of pH 6.0 indicates that *C. albipunctata* is physiologically prepared to feed on sucrose or any other carbohydrate that is digested by alpha-glucosidases with an optimum pH of 6.0. In fact, *C. albipunctata* midgut presents an alpha-glucosidase that works at pH 6.0 (data not published), such as the alpha-glucosidases observed in *L. longipalpis* (Gontijo et al., 1998) and *A. aegypti* midguts (Nepomuceno et al., 2017). Information on the midgut pH of Lower Diptera adults from infraorders other than Culicomorpha and Psychodomorpha is very scarce. Most studies were carried out with larvae, which have gut morphology and physiology very different from adults. However, it was possible to draw some inferences regarding the gut pH of adult insects from other Lower Diptera infraorders. In *Trichosia pubecens* adults (a Lower Diptera from Infraorder Bibionomorpha), the luminal pH in the anterior midgut, measured with indicator dyes, is 7.4 (Espinoza-Fuentes et al., 1984). Although slightly alkaline, the midgut is considerably more acidic than the larval gut (pH 10.2 in its initial portion). In this sense, this species is like *A. aegypti* and *L. longipalpis*, which have larvae with very alkaline anterior midguts. Although the pH measured with

indicator dyes is slightly alkaline in *Trichosia pubecens*, the optimum pH of alpha-glucosidase and trehalase (pH 6.0) indicates a relatively acidic midgut. Sometimes, the optimum pH of some glycosidases immobilized on the midgut cells' surface, such as the alpha-glucosidase, may differ from the midgut pH in consequence of a buffered mucus that overlays the midgut cells (Dias et al., 2018). That seems not to be the case with the alpha-glucosidase encountered in the *C. albipunctata* midgut, because its optimum pH and the luminal pH are coincident. In *Rhynchosciara americana* adults (another Lower Diptera species from the Infraorder Bibionomorpha), the luminal pH of the midgut may be slightly acidic. Such pH can be inferred from the optimum pH of the luminal alpha-amylase (Ferreira et al., 1993). Curiously, the *Rhynchosciara* midgut presents a slight trypsin activity presumably produced in an acidic environment similar to that observed in *C. albipunctata*, *L. longipalpis*, and *A. aegypti*, as mentioned above. Unfortunately, there is also no information on what would happen to the midgut pH after protein ingestion and no useful information in the scientific literature about digestion in insects from other Diptera infraorders.

Evolutionary adaptations may be observed from two viewpoints: the first involves characters shaped by natural selection for their current function; the second describes characteristics that add adaptive value to a given physiological function, not necessarily linked with the evolutionary pressures responsible for its selection. The second perspective is known as exaptation (Gould and Vrba, 1982). The proposition that exaptation events may be involved in adaptations related to hematophagy development arises from the fact that in the Lower Diptera, hematophagy appeared in multiple and independent events (Adams, 1999; Oosterbroek and Courtney, 1995; Wiegmann et al., 2011). From the parsimony perspective, the evolutionary course always follows the pathway that needs fewer steps for a character to be established (Sober, 1983). Therefore, when the evolutionary pressure acts on a characteristic already present in an organism, it is expected that the "evolutionary effort" will be smaller than that used to select a new character. Based on this, it is possible that many mechanisms present in hematophagous insects that control gut pH after a blood meal are also present in non-hematophagous Lower Diptera.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - INCT- Entomologia Molecular - CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG.

CRediT authorship contribution statement

Luccas Gabriel Ferreira Malta: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Leonardo Barbosa Koerich:** Project administration, Funding acquisition. **Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa:** Funding acquisition. **Ricardo N. Araujo:** Project administration, Funding acquisition. **Mauricio Roberto Viana Sant'Anna:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Marcos H. Pereira:** Software, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Nelder Figueiredo Gontijo:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a

potential conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors would like to thank César Nonato de Oliveira for technical assistance.

References

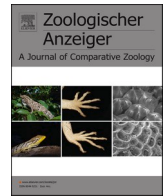
- Adams, T.S., 1999. Hematophagy and hormone release. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92, 1–13. <https://doi.org/10.1093/aesa/92.1.1>.
- Applebaum, W.S., 1985. Biochemistry of digestion. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, New York, pp. 279–311.
- Azar, D., Nel, A., 2012. Evolution of hematophagy in “non-biting midges” (Diptera: Chironomidae). *Terr. Arthropod Rev.* 5, 15–34. <https://doi.org/10.1163/187498312x620577>.
- Barguil Nepomuceno, D., Dávila Pessoa, G.C., Nascimento Araújo, R., Barbosa Koerich, L., Viana Sant’Anna, M.R., Horácio Pereira, M., Figueiredo Gontijo, N., 2022. Na⁺/K⁺-ATPase activation by cAMP in the Midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912; Diptera: Psychodidae). *J. Insect Sci.* 22 <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieac008>.
- Barroso, I.G., Fuzita, F.J., Ferreira, C., Terra, W.R., 2020. Midgut fluxes and digestive enzyme recycling in *Musca domestica*: a molecular approach. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 241, 110627 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110627>.
- Blagoderov, V., Grimaldi, D.A., Fraser, N.C., 2007. How time flies for flies: diverse Diptera from the Triassic of Virginia and early radiation of the order. *Am. Mus. Novit.* 3572, 1–39. [https://doi.org/10.1206/0003-0082\(2007\)509\[1:thfffd\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1206/0003-0082(2007)509[1:thfffd]2.0.co;2).
- Boonsriwong, W., Sukontason, K., Vogtsberger, R.C., Sukontason, K.L., 2011. Alimentary canal of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): an emphasis on dissection and morphometry. *J. Vector Ecol.* 36, 2–10. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00135.x>.
- Cezar, R.S.M., 2021. Estudo da fisiologia da glândula salivar e do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). Universidade Federal de Minas Gerais.
- Demaurex, N., 2002. pH homeostasis of cellular organelles. *News Physiol. Sci.* 17, 1–5. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2002.17.1.1>.
- Dias, R.O., Cardoso, C., Pimentel, A.C., Damasceno, T.F., Ferreira, C., Terra, W.R., 2018. The roles of mucus-forming mucins, peritrophins and peritrophins with mucin domains in the insect midgut. *Insect Mol. Biol.* 27, 46–60. <https://doi.org/10.1111/imb.12340>.
- Edwards, M.J., Jacobs-Lorena, M., 2000. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *J. Insect Physiol.* 46, 1313–1320. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00053-6).
- El-Badry, A.A., Salem, H.K., Hair, El-Aziz Edmardash, Y.A.B., 2014. Human urinary myiasis due to larvae of *Clogmia (Telmatoscopus) albipunctata* Williston (Diptera: Psychodidae) first report in Egypt. *J. Vector Borne Dis.* 51, 247–249.
- El-Dib, N.A., El Wahab, W.M.A., Hamdy, D.A., Ali, M.I., 2017. Case report of human urinary myiasis caused by *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodidae) with morphological description of larva and pupa. *J. Arthropod. Borne Dis.* 11, 533–538.
- Espinosa-Fuentes, F.P., Ferreira, C., Terra, W.R., 1984. Spatial organization of digestion in the larval and imaginal stages of the sciarid fly *Trichosia pubescens*. *Insect Biochem* 14, 631–638. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(84\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0020-1790(84)90040-4).
- Faulde, M., Spiesberger, M., 2012. Hospital infestations by the moth fly, *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae), in Germany. *J. Hosp. Infect.* 81, 134–136. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.04.006>.
- Faulde, M., Spiesberger, M., 2013. Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. *J. Hosp. Infect.* 83, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.09.019>.
- Ferreira, C., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1993. Ultrastructural and biochemical aspects of digestion in the imagoes of the fly *Rhynchosciara americana*. *Entomol. Exp. Appl.* 66, 135–143. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb00701.x>.
- 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. *Exp. Parasitol.* 90, 212–219. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4336>.
- Gould, S.J., Vrba, E.S., 1982. Exaptation—a missing term in the science of form. *Paleobiology* 1, 4–15. <https://doi.org/10.1017/S0094837300004310>.
- Harrison, J.F., 2001. Insect Acid-Base Physiology. *Annu. Rev. Entomol.* 46, 221–250. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.221>.
- Hedges, S.B., Marin, J., Suleski, M., Paymer, M., Kumar, S., 2015. Tree of life reveals clock-like speciation and diversification. *Mol. Biol. Evol.* 32, 835–845. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv037>.
- Isoe, J., Rascón, A.A., Kunz, S., Miesfeld, R.L., 2009. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 903–912. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.008>.
- Jiménez-Guri, E., Wotton, K.R., Gavilán, B., Jaeger, J., 2014. A staging scheme for the development of the moth midge *Clogmia albipunctata*. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084422>.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Hedges, S.B., 2017. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Mol. Biol. Evol.* 34, 1812–1819. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx116>.
- Lopes, A.R., Juliano, M.A., Juliano, L., Terra, W.R., 2004. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 55, 140–152. <https://doi.org/10.1002/arch.10134>.
- Marshall, S.A., 2012. Flies. *The natural history & diversity of Diptera*. Firsted. Firefly Books 107–143.
- Modi, G.B., Tesh, R.B., 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 20, 568–569. <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.5.568>.
- Moffett, D.F., Jagadeeswaran, U., Wang, Z., Davis, H.M., Onken, H., Goss, G.G., 2012. Signaling by intracellular Ca²⁺ and H⁺ in larval mosquito (*Aedes aegypti*) midgut epithelium in response to serosal serotonin and lumen pH. *J. Insect Physiol.* 58, 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.11.019>.
- Mokhtar, A.S., Braima, K.A.O., Peng Chin, H., Jeffery, J., Mohd Zain, S.N., Rohela, M., Lau, Y.L., Jamaiah, I., Wilson, J.J., Abdul-Aziz, N.M., 2016. Intestinal Myiasis in a Malaysian patient caused by larvae of *Clogmia albipunctatus* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 53, 957–960. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw014>.
- Nepomuceno, D.B., Santos, C., Nascimento, R., Hora, M., 2017. pH Control in the Midgut of *Aedes aegypti* under Different Nutritional Conditions, pp. 3355–3362. <https://doi.org/10.1242/jeb.158956>.
- Nepomuceno, D.B., Paim, R.M.M., Araújo, R.N., Pereira, M.H., Pessoa, G.C.D.A., Koerich, L.B., Sant’Anna, M.R.V., Gontijo, N.F., 2020. The role of LuloPAT amino acid/proton symporters in midgut alkalization in the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera – Psychodidae). *J. Insect Physiol.* 120, 103973 <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103973>.
- Noriega, F.G., Wells, M.A., 1999. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 45, 613–620. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00052-9).
- Noriega, F.G., Edgar, K.A., Bechet, R., Wells, M.A., 2002. Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. *J. Insect Physiol.* 48, 205–212. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00165-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00165-2).
- Onken, H., Moffett, S.B., Moffett, D.F., 2008. Alkalinization in the isolated and perfused anterior midgut of the larval mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Sci.* 8, 1–20. <https://doi.org/10.1673/031.008.4601>.
- Onken, H., Parks, S.K., Goss, G.G., Moffett, D.F., 2009a. Serotonin-induced high intracellular pH aids in alkali secretion in the anterior midgut of larval yellow fever mosquito *Aedes aegypti* L, pp. 2571–2578. <https://doi.org/10.1242/jeb.030221>.
- Onken, H., Patel, M., Javoroncov, M., Izeirovski, S., Moffett, S.B., Moffett, D.F., 2009b. Strong Alkalinization in the anterior midgut of larval yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*): Involvement of luminal Na⁺ / K⁺ -ATPase 161, pp. 155–161. <https://doi.org/10.1002/jez.512>.
- Oosterbroek, P., Courtneay, G., 1995. Phylogeny of the nematoceros families of Diptera (Insecta). *Zool. J. Linnean Soc.* 115, 267–311. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1995.tb02462.x>.
- Orchard, I.A.N., Lange, A.B., 2006. Insect Myosuppressins / FMRFamides and FL / IRFamides / NPFs.
- Patrick, M.L., Aimanova, K., Sanders, H.R., Gill, S.S., 2006. Type Na⁺ / K⁺ -ATPase and V-Type H⁺ -ATPase Expression Patterns in the Osmoregulatory Organs of Larval and Adult Mosquito *Aedes Aegypti*, pp. 4638–4651. <https://doi.org/10.1242/jeb.02551>.
- Reid, G.D.F., Lehane, M.J., 1984. Peritrophic membrane formation in three temperate simuliids, *Simulium ornatum*, *S. equinum* and *S. lineatum*, with respect to the migration of onchocercal microfilariae. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, 527–539. <https://doi.org/10.1080/00034983.1984.11811859>.
- Ribeiro, J.M.C., Arcá, B., 2009. From Sialomes to the Sialoverse. An insight into salivary potion of blood-feeding insects. In: *Advances in Insect Physiology*, 1st ed. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(09\)37002-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(09)37002-2).
- Santos, V.C., Araújo, R.N., Machado, L.A.D., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J. Exp. Biol.* 211, 2792–2798. <https://doi.org/10.1124/jeb.019836>.
- Santos, V.C., Nunes, C.A., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2011. Mechanisms of pH control in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*: roles for ingested molecules and hormones. *J. Exp. Biol.* 214, 1411–1418. <https://doi.org/10.1242/jeb.051490>.
- Santos, V.C., Vale, V.F., Silva, S.M., Nascimento, A.A.S., Saab, N.A.A., Soares, R.P.P., Michalick, M.S.M., Araújo, R.N., Pereira, M.H., Fujiwara, R.T., 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, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111241>.
- Secundino, N.F.C., Eger-Mangrich, I., Braga, E.M., Santoro, M.M., Pimenta, P.F.P., 2005. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J. Med. Entomol.* 42, 928–938. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.6.928>.
- Sinclair, B.J., 1992. A phylogenetic interpretation of the Brachycera (Diptera) based on the larval mandible and associated mouthpart structures. *Syst. Entomol.* 17, 233–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1992.tb00335.x>.
- Soares, T.S., Watanabe, R.M.O., Lemos, F.J.A., Tanaka, A.S., 2011. Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from *Aedes aegypti* larvae and identification of digestive enzymes. *Gene* 489, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.08.018>.
- Sober, E., 1983. Parsimony in systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 14, 335–357.

- Telleria, E.L., Pitaluga, A.N., Ortigão-Farias, J.R., De Araújo, A.P.O., Ramalho-Ortigão, J. M., Traub-Cseko, Y.M., 2007. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Lutzomyia longipalpis*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 66, 53–63. <https://doi.org/10.1002/arch.20198>.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem. 109, 1–62. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4).
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2020. Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. Arthropod Struct. Dev. 56, 100931 <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100931>.
- Terra, W.R., Regel, R., 1995. pH buffering in *Musca domestica* midguts. Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol. 112, 559–564. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)02028-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)02028-4).
- Trautwein, M.D., Wiegmann, B.M., Beutel, R., Kjer, K.M., Yeates, D.K., 2012. Advances in insect phylogeny at the Dawn of the postgenomic era. Annu. Rev. Entomol. 57, 449–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100538>.
- Waterhouse, D., 1953. The occurrence and significance of the peritrophic membrane, with special reference to adult lepidoptera and diptera. Aust. J. Zool. 1, 299. <https://doi.org/10.1071/ZO9530299>.
- Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.W., Lambkin, C., Bertone, M.A., Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Pape, T., Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S.N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G.E., Thompson, F.C., Grimaldi, D.A., Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K., 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 5690–5695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012675108>.
- Wolfson, J.L., Murdock, L.L., 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. J. Chem. Ecol. 16, 1089–1102. <https://doi.org/10.1007/BF01021013>.
- Yang, Y.J., Davies, D.M., 1968a. Digestion, emphasizing trypsin activity, in adult simuliids (Diptera) fed blood, blood-sucrose mixtures, and sucrose. J. Insect Physiol. 14, 205–222. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90032-2).
- Yang, Y.J., Davies, D.M., 1968b. Occurrence and nature of invertase activity in adult black-flies (Simuliidae). J. Insect Physiol. 14, 1221–1232. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90015-2).
- Yeates, D.K., Wiegmann, B.M., Courtney, G.W., Meier, R., Lambkin, C., Pape, T., 2007. Phylogeny and systematics of Diptera: two decades of progress and prospects. Zootaxa 590, 565–590. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.27>.



Contents lists available at ScienceDirect

Zoologischer Anzeiger

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcz

A brief look at sexual dimorphism in the midgut morphology of lower Diptera and its implications for hematophagy

Luccas Gabriel Ferreira Malta, Maurício Roberto Viana Sant'anna, Marcos Horário Pereira, Nelder Figueiredo Gontijo*

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Hematophagy
Midgut morphology
Culicidae
Psychodidae
Sexual dimorphism

ABSTRACT

The insect digestive system is divided into three sections: the foregut, the midgut, and the hindgut. Specific subdivisions and modifications in these regions can characterize distinct insect groups, representing apomorphies. Since only females of hematophagous insects from nematoceran Diptera feed on blood, nearly all studies have focused on specimens of this sex, often neglecting the studies on the males' internal anatomy. In our studies of Lower Diptera (Nematocera) (*Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912, *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, and *Culex quinquefasciatus* Say, 1823), we observed differences in midgut morphology between males and females. In hematophagous species, within both Culicomorpha and Psychodomorpha, females exhibit a prominent dilation in the posterior midgut. In contrast, in Culicomorpha males only a slight dilation in the posterior region of the midgut was observed. For Psychodomorpha males, the midgut remained tubular and narrow throughout its length. Interestingly, in the non-hematophagous insect *Clogmia albipunctata* Williston, 1893 (Diptera: Psychodidae) both males and females possess a tubular and narrow midgut. Our showed that the observed differences are related to hematophagy, where all hematophagous females have a midgut with prominent posterior dilation, while females from non-hematophagous species have a narrowed midgut. These observations, if further validated, could significantly impact future studies in insect physiology and evolutionary biology, inspiring new research directions and methodologies.

1. Introduction

The insect digestive system is divided into three sections: foregut, midgut, and hindgut (Forattini, 1973; Terra and Ferreira, 2005; 1994). Specific subdivisions and modifications within these regions can characterize taxonomically distinct insect groups, representing apomorphies (Chapman, 1998; Lehane, 1992).

The order Diptera is one of the principal holometabolous orders, comprising between 400.000 and 800.000 species (Marshall, 2012), where several families with hematophagous species are found (Psychodidae, Culicidae, Corethrellidae, Ceratopogonidae, Simuliidae, Athericidae, Tabanidae, Muscidae, Glossinidae, Hippoboscidae, Streblidae, and Nycteribiidae) (Malta, 2021; Wiegmann et al., 2011). In addition to these families, there is a report about the family Chironomidae (Azar et al., 2023; Azar and Nel, 2012), a family that possibly lost species with hematophagous habits throughout their evolutionary history. Dipterans are historically divided into two suborders: Nematocera and

the Brachycera. Insects from the suborder Nematocera, which is not a monophyletic group, are often referred to as Lower Diptera by dipterologists (Lambkin et al., 2013; Wiegmann et al., 2011; Yeates et al., 2007).

Given their importance as vectors, many hematophagous Lower Diptera have been extensively studied. Among the hematophagous species, only the females feed on blood; consequently, almost all published studies have focused on females. Mosquitoes of the family Culicidae (Infraorder Culicomorpha) and sandflies of the family Psychodidae (Infraorder Psychodomorpha) are among the most studied species.

Our research group has been conducting studies on the control of intestinal pH in some species of hematophagous Lower Diptera. Since females are vectors, our research has primarily focused only on them (Gontijo et al., 1998; Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2008; 2011). Recently, we began collecting data on the control of intestinal pH in males (unpublished data) and were surprised to find significant

* Corresponding author.

E-mail address: nelder@icb.ufmg.br (N.F. Gontijo).

<https://doi.org/10.1016/j.jcz.2024.10.002>

Received 29 May 2024; Received in revised form 20 September 2024; Accepted 8 October 2024

Available online 10 October 2024

0044-5231/© 2024 Elsevier GmbH. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

differences in midgut morphology between males and females. The midgut of hematophagous females is divided into the tubular and narrow anterior midgut and the dilated posterior midgut, where ingested blood accumulates. In contrast, the midgut of males from hematophagous species such as *Lutzomyia longipalpis* is tubular and narrow along its entire length. At the same time, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* show a slight dilation in the posterior region. In the scientific literature, studies performed with species of hematophagous Culicomorpha, presenting photographs in which it is observed the female midgut gross morphology pattern for some species in genus *Aedes*, *Culex*, and *Anopheles* (Hecker, 1977; Janeh et al., 2017; 2019; Park and Shahabuddin, 2000), but they do not draw attention to the differences between males and females. In the supposed hematophagous mosquito *Lutzia bigoti* Bellardi, 1862, both sexes have this dilation in the posterior midgut; however, the dilated region in females is proportionally greater than in males, resembling species that are undoubtedly hematophagous (Rocha and Martins, 2024). Other studies focusing on Psychodomorpha midgut morphology are rare and focus only on female vectors of leishmaniasis (Jobling, 1987; Secundino et al., 2005). In these studies, the posterior midgut have the dilation characteristic of hematophagous species.

When investigating the non-hematophagous Lower Diptera species *Clogmia albipunctata* (Malta, 2021; Malta et al., 2024), we observed no morphological differences between the midgut of males and females. In both sexes, the midgut is tubular and narrow throughout its length. In another study concerning the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* Dyar & Knab, 1906, it was observed a narrow and long anterior midgut and a slight dilation in the posterior midgut in both sexes (Godoy et al., 2015); however, this dilation is less prominent when compared to the posterior midgut dilation observed in hematophagous females.

The objective of this work is to study the differences observed between the midguts of hematophagous (*L. longipalpis*, *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus*) and non-hematophagous (*C. albipunctata*) males and females and to propose the hypothesis that such differences are likely a characteristic related to the diet of Lower Diptera. This enables us to make an evolutionary inference about hematophagy.

2. Material and methods

2.1. Insects

The experiments were performed with 3- to 6-day-old insects for all species. Thirty male midguts and thirty female midguts for each species were dissected, and one midgut from each group was used for photography.

C. albipunctata (Williston, 1893) used in the experiments originated from a laboratory colony (Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos – LFIH – ICB/UFMG) established from insects captured in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The colony is maintained at 25 °C in plastic pots containing sand and water. Adults captured in a bathroom or originating from the colony were transferred to the pots, where they lay eggs. Under these conditions, feeding the adults is not necessary. The larvae are fed with powdered laboratory mouse chow every three days. The humidity inside the pot is sufficient to sustain the adults until they are transferred to the cloth cages used for sand fly breeding (Modi and Tesh, 1983). The adults are provided with water-soaked cotton. The cages are placed in plastic bags with a sponge soaked in water but the sponge does not contact the insects in the cage.

Lutzomyia longipalpis sandflies (Lutz & Neiva, 1912) were obtained from a laboratory colony originated in Teresina, Piauí, Brazil, and maintained according to standard procedures described by Modi and Tesh (1983).

The *A. aegypti* (Rockefeller lineage) and *C. quinquefasciatus* mosquitoes (sourced from a field population in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) were both from laboratory colonies. These colonies were

maintained following protocols established by de Melo Lara et al., 2021; Nepomuceno et al., 2017. The mosquitoes were housed in plastic cages and kept at a temperature of 27 °C with a relative humidity of 75 %.

The maintenance protocol for the hematophagous insects was approved by the ethics committee on animal experimentation (CETEA/UFMG) under protocol number 001/2017.

2.2. Dissection and photo documentation

Males and females of all species studied (*L. longipalpis*, *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, and *C. albipunctata*) were dissected using a stereoscopic microscope. The guts were photographed immediately after dissection using a Canon EOS Rebel camera and compared with one another. Standardized scales were obtained using ImageJ software.

3. Results

In females of *L. longipalpis*, *A. aegypti*, and *C. quinquefasciatus*, the midgut can be morphologically divided into two sections: the anterior midgut and the posterior midgut (Figs. 1–3).

The anterior midgut is characterized by being long and tubular, maintaining a reduced diameter from beginning to end. In some species there is a slight dilation near the cardia in the anterior midgut (Figs. 1 and 2), but the presence or absence of this dilation is unrelated to the feeding habit. For this reason, this feature is not emphasized here. In contrast, the posterior midgut is characterized by having an evident dilation, occupying approximately 2/3 of the total size of the female midgut in *L. longipalpis* and about 1/2 of the midgut size in females of *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* (Figs. 1–3). In hematophagous females, the posterior midgut stores blood. The midgut of *C. albipunctata* females has no evident division between the anterior and posterior midguts (Fig. 4).

The male midguts of both hematophagous and non-hematophagous species do not exhibit significant dilation (Figs. 1–3). Although in Culicomorpha, the male midgut shows a slight dilation in the posterior midgut, this dilation is much smaller than in the posterior midguts of hematophagous females (Figs. 2 and 3). In males of the non-hematophagous species *C. albipunctata*, the entire midgut is thin and tubular, resembling what has been described for females of this species (Fig. 4).

4. Discussion

The results presented here show that hematophagous females from Lower Dipterans (at least in the infraorders: Culicomorpha and Psychodomorpha) have an evident dilation in their posterior midgut, a morphological difference probably related to the insect's diet. Accordingly, various photographs and observational drawings from different publications support the results. In fact, we can observe evident dilations in hematophagous females such as in *L. bigoti* Bellardi, 1862; (Rocha and Martins, 2024), in *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Janeh et al., 2019), in *Aedes albopictus* Skuse, 1984 (Janeh et al., 2017), in *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire, 1906 (Secundino et al., 2005), in *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (Park and Shahabuddin, 2000), in *Culicoides nubeculosus* Meigen, 1830 (Megahed, 1956), and in *Phlebotomus papatasi* Scopoli, 1786 and *Simulium* sp. (Jobling, 1987). We had the opportunity to observe the midgut of a Ceratopogonidae female from the genus *Culicoides*, and it has the characteristic dilation of hematophagous females (unpublished data). This observation corroborates the findings for females of this group (Megahed, 1956). Unfortunately, there is no information about the males. Between the non-hematophagous species, the absence of an evident dilation can be observed in *T. theobaldi* females (Godoy et al., 2015).

Publications involving males from hematophagous species are less frequent. Still, the morphology of the midgut with a less-evident dilation in the posterior midgut is reported in some publications above

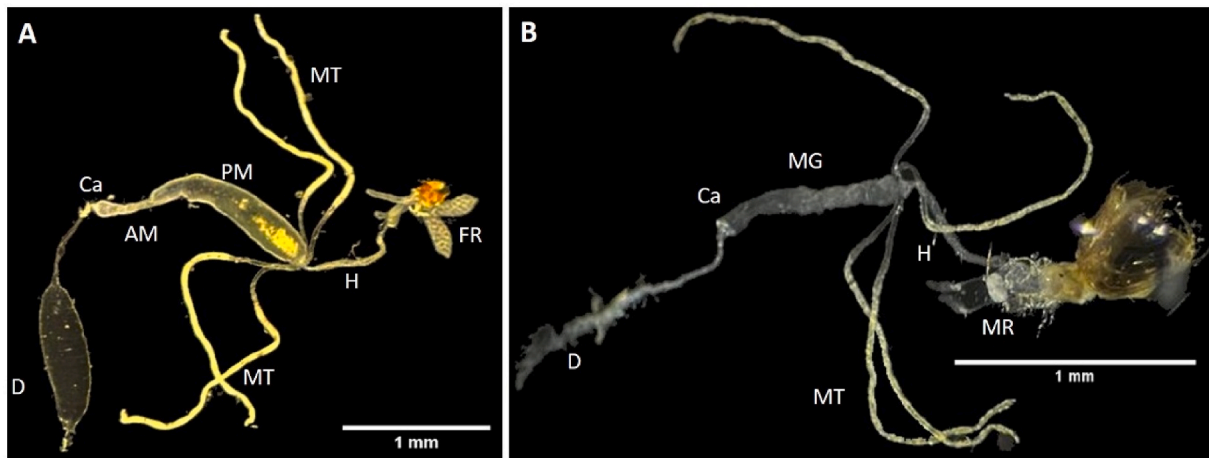


Fig. 1. *Lutzomyia longipalpis* midgut. (A) As they belong to a hematophagous species, *L. longipalpis* females present a dilation in the posterior midgut. (B) Conversely, males have a tubular and narrow midgut along its length. The scale in the lower right corner of both images is equivalent to 1 mm. D: Diverticulum; Ca: Cardia; AM: Anterior midgut; PM: Posterior midgut; MT: Malpighian tubules; MG: Midgut; H: Hindgut; FR: Female reproductive system; MR: Male reproductive system.

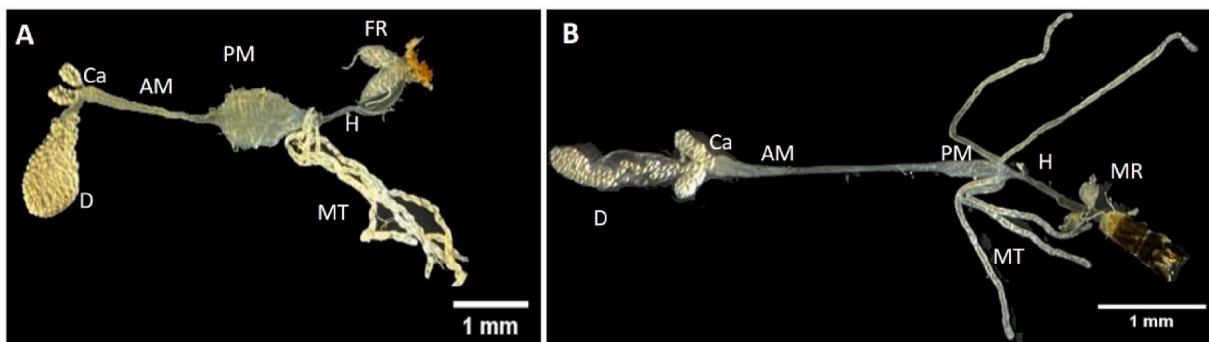


Fig. 2. *Aedes aegypti* midgut. (A) As they belong to a hematophagous species, *A. aegypti* females present a prominent dilation in the posterior midgut. (B) Conversely, males have a tubular and narrow anterior midgut and a slight dilation in the posterior midgut. The scale in the lower right corner of both images is equivalent to 1 mm. D: Diverticulum; Ca: Cardia; AM: Anterior midgut; PM: Posterior midgut; MT: Malpighian tubules; MG: Midgut; H: Hindgut; FR: Female reproductive system; MR: Male reproductive system.

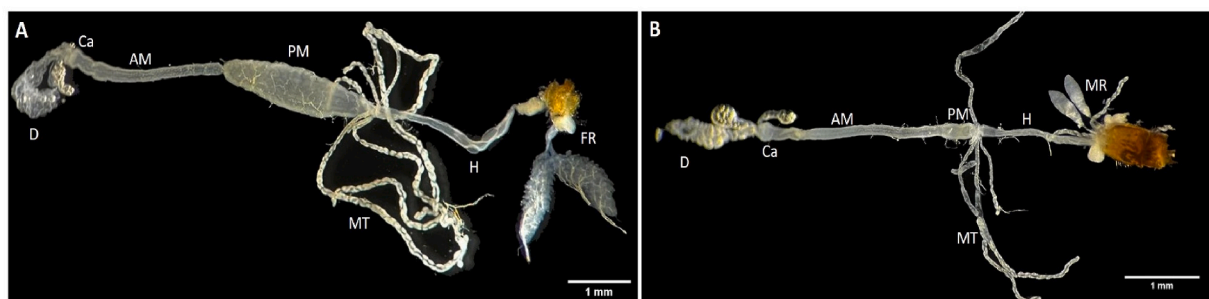


Fig. 3. *Culex quinquefasciatus* midgut. (A) As they belong to a hematophagous species, *C. quinquefasciatus* females have a prominent dilation in the posterior midgut. (B) Conversely, males have a tubular and narrow anterior midgut and a slight dilation in the posterior midgut. The scale in the lower right corner of both images is equivalent to 1 mm. D: Diverticulum; Ca: Cardia; AM: Anterior midgut; PM: Posterior midgut; MT: Malpighian tubules; MG: Midgut; H: Hindgut; FR: Female reproductive system; MR: Male reproductive system.

mentioned (Janež et al., 2017; 2019; Park and Shahabuddin, 2000). A similar structure is present in the midguts of non-hematophagous males, such as in *T. theobaldi* (Godoy et al., 2015) and *Corynoneura scutellata* Winnertz, 1846 (Veko and Polilov, 2020). A slightly dilation in the male posterior midgut seems to occur only in species from infraorder Culicomorpha. *Clogmia albipunctata* males do not have such slight dilation (Fig. 4).

In hematophagous females, the dilation in the midgut is a crucial

adaptation. It is related to how much blood these insects ingest, reducing environmental exposure and the host's defensive behavior. For temporary ectoparasites, the act of visiting the host for blood meals is not just dangerous; it's a life-threatening task. To overcome this, an effective strategy should include maximizing nutrient ingestion rates and minimizing host contact time (Lehane, 2005).

Our research on the implications of midgut morphology on feeding behavior and host interaction in hematophagous females underscores

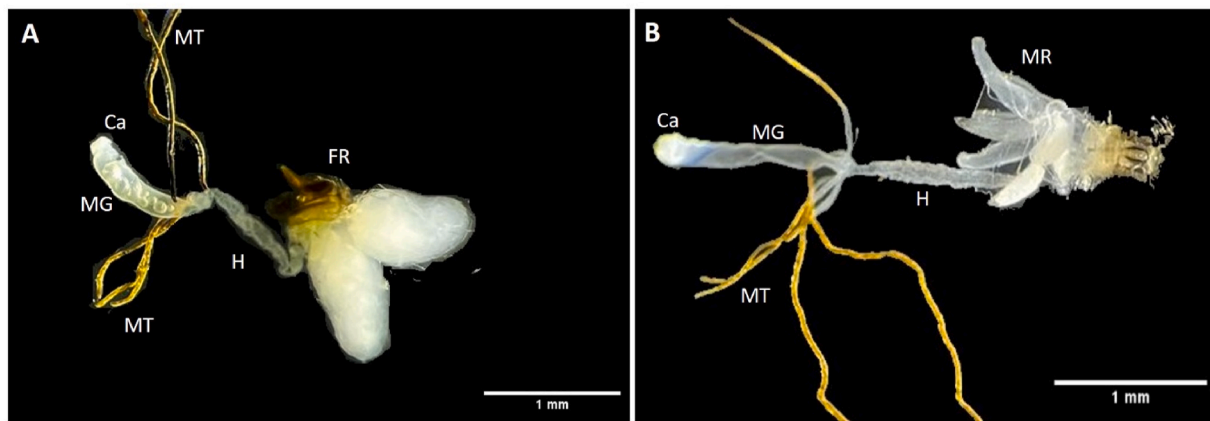


Fig. 4. *Clogmia albipunctata* midgut. (A) As they are not hematophagous species, *C. albipunctata* females present a tubular and narrow midgut along its length; (B) a similar morphology is observed in males. The scale in the lower right corner of both images is equivalent to 1 mm. D: Diverticulum; Ca: Cardia; MG: Midgut; MT: Malpighian tubules; MG: Midgut; H: Hindgut; FR: Female reproductive system; MR: Male reproductive system.

the urgency of our work in understanding these complex interactions. Our hypothesis that the dilation observed in females is related to hematophagy gains strength when we consider the male midgut morphology, which does not have the prominent dilation found in hematophagous females.

In Lower Diptera, regardless of their sex or whether they are hematophagous or not, we can find physiological differences between the anterior and posterior midgut. In fact, the activity of the enzyme alpha-glucosidase is considerably greater in the anterior midgut of *A. aegypti* (Nepomuceno et al., 2017) and *L. longipalpis* (Gontijo et al., 1998; Santos et al., 2008). The pH in the midgut of Lower Diptera is relatively acidic (pH 6), the optimum pH for alpha-glucosidase. This enzyme is responsible for carbohydrate digestion, such as sucrose. The distribution of alpha-glucosidase in the midgut of male and female *C. albipunctata* also follows this same pattern (Malta, 2021).

In comparison, the production of enzymes responsible for the blood digestion in hematophagous females occurs in the posterior midgut, a site that undergoes alkalization shortly after blood ingestion (Nepomuceno et al., 2017; Santos et al., 2008; 2011). Enzymes with an alkaline optimum pH, such as trypsin and chymotrypsin, require an alkaline pH for blood digestion.

When considered together, our findings confirm that the dilation observed in the midgut of hematophagous females is an adaptation to hematophagy. Some authors argue that hematophagy was the ancestral form of feeding among the Culicomorpha given the number of hematophagous families in this infraorder (Grimaldi and Engel, 2005; Ribeiro et al., 2010); however, this perspective is not universally accepted (Wiegmann et al., 2011). In adult *Toxorhynchites*, the phytophagy represents the ancestral condition among mosquitoes. In addition, the histology of the gastric ceca of larvae also suggests that *Toxorhynchites* have the basal condition (Godoy et al., 2023). These considerations are in line with the proposal by Wiegmann et al. (2011) that hematophagy is not the ancestral condition. As Lukashевич and Mostovski (2003) point out, the existing fossil record is insufficient to definitively settle this debate. Interestingly, for infraorder Psychodomorpha, our observations lead us to agree that hematophagy is the derived character within the group (Wiegmann et al., 2011), since for the non-hematophagous species no dilation was observed in the midguts of males and females.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, INCT- Entomologia Molecular - CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG.

CRediT authorship contribution statement

Lucas Gabriel Ferreira Malta: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Maurício Roberto Viana Sant’anna:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization. **Marcos Horário Pereira:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Software, Resources, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Nelder Figueiredo Gontijo:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Software, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank César Nonato de Oliveira for technical assistance.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Azar, D., Nel, A., 2012. Evolution of hematophagy in “non-biting midges” (Diptera: Chironomidae). *Terr. Arthropod Rev.* 5, 15–34. <https://doi.org/10.1163/187498312x620577>.
- Azar, D., Nel, A., Huang, D., Engel, M.S., 2023. The earliest fossil mosquito. *Curr. Biol.* 33, 5240–5246.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.10.047>.
- Chapman, R.F., 1998. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press.
- de Melo Lara, L., Pereira-Filho, A.A., Mateus Pereira, R.H., Ferreira Malta, L.G., D’Ávila Pessoa, G.C., Koerich, L.B., Pereira, M.H., Araujo, R.N., de Figueiredo Gontijo, N., Viana Sant’Anna, M.R., 2021. Adaptations to haematophagy: investigations on how male and female *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) deal with human complement activation after a blood meal. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 139, 103650. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103650>.
- Forattini, O.P., 1973. *Entomologia Médica: 4º Volume: Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonellose.*, vol. 4º.
- Godoy, R.S.M., Barbosa, R.C., Huang, W., Secundino, N.F.C., Pimenta, P.F.P., Jacobs-Lorena, M., Martins, G.F., 2023. The larval midgut of *Anopheles*, *Aedes*, and *Toxorhynchites* mosquitoes (Diptera, Culicidae): a comparative approach in morphophysiology and evolution. *Cell Tissue Res.* 393, 297–320. <https://doi.org/10.1007/s00441-023-03783-5>.

- Godoy, R.S.M., Fernandes, K.M., Martins, G.F., 2015. Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae). *Sci. Rep.* 5, 15836. <https://doi.org/10.1038/srep15836>.
- 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. *Exp. Parasitol.* 90, 212–219. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4336>.
- Grimaldi, D., Engel, M.S., 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
- Hecker, H., 1977. Structure and function of midgut epithelial cells in culicidae mosquitoes (insecta, diptera). *Cell Tissue Res.* 184, 321–341. <https://doi.org/10.1007/BF00219894>.
- Janeh, M., Osman, D., Kambris, Z., 2019. Comparative analysis of midgut regeneration capacity and resistance to oral infection in three disease-vector mosquitoes. *Sci. Rep.* 9, 14556. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50994-4>.
- Janeh, M., Osman, D., Kambris, Z., 2017. Damage-induced cell regeneration in the midgut of *Aedes albopictus* mosquitoes. *Sci. Rep.* 7, 44594. <https://doi.org/10.1038/srep44594>.
- Jobling, B., 1987. *Anatomical Drawing of Biting Flies*. British Museum, London.
- Lambkin, C.L., Sinclair, B.J., Pape, T., Courtney, G.W., Skevington, J.H., Meier, R., Yeates, D.K., Blagoderov, V., Wiegmann, B.M., 2013. The phylogenetic relationships among infraorders and superfamilies of Diptera based on morphological evidence. *Syst. Entomol.* 38, 164–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2012.00652.x>.
- Lehane, M.J., 2005. *The Biology of Blood-Sucking in Insects*, second ed. Cambridge University Press, New York.
- Lehane, M.J., 1992. *Biology of Blood Sucking Insects*. Chapman & Hall, London.
- Lukashevich, E.D., Mostovski, M.B., 2003. Hematophagous insects in the fossil record. *Paleontol. J.* 37, 153–161.
- Malta, L.G.F., 2021. *Clogmia albipunctata*: a hematofagia sob uma perspectiva exaptativa. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Malta, L.G.F., Koerich, L.B., D'Ávila Pessoa, G.C., Araujo, R.N., Sant'Anna, M.R.V., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2024. *Clogmia albipunctata* (Williston, 1893) midgut physiology: pH control and functional relationship with Lower Diptera (nematoceran) especially with hematophagous species. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 290, 111584. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111584>.
- Marshall, S.A., 2012. *Flies. The Natural History & Diversity of Diptera*, First. Firefly Books.
- Megahed, M.M., 1956. Anatomy and histology of the alimentary tract of the female of the biting midge *Culicoides nubeculosus* Meigen (Diptera: Heleidae Ceratopogonidae). *Parasitology* 46, 22–47. <https://doi.org/10.1017/S0031182000026329>.
- Modi, G.B., Tesh, R.B., 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 20, 568–569. <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.5.568>.
- Nepomuceno, D.B., Santos, C., Nascimento, R., Hora, M., 2017. pH control in the midgut of *Aedes aegypti* under different nutritional conditions 3355–3362. <https://doi.org/10.1242/jeb.158956>.
- Park, S.S., Shahabuddin, M., 2000. Structural organization of posterior midgut muscles in mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *J. Struct. Biol.* 129, 30–37. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4208>.
- Ribeiro, J.M.C., Mans, B.J., Arcà, B., 2010. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 767–784. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.08.002>.
- Rocha, V.C., Martins, G.F., 2024. Midgut morphology of the predator mosquito *Lutzia bigoti* (Diptera: Culicidae) and its implications for feeding behavior. *Acta Trop.* 257, 107289. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107289>.
- Santos, V.C., Araujo, R.N., Machado, L.A.D., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J. Exp. Biol.* 211, 2792–2798. <https://doi.org/10.1242/jeb.019836>.
- Santos, V.C., Nunes, C.A., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2011. Mechanisms of pH control in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*: roles for ingested molecules and hormones. *J. Exp. Biol.* 214, 1411–1418. <https://doi.org/10.1242/jeb.051490>.
- Secundino, N.F.C., Nacif-Pimenta, R., Hajmova, M., Volf, P., Pimenta, P.F.P., 2005. Midgut muscle network in *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus duboscqi* sand flies: spatial organization and structural modification after blood meal. *Arthropod Struct. Dev.* 34, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2005.01.002>.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2005. Biochemistry of digestion. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, pp. 171–224. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00053-3>.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 109, 1–62. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4).
- Veko, E.N., Polilov, A.A., 2020. The effects of miniaturization on the anatomy of *Corynoneura scutellata* Winnertz, 1846 (Diptera, Chironomidae), one of the smallest dipterans. *Entomol. Rev.* 100, 1065–1077. <https://doi.org/10.1134/S0013873820080023>.
- Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.W., Lambkin, C., Bertone, M.A., Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Pape, T., Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S.N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G.E., Thompson, F.C., Grimaldi, D.A., Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K., 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5690–5695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012675108>.
- Yeates, D.K., Wiegmann, B.M., Courtney, G.W., Meier, R., Lambkin, C., Pape, T., 2007. Phylogeny and systematics of Diptera: two decades of progress and prospects. *Zootaxa* 590, 565–590. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.27>.



Intestinal flow and digestive parameters of *Lutzomyia longipalpis* larvae

Luccas Gabriel Ferreira Malta¹, Bianca Stacanelli Ribeiro¹, Davi Viegas-Melo,
Marques Serafim Pinho-Junior, Maurício Roberto Viana Sant'Anna, Marcos Horário Pereira,
Nelder Figueiredo Gontijo^{*}

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Lutzomyia longipalpis
Intestinal flow
Countercurrent flow
Enzymes
Diet

ABSTRACT

Lutzomyia longipalpis Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), is the primary vector of *Leishmania infantum* Nicole, 1908, the etiological agent of American visceral leishmaniasis. During their development, sandfly larvae pass through four instars, consuming soil particles enriched with microorganisms and decomposing organic material. In numerous insect species, the intestinal epithelium not only secretes digestive enzymes and absorbs digested nutrients but also carries out additional functions, such as regulating luminal pH and facilitating the absorption or secretion of ions and water. The transport of ions and water plays a crucial role in the establishment of a countercurrent flow responsible for recycling soluble digestive enzymes. This study aimed to explore specific aspects of digestion in *L. longipalpis* larvae that remain poorly understood. We measured the intestinal flow within the endoperitrophic space, which varied depending on the type of diet offered to the larvae, with an average total time of 191 min. Additionally, we demonstrated the countercurrent flow in *L. longipalpis* larvae. Finally, we showed that the production of digestive enzymes can be modulated by nutrient availability, particularly by the amino acids in the larval diet. The higher the amino acids concentration, the higher the trypsin activity. On the other hand, the aminopeptidase activity was poorly influenced by the amino acids concentration.

1. Introduction

In many insect species, the intestinal epithelium performs several other functions besides secreting digestive enzymes and absorbing digested nutrients, including regulating luminal pH and the absorption or secretion of ions and water. pH regulation is crucial for the proper functioning of digestive enzymes. Ion and water transport are essential for the transport of digested nutrients and the creation of a countercurrent flow, which enables the recycling of digestive enzymes in insects with a tubular gut and a type II peritrophic membrane (Holtot et al., 2019; Terra and Ferreira, 2020).

In general, the countercurrent flow functions as follows: while ions (especially Na⁺, K⁺, and Cl⁻) and water absorption occur in the anterior region of the midgut, the opposite happens in the posterior portion of the midgut, where some ions and water are secreted. This phenomenon creates a flow within the ectoperitrophic space, moving from the posterior to the anterior region of the midgut. In contrast, within the

endoperitrophic space, the flow of ingested materials and digestion remnants moves in the opposite direction, enclosed by the peritrophic membrane, from the anterior to the posterior portion of the midgut.

Any soluble digestive enzyme produced by enterocytes and released into the ectoperitrophic space is carried by the ectoperitrophic flow to more anterior portions of the midgut, from where it can diffuse into the endoperitrophic space to act on the digestion of various macromolecules. Since the flow within the endoperitrophic space is directed toward the posterior region, these enzymes would ultimately be discarded in the feces if they did not diffuse back into the ectoperitrophic space. From there, they are carried back to the anterior regions by the countercurrent flow, allowing them to be reused (Terra and Ferreira, 2020).

Berridge (1970) unraveled this mechanism through the analysis of data previously obtained by Wigglesworth (1933) and Treherne (1959). Later, other authors recognized the importance of countercurrent flow in recycling digestive enzymes (Terra and Ferreira, 2020, 1981).

Currently, the countercurrent mechanism has been observed in

^{*} Correspondent author.

E-mail address: nelder@icb.ufmg.br (N.F. Gontijo).

¹ Authors have the same contributions.

insects from different orders, such as dipteran larvae, lepidopteran larvae (Barroso et al., 2020; Bolognesi et al., 2008; Bolognesi et al., 2001), coleopteran larvae (Caldeira et al., 2007; Ferreira et al., 2002), orthopterans (Biagio et al., 2009), and phasmids (Monteiro et al., 2014). Hemipterans are an exception, as they lack a peritrophic membrane (Terra and Ferreira, 2020).

The presence of nutrients in the intestinal lumen can be detected by intestinal cells. Nutrients such as monosaccharides and amino acids can be sensed by enterocytes after being transported into the cytoplasm, where they directly or indirectly interact with the TOR pathway (Brandon et al., 2008; Gulia-Nuss et al., 2011; Silva Fernandes et al., 2020).

The TOR pathway comprises a complex intracellular signaling system present in eukaryotic cells, functioning through the activation or inhibition of kinases regulated by nutrient availability and hormonal stimuli (Gonzalez and Rallis, 2017). It plays a key role in regulating growth and cell cycle progression and is crucial in the autophagy process, integrating signals such as growth factors and nutrient availability (De Virgilio and Loewith, 2006; Fingar and Blenis, 2004). In the insect gut, the TOR pathway can regulate the synthesis of digestive enzymes, as seen in the production of trypsin in female mosquitoes *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Brandon et al., 2008) and the sandfly *L. longipalpis* (Silva Fernandes et al., 2020).

Another way to detect the presence of nutrients may directly involve enteroendocrine cells scattered throughout the digestive tract. The mechanism by which enteroendocrine cells sense nutrients may involve gustatory-like receptors (Chopra et al., 2022; Park and Kwon, 2011).

In response to nutrient intake, these cells can release various hormones into the hemolymph. These hormones act on receptors located in the basolateral region of enterocytes and intestinal muscle cells, thereby modulating their function. Hormones released by the nervous system and gonads can also influence the activity of enterocytes and intestinal muscle cells (Chopra et al., 2022; Orchard and Lange, 2024; Wu et al., 2020).

The model insect used in the present study was the sandfly *L. longipalpis* (Diptera, Psychodidae), an essential vector of *Leishmania infantum*, the American visceral leishmaniasis etiological agent. During development, sandfly larvae go through four larval instars and feed on soil particles rich in microorganisms, decomposing organic matter (RÊGO and SOARES, 2021; Soares and Turco, 2003). These larvae have a simple digestive tract (Fig. 1) consisting of a short esophagus followed by the cardia, which separates the midgut from the anterior regions. The tubular midgut is the largest portion of the digestive tract, lacks caeca, and has a type II peritrophic membrane that separates the

endoperitrophic space from the ectoperitrophic space, which is highly visible in this species (Fazito do Vale et al., 2007), suggesting an intense countercurrent flow. The pylorus is at the end of the midgut, from which four Malpighian tubules emerge, leading to a short, thin hindgut that terminates in prominent rectal pads.

This study aimed to explore the unclear aspects of digestion in *L. longipalpis* larvae. We measured the intestinal flow within the endoperitrophic space and demonstrated the countercurrent flow that recycles soluble digestive enzymes. Additionally, we showed that the production of these enzymes can be influenced by nutrient availability, particularly amino acids.

2. Materials and methods

2.1. Insects

L. longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) insects from a colony originating in Teresina, Piauí, Brazil, were reared according to the methodology proposed by Modi and Tesh, (1983). The Ethics Committee on Animal Experimentation (CETEA/UFMG) approved the Hematophagy procedure under protocol number 001/2017. In the experiments, two different types of food were used for feeding *L. longipalpis* larvae. The first type, Food-1, based on the formulation proposed by Modi and Tesh (1983), was prepared by mixing one part worm humus, one part powdered rabbit chow (any commercial brand), and one part ground rabbit feces (v/v). Any brand of rabbit chow could be used. After mixing the ingredients and moistening them with a water spray bottle, the mixture was stored in an aerated plastic container for approximately three months, during which most of the organic matter decomposed and microorganisms, especially fungi, proliferated. During the preparation period, the mixture was stirred and moistened as needed. After this period, the resulting material was finely ground, sieved, and offered to the larvae as food. The second type, Food-2, was prepared from finely ground cereal flakes (Neston®). The color of Food-1, which contains worm humus, is dark brown, and Food-2, which is based on cereal flakes, is light-colored. This color difference facilitates the observation of the movement of ingested material inside the gut (Fig. 2, A-B).

The larvae were reared in plastic containers lined with a layer of moistened plaster (Modi and Tesh, 1983). During the experiments, the larvae were kept in the same environment, where they were provided with diets of different nutritional mixtures.

2.2. Intestinal flow measurement

The *L. longipalpis* larvae have a semitransparent tegument, allowing visualization of their intestinal contents under a stereoscopic microscope (Fig. 2, C-D). This visualization is easier in L3 larvae. To measure the luminal flow, a group of L3 larvae was fed Food-2, which has a lighter color. Once the intestinal content appeared completely light, the larvae were transferred to Food-1, which is darker in color. Following this procedure, the larvae were observed to measure the time required for their guts to acquire the dark coloration characteristic of Food-1 throughout the entire gut.

The same procedure was conducted with another group of larvae whose intestinal contents were filled with Food-1. These larvae were then offered Food-2, and the time taken for their intestinal contents to turn light in color was measured. During the experiments, the larvae were kept at 25 °C in containers lined with a layer of plaster necessary to maintain a suitable environmental humidity. Some larvae were placed in a plaster-lined container with no provided food.

2.3. Preparation of different food blends

Food-1 was enriched with a precise mixture of 18 amino acids in some experiments. This diet was prepared by mixing 95 g of Food-1 with 5 g of an 18-amino-acid mixture in proportions as in Schneider's

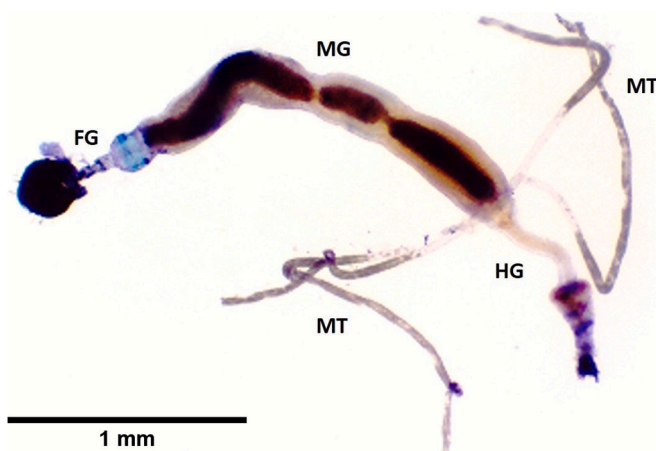


Fig. 1. Digestive tract of *Lutzomyia longipalpis* larvae. Complete digestive system of *L. longipalpis* larvae with its subdivisions: FG- Foregut; MG- Midgut; HG- Hindgut; MT – Malpighian tubes. The photo highlights the food content, which is visible in the intestine. Photo by Nelder Gontijo.

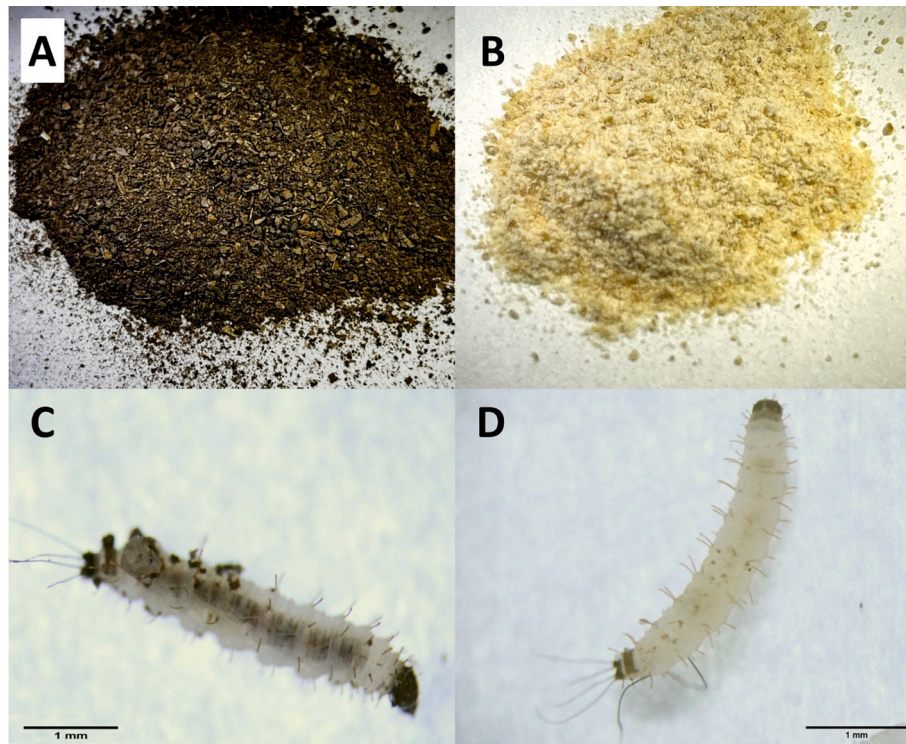


Fig. 2. The foods used in the experiments and L3 larvae of *Lutzomyia longipalpis*: (A) Food-1. (B) Food-2. (C) L3 larvae fed with Food-1. (D) L3 larvae fed with Food-2.

commercial culture medium for insect cells. To prepare 100 g of the amino acid mixture, each individual amino acid was measured with precision: 31 mg of cysteine, 251 mg of alanine, 301 mg of arginine, 198 mg of aspartic acid, 389 mg of glutamic acid, 902 mg of glutamine, 121 mg of glycine, 389 mg of histidine, 77 mg of isoleucine, 77 mg of leucine, 825 mg of lysine, 77 mg of methionine, 851 mg of proline, 121 mg of serine, 172 mg of threonine, 51 mg of tryptophan, 21 mg of tyrosine $2\text{Na}^+\cdot\text{H}_2\text{O}$, and 146 mg of valine. These amino acids were mixed with 95 g of Food-1 and ground to obtain a homogeneous mixture. Another mixture containing 25 % amino acids was also prepared, maintaining the above proportions.

In other experiments, Food-1 was mixed with different proportions of Food-2 on a weight-to-weight basis.

2.4. Inference of the countercurrent mechanism

Determining countercurrent flow was based on the methodology employed by Barroso et al. (2020). A mixture of Food-1 with Trypan Blue dye was prepared by mixing 1 g of Food-1 with 10 mg of Trypan Blue. To prepare the mix, the Trypan Blue dye was first dissolved in distilled water (200 μL), and this solution was added to Food-1 to produce a homogeneous mixture. After drying, the prepared mixture was offered to a group of larvae in a moistened plaster-lined container. After approximately 20 h, the dye diet had filled the entire intestinal tract.

The larvae were then washed to remove dye-containing food particles from their tegument and immediately frozen in liquid nitrogen. After freezing, each larva was divided into portions, leaving half the midgut in each segment. Before thawing, pools containing the equivalent of ten halves were transferred to tubes containing 300 μL of 0.9 % saline, where they were macerated and centrifuged. Two hundred and fifty microliters of the supernatant from each pool were then transferred to a 96-well plate, and absorbance was measured at 592 nm.

Trypan Blue dye, which is soluble and low molecular weight, crosses the peritrophic membrane and diffuses into the ectoperitrophic space. The presence of countercurrent flow results in the anterior portion of the larval midgut accumulating more dye than the posterior portion.

2.5. Enzymatic assays

2.5.1. Trypsin assay

L3 larvae were transferred from the rearing containers to another container containing different mixtures they were to ingest. The composition of the diet varied depending on the experiment, and the larvae remained there for at least 4 h before being used in the assays. After ingesting the material provided, the larvae were dissected under a stereoscopic microscope in 0.9 % saline, and their guts were transferred in pairs to microcentrifuge tubes containing 100 μL of 0.9 % saline and kept on ice until dissections were complete. Each tube, containing two guts, was placed in an ultrasonic bath and sonicated for at least 15 s until the guts were completely disrupted. The tubes were centrifuged at 4,000 G at 4 °C for 4 min. Fifty microliters of each supernatant, containing material equivalent to one gut, were used in the assays.

The assays were performed in 96-well plates to which 100 μL of 0.1 M Tris/HCl buffer at pH 8.5, 50 μL of the sample (material equivalent to one gut), and 30 μL of saline were added. The plate was placed in a plate reader (VersaMax, Molecular Devices) and incubated for 5 min at 30 °C. The reaction was initiated by adding 20 μL of L-BAPNA substrate (10 mM) dissolved in DMSO (final concentration of 1 mM), making a total volume of 200 μL . The plate was immediately shaken for 5 s, and readings were taken at 410 nm in kinetic mode every 30 s. For the blank, the sample was replaced with an equal volume of saline. Results were expressed as milliunit of enzyme (mU). One enzyme unit (U) is the amount that hydrolyzes one μmol of substrate per min.

2.5.2. Aminopeptidase assay

L3 larvae were transferred from the rearing containers to another container containing different materials they were to ingest. The diet composition varied depending on the experiment, and the larvae remained in the container for at least 4 h before being used in the assays. The larvae were then dissected in 0.9 % saline, and their guts were cut in half and washed to remove their contents. Two posterior midgut halves from two larvae were placed in a microcentrifuge tube containing 200 μL of 0.9 % saline and 1 % Triton X-100. The tubes were sonicated for 5 s, causing the guts

to break apart. Each tube was then centrifuged at 12,000 g at 4 °C for 5 min, and 50 µL of the supernatant, equivalent to 0.25 guts, were used in the assays. The posterior midgut was chosen because aminopeptidases are attached to the microvilli of enterocytes in this region (Fazito do Vale et al., 2007).

The assays were prepared in 96-well plates, to which 100 µL of 0.1 M Tris-HCl buffer at pH 7.5, 50 µL of sample (equivalent to 0.25 guts), and 30 µL of distilled water were added. The plate was pre-incubated in the microplate reader at 30 °C for 5 min, and the reaction was initiated by adding 20 µL of L-Alanine p-nitroanilide substrate (10 mM) dissolved in DMSO (final concentration of 1 mM), making a total volume of 200 µL. The plate was immediately shaken for 5 s, and readings were taken every 30 s in kinetic mode at a wavelength of 415 nm. For the blank, the sample was replaced with an equal volume of saline. Results were expressed as milliunit of enzyme (mU).

2.6. Total protein dosage

The proteins in Food-1 and Food-2 were pre-solubilized in 0.9 % alkaline saline. Two hundred fifty milligrams of diet were added to 1 mL of 0.9 % saline, which was alkalized with NaOH to a pH of 11.5. The mixture was stirred, heated to 50 °C for 10 min, cooled, and centrifuged at 4,000 G for 2 min.

Total protein content was quantified using 25 µL of the supernatant and 25 µL of supernatant diluted 1:1 in saline, following the protocol of the BCA1-KIT (Sigma). Onto the samples pipetted into a 96-well plate, 200 µL of reagent mixture was added. The plate was incubated at 37 °C for 30 min and read at 562 nm. The blank consisted of 25 µL of saline in place of the samples, and bovine serum albumin dilutions were used as standards.

2.7. Free amino acid dosage

Free amino acids were solubilized by resuspending 25 mg of each diet in 1 mL of saline. The tubes were then heated for 10 min at 100 °C in a water bath, shaken, and centrifuged at 4,000 G for 2 min. The supernatant was used for the assays.

Total amino acids were measured using a protocol adapted from Starcher (2001) and Haeger et al. (2022). The reagent mixture was prepared immediately before use to prevent oxidation. One hundred milligrams of ninhydrin were dissolved in 3.75 mL of ethylene glycol and 1.25 mL of 4 M sodium acetate buffer at pH 5.5. To this solution, 125 µL of a SnCl₂·H₂O solution (25 mg of SnCl₂·H₂O dissolved in 250 µL of ethylene glycol) was added. The final mixture exhibited a slightly reddish color. The first reaction was carried out in microcentrifuge tubes, where 10 µL of the samples were mixed with 100 µL of the reagent mixture and heated in a water bath at 100 °C for 10 min. In the second step, 25 µL of each reaction product was transferred to a 96-well plate containing 225 µL of 100 mM sodium tetraborate buffer at pH 10. After thorough mixing, the plate was read at 570 nm using a plate reader. Ten microliters of saline were used as the blank, and 10 µL of 2 mM alanine (0.02 µmoles of alanine) was used as the standard.

2.8. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad PRISM 7 software. For results involving the comparison of intestinal flow time between different diets, a Student's *t*-test was used. For trypsin and aminopeptidase activity assays, as well as protein and amino acid quantification, Two-way ANOVA with Bonferroni post hoc tests was applied. In experiments determining intestinal flow time and demonstrating countercurrent flow, a Student's *t*-test was conducted on paired observations. Results with *p* < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Intestinal flow measurement

Food-1 (Black) and Food-2 (White) were offered to two groups of L3 larvae. The larval guts could be observed through their semitransparent tegument. Once their guts were completely filled with the initially provided diet, the larvae were transferred to the other type of diet, and the time required for the initially ingested diet to be replaced by the new one was measured.

According to the results presented in Fig. 3, the average time required for Food-1 (Black) to be replaced by Food-2 (White) was 214 ± 48 min, while the time for Food-2 to be replaced by Food-1 was 171 ± 29 min. This suggests that the nutritional value or composition of the ingested material may influence the speed of intestinal transit. It is worth noting that, during feeding, no part of the larval guts undergoes distension, and there is no region where ingested food can be stored (Fig. 1).

Since the proportion of nutrients and inert mineral components, such as silica and other minerals, likely varies in the materials ingested by sandfly larvae under natural conditions, an average of these times better reflects the intestinal flow in L3 larvae of *L. longipalpis* (191 ± 45 min).

Interestingly, when larvae are transferred to an environment without any food, luminal flow ceases. In other words, without a feeding stimulus, the larvae stop moving ingested material within their guts. This observation was confirmed through an experiment in which 18 larvae were placed in a moistened plaster container without any diet. None of the larvae defecated their previously ingested material during a maximum observation period of 24 h (the larvae were observed at 1, 2, 4, and 24 h after being transferred to the food-free environment).

3.2. Regulation of trypsin production by ingestion of different nutrients

Trypsin is one of the main digestive enzymes in *L. longipalpis* larvae (Fazito do Vale et al., 2007). Its activity was measured in L3 larvae after

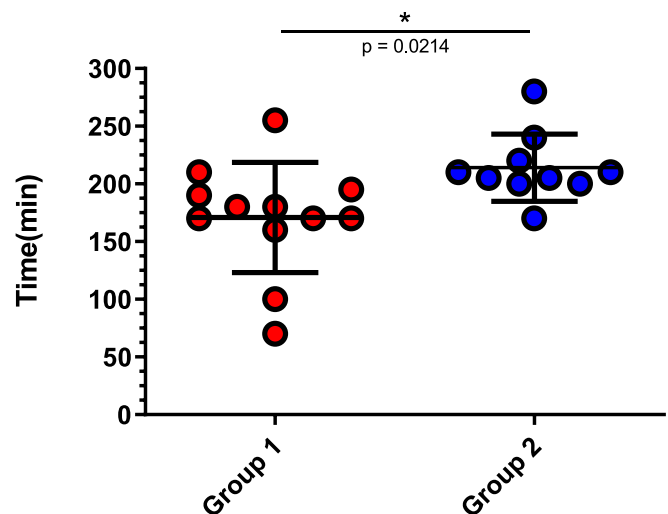


Fig. 3. Measurement of intestinal flow in *Lutzomyia longipalpis* L3 larvae. To measure luminal flow, a group of L3 larvae was fed with Food-2 (light). Once their intestinal contents appeared completely light, the larvae were transferred to Food-1 (dark), and the time required for their guts to fully acquire the dark color of Food-1 was measured (Group 1: *n* = 12). For another group of larvae, whose intestinal contents were filled with Food-1, the same procedure was performed, but they were fed with Food-2 instead (Group 2: *n* = 10). Similarly, the time required for their intestinal contents to become light was recorded. The Shapiro-Wilk normality test was conducted for both groups, followed by the Student's *t*-test for unpaired samples. Differences were considered significant at *p* < 0.05.

ingesting different nutritional compositions. These conditions included the ingestion of pure Food-1, Food-1 enriched with amino acids, Food-1 supplemented with glucose, pure Food-2, or mixtures of Food-1 and Food-2 in varying proportions. Trypsin activity was also measured during the phase when larvae were preparing to molt from L3 to L4. In this latter condition, the larvae had stopped feeding and emptied their guts.

According to the results shown in Fig. 4, A-C, trypsin production nearly ceased in larvae that had emptied their guts in preparation for molting. Larvae that ingested only Food-1 showed trypsin activity of 0.02 ± 0.0033 mU/gut. When larvae consumed Food-1 containing 5 % of an amino acid mixture, trypsin activity increased to 0.05 ± 0.005 mU/gut, indicating that increased amino acid intake enhances trypsinolytic activity. A higher proportion of amino acids further increased trypsin production. With 25 % amino acids, the activity reached 0.058 ± 0.009 mU/gut. A non-significant increase in activity. Adding 5 % glucose to Food-1 did not significantly alter trypsinolytic activity

compared to larvae fed only with Food-1 (0.02 ± 0.0033 versus 0.022 ± 0.008 mU/gut, respectively). Trypsinolytic activity was also measured in L3 larvae, which fed mixtures with varying proportions of Food-1 and Food-2. The activities were 0.015 ± 0.002 mU/gut for Food-1 with 5 % Food-2, 0.029 ± 0.004 mU/gut for Food-1 with 30 % Food-2, 0.07 ± 0.016 mU/gut for Food-1 with 50 % Food-2, 0.1 ± 0.02 mU/gut for Food-1 with 70 % Food-2, and 0.099 ± 0.017 mU/gut for pure Food-2. These results indicate that trypsinolytic activity increased as the proportion of Food-2, which is richer in nutrients, increased in the mixture.

3.3. Regulation of aminopeptidase production by ingestion of different nutrients

Aminopeptidases are enzymes involved in the final stages of protein digestion, such as carboxypeptidases. They break down peptides generated by endoproteases, such as trypsin, removing amino acids residues from N-terminal portion. In *L. longipalpis* larvae,

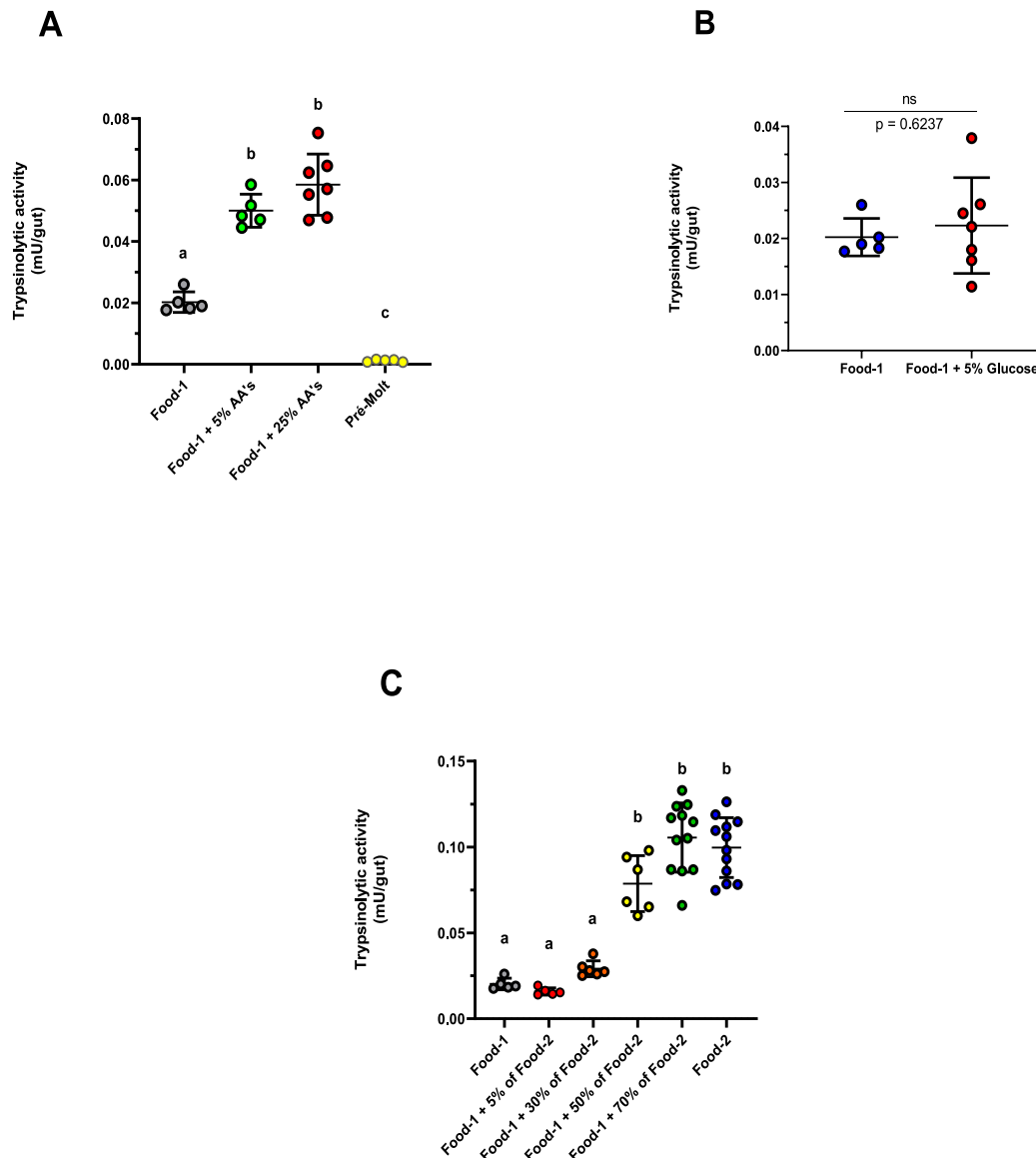


Fig. 4. Effect of diet composition on trypsinolytic activity in the midgut of *Lutzomyia longipalpis* larvae. L3 larvae were transferred to rearing containers containing Food-1 enriched with amino acids (A), Food-1 enriched with glucose (B), and different proportions of Food-1 mixed with Food-2 (C), where they remained for at least 4 h. After consuming the offered material, the trypsinolytic activity was measured with L-BAPNA as substrate. Readings were taken at 410 nm in kinetic mode and results were expressed as mU (one enzyme unit (U) is the amount that hydrolyzes one μ mol of substrate per min, normalized to the equivalent of one gut. For all tested groups, the Shapiro-Wilk normality test was conducted, followed by One-way ANOVA (A and C) and Student's *t*-test (B). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

aminopeptidases are found in the posterior midgut, attached to the microvilli of enterocytes (Fazito do Vale et al., 2007). To investigate the effect of different nutritional compositions on aminopeptidase activity, L3 larvae were exposed to various nutrients, and their activity was evaluated (Fig. 5).

Aminopeptidase activity, measured using the substrate L-Alanine p-nitroanilide, showed no significant changes when glucose was added to the diet or when Food-1 was replaced by Food-2. However, when the larvae were fed a diet containing Food-1 enriched with 5 % amino acids, a decrease in aminopeptidase activity was observed. The measured activities were as follows: 0.162 ± 0.048 mU/gut for larvae fed Food-1, 0.155 ± 0.05 mU/gut for larvae fed Food-2, 0.1 ± 0.041 mU/gut for larvae fed Food-1 + 5 % amino acids, and 0.189 ± 0.08 mU/gut for larvae fed Food-1 + 5 % glucose.

3.4. Concentration of free amino acids and total proteins in Food-1 and 2

To better interpret the previously measured activities, the concentration of free amino acids and total proteins was evaluated in Food-1 and Food-2. According to Fig. 6A, the concentration of free amino acid in Food-1 and Food-2 was $61 \mu\text{mol/g}$ and $21 \mu\text{mol/g}$, respectively, indicating that free amino acids concentration is higher in Food-1 than in Food-2.

On the other hand, Food-2's total protein concentration is considerably higher, at 53 mg/g , compared to Food-1's 9.5 mg/g , as shown in Fig. 6B.

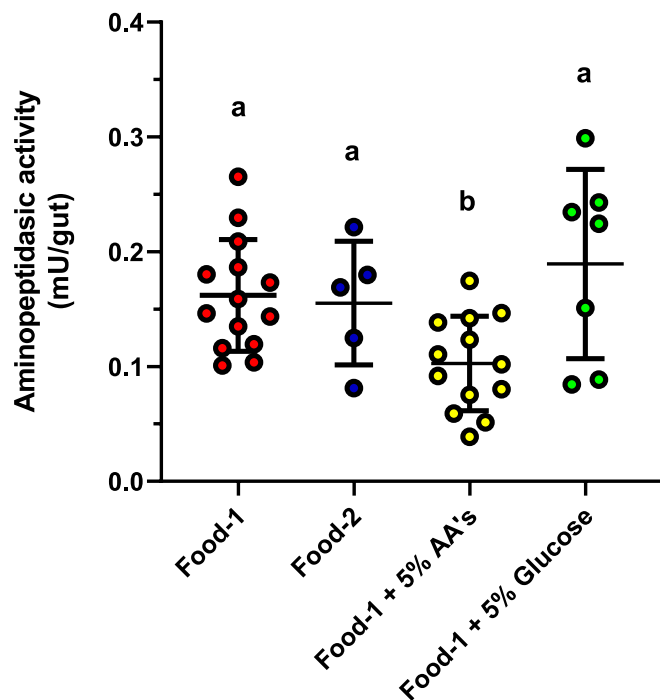


Fig. 5. Aminopeptidase activity in the midgut of *Lutzomyia longipalpis* L3 larvae under different treatments. Aminopeptidase activity was measured in the posterior midgut of *L. longipalpis* L3 larvae subjected to different treatments: larvae fed exclusively with Food-1, Food-2, Food-1 + 5 % amino acids, and Food-1 + 5 % glucose. After 4 h consuming the offered material, the aminopeptidase activity was measured with L-Alanine p-nitroanilide as substrate. Readings were taken at 415 nm in kinetic mode and results were expressed as mU (one enzyme unit (U) is the amount that hydrolyzes one μmol of substrate per min), normalized to the equivalent of one gut. For all groups, the Shapiro-Wilk normality test was performed, followed by One-way ANOVA. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3.5. Countercurrent flow inference

Although critical for digestive physiology in several insect species, countercurrent flow has been demonstrated in a relatively small number of them. The experimental approach used here allowed the observation of an accumulation of Trypan Blue in the anterior midgut (Fig. 7). This accumulation is indirect evidence for the existence of countercurrent flow in sand fly larvae.

4. Discussion

In holometabolous insects, the immature stages are specialized for continuous feeding and nutrient storage to sustain the insect during the pupal stage when feeding is not possible. Adults, on the other hand, are specialized in utilizing food or nutrient reserves stored in the fat body for reproduction (Chapman, 1998).

Intestinal flow, the rate at which ingested material moves through the digestive tract, reflects the voracity of larvae. In *L. longipalpis* larvae, the intestinal flow measured under our experimental conditions ranged between 214 ± 48 and 171 ± 29 min, depending on the nutritional quality of the food provided to the larvae. According to the results shown in Fig. 3, ingesting a more nutritious food decreases intestinal flow. This likely occurring because richer food requires more time to be digested. That was the case of the Food 2 with at least five times more protein than the Food-1 (Fig. 6B).

The control of intestinal motility in insects is primarily achieved in two ways: through motor neurons directly connected to the musculature surrounding the gut or through hormones released into the hemolymph by enteroendocrine cells or the neuroendocrine system (Orchard and Lange, 2024; Spit et al., 2012). Experimental evidence has demonstrated that certain hormones can regulate intestinal muscle contractions. In general, gut motility is controlled by myostimulants such as proctolin, allatotropin, kinins, and DH31, as well as by myoinhibitors like allatostatsins, myosuppressin, and other myoinhibitory peptides (Abou El Asrar et al., 2020; Dillen et al., 2014; Spit et al., 2012). The release of these hormones by enteroendocrine cells or the neuroendocrine system is likely regulated by nutrient perception. Enteroendocrine cells probably respond to nutrients via gustatory receptors (LaJeunesse et al., 2010; Orchard and Lange, 2024; Park and Kwon, 2011; Park et al., 2016) located on the luminal-facing surface of these cells. Hormone release from the neuroendocrine system is likely influenced by nutrients entering the insect's hemolymph from the gut.

According to observations in *L. longipalpis* larvae, intestinal flow completely ceases without food. This indicates that without food for the larvae to ingest, the hormones that would stimulate gut motility are either not released into the hemolymph or are insufficient to stimulate motility and defecation without the direct contribution of the nervous system.

Like intestinal motility, the production of digestive enzymes may also be regulated by the quality of nutrients that larvae ingest. This study investigated the influence of nutrients on the production of digestive enzymes by measuring the activity of enzymes involved in protein digestion. Trypsin, the main digestive endoprotease in *L. longipalpis* larvae, and aminopeptidases capable of hydrolyzing the substrate L-Alanine p-nitroanilide were selected for this analysis (Fazito do Vale et al., 2007).

The results showed that trypsinolytic activity increases with the intake of amino acids present in the diet, whether as free amino acids or those in ingested proteins (Fig. 4A-C). This observation is consistent with findings in *A. aegypti* females, where activation of the TOR pathway by amino acid intake enhances trypsin production in the midgut (Brandon et al., 2008). A similar result was also observed in *L. longipalpis* females (Silva Fernandes et al., 2020). In their study, the authors demonstrated that the monosaccharide galactosamine could compete with amino acids in activating the TOR pathway, decreasing in trypsin production. This effect could be reversed by increasing the

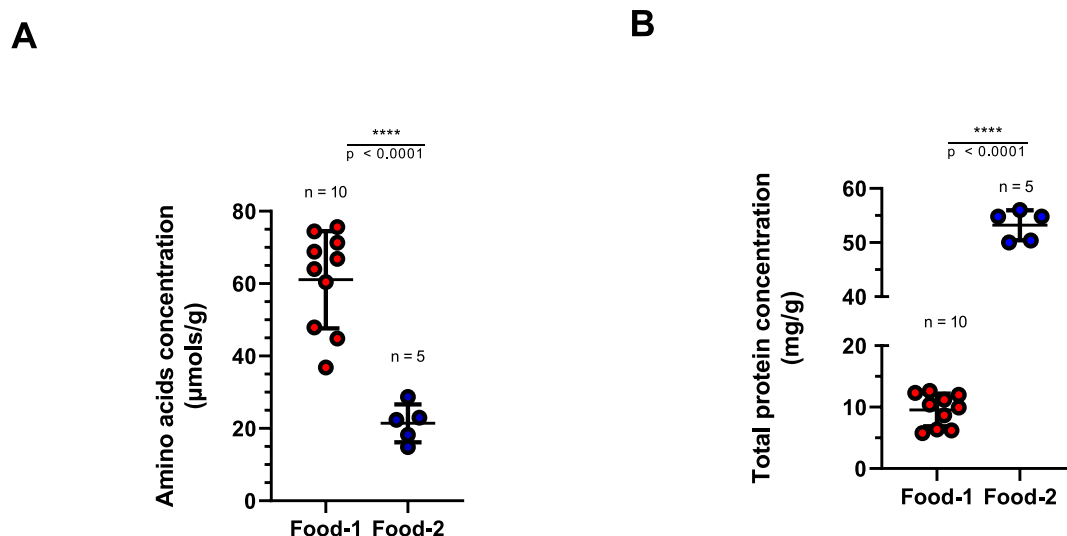
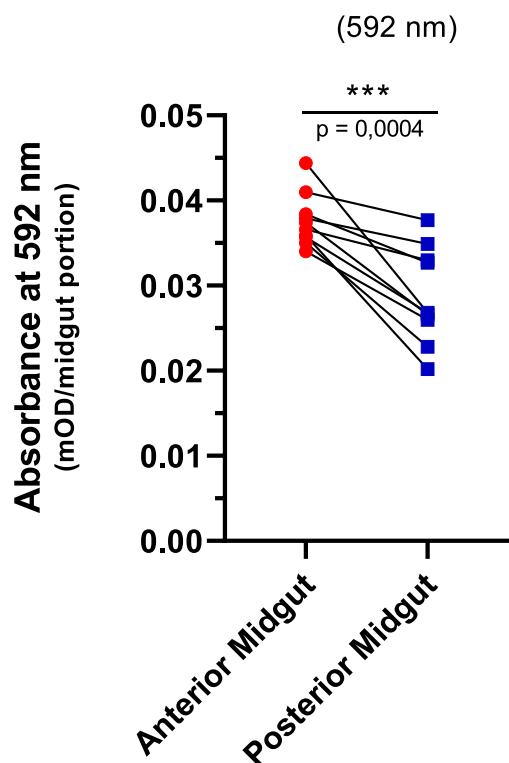


Fig. 6. Concentration of total proteins and free amino acids in Food-1 and Food-2. (A) Free amino acid concentration in Food-1 and Food-2, expressed in micromoles per gram of food. (B) Total protein concentration in Food-1 and Food-2, expressed in milligrams per gram of food. For both groups, the Shapiro-Wilk normality test was performed, followed by the Student's *t*-test for unpaired samples. Differences were considered significant at $p < 0.05$.



Midgut division considering equal parts

Fig. 7. Distribution of Trypan Blue dye in the midgut of *Lutzomyia longipalpis* L3 larvae. Each point represents a larva fed with Food-1 containing Trypan Blue dye (10 mg per gram of food). The larvae were fed with this diet for approximately 24 h. After the feeding period, they were frozen, and their midgut was divided into two parts: anterior and posterior portions. The intestinal halves were then homogenized, centrifuged, and the supernatant was read at 592 nm in a plate reader. For both groups, the Shapiro-Wilk normality test was performed, followed by the Student's *t*-test for paired samples. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

concentration of free amino acids in the ingested blood.

In contrast to trypsin, aminopeptidase activity remained stable across almost all treatments in our study, with a slight drop in the presence of added amino acids mixed with Food-1. In *L. longipalpis* larvae, aminopeptidases are attached to the microvilli of enterocytes in the posterior midgut (Fazito do Vale et al., 2007). Their attachment likely prevents or reduces the loss of these enzymes in the feces, meaning a fixed amount of aminopeptidases would be sufficient for efficient digestion.

The larvae of *L. longipalpis* feed continuously, unlike adult mosquitoes and sandflies, which feed in batches (taking a blood meal and digesting it before initiating a new feeding cycle) (Soares and Turco, 2003). In *L. longipalpis* larvae, the stimulus for digestive enzyme production remains constant, increasing or decreasing depending on amino acid availability. Glucose did not influence the production of enzymes involved in protein digestion, though it might affect the production of carbohydrases. No information exists on regulating enzymes involved in carbohydrate, lipid, or nucleic acid digestion in *L. longipalpis* larvae.

A short midgut and rapid luminal flow, as observed in *L. longipalpis* larvae, would lead to a significant loss of soluble digestive enzymes. However, an efficient countercurrent flow minimizes this loss. According to the results shown in Fig. 7, it is possible to infer that *L. longipalpis* larvae exhibit a countercurrent flow capable of concentrating the Trypan Blue dye in the anterior midgut. Freezing the larvae in liquid nitrogen was crucial to prevent the loss of luminal contents during the procedures.

Although numerous studies have explored hormones that stimulate intestinal motility, the scientific literature needs more information regarding the relationship between intestinal motility and the nutritional quality of insect-ingested food. The production of digestive enzymes was affected by the material that the larvae ingested. As with enzymes, intestinal motility may also be modulated by the type of nutrient consumed. That is an interesting issue to be investigated in the future.

CRediT authorship contribution statement

Lucas Gabriel Ferreira Malta: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Bianca Stacanelli Ribeiro:** Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation.

Davi Viegas Melo: Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Visualization. **Marques Serafim Pinho-Junior:** Methodology, Investigation, Data curation, Validation, Visualization. **Maurício Roberto Viana Sant'Anna:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Marcos Horário Pereira:** Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Nelder Figueiredo Gontijo:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – INCT- Entomologia Molecular – CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank César Nonato de Oliveira for technical assistance.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- Abou El Asrar, R., Cools, D., Vanden Broeck, J., 2020. Role of peptide hormones in insect gut physiology. *Curr. Opin. Insect Sci.* 41, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.07.004>.
- Barroso, I.G., Fuzita, F.J., Ferreira, C., Terra, W.R., 2020. Midgut fluxes and digestive enzyme recycling in *Musca domestica*: A molecular approach. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 241, 110627. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110627>.
- Berridge, J.M., 1970. A structural analysis of intestinal absorption. In: *Insect Ultrastructure. Symposia of the Royal Entomological Society of London. University of Oxford and Edinburgh, United Kingdom*, pp. 135–151.
- Biagio, F.P., Tamaki, F.K., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., 2009. Digestive morphophysiology of *Grylodes sigillatus* (Orthoptera: Gryllidae). *J. Insect Physiol.* 55, 1125–1133. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.08.015>.
- Bolognesi, R., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., Ferreira, C., 2001. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: Secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 62–75. <https://doi.org/10.1002/arch.1037>.
- Bolognesi, R., Terra, W.R., Ferreira, C., 2008. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency. Theoretical and experimental models. *J. Insect Physiol.* 54, 1413–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.002>.
- Brandon, M.C., Pennington, J.E., Ise, J., Zamora, J., Schillinger, A.S., Miesfeld, R.L., 2008. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 916–922. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.07.003>.
- Caldeira, W., Dias, A.B., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., 2007. Digestive enzyme compartmentalization and recycling and sites of absorption and secretion along the midgut of *Dermestes maculatus* (Coleoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 64, 1–18. <https://doi.org/10.1002/arch.20153>.
- Chapman, R.F., 1998. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press.
- Chopra, G., Kaushik, S., Kain, P., 2022. Nutrient sensing via gut in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 2694. <https://doi.org/10.3390/ijms23052694>.
- De Virgilio, C., Loewith, R., 2006. The TOR signalling network from yeast to man. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1476–1481. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.013>.
- Dillen, S., Zels, S., Van Wielendaele, P., Spit, J., Nachman, R., Vanden Broeck, J., 2014. Peptidergic Control Of Food Intake and Digestion In Insects. *European Congress of Entomology*, in.
- Fazito do Vale, V., Pereira, M.H., Gontijo, N.F., 2007. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Insect Physiol.* 53, 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.06.005>.
- Ferreira, A.H.P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., Ferreira, C., 2002. Secretion of β -glycosidase by middle midgut cells and its recycling in the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* 48, 113–118. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00151-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00151-2).
- Fingar, D.C., Blenis, J., 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 3151–3171. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207542>.
- Gonzalez, S., Rallis, C., 2017. The TOR signaling pathway in spatial and temporal control of cell size and growth. *Front. Cell Dev. Biol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00061>.
- Gulia-Nuss, M., Robertson, A.E., Brown, M.R., Strand, M.R., 2011. Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020401>.
- Haeger, G., Bongaerts, J., Siegert, P., 2022. A convenient ninhydrin assay in 96-well format for amino acid-releasing enzymes using an air-stable reagent. *Anal. Biochem.* 654, 114819. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114819>.
- Holtorf, M., Lenaerts, C., Cullen, D., Vanden Broeck, J., 2019. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. *Cell Tissue Res.* 377, 397–414. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03031-9>.
- LaJeunesse, D.R., Johnson, B., Presnell, J.S., Catignas, K., Zapotoczny, G., 2010. Peristalsis in the junction region of the *Drosophila* larval midgut is modulated by DH31 expressing enteroendocrine cells. *BMC Physiol.* 10, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-14>.
- Modi, G.B., Tesh, R.B., 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 20, 568–569. <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.5.568>.
- Monteiro, E.C., Tamaki, F.K., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., 2014. The digestive system of the “stick bug” *Cladomorphus phyllinus* (Phasmida, Phasmatidae): A morphological, physiological and biochemical analysis. *Arthropod Struct. Dev.* 43, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2013.11.005>.
- Orchard, I., Lange, A.B., 2024. The neuroendocrine and endocrine systems in insect – Historical perspective and overview. *Mol. Cell. Endocrinol.* 580, 112108. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.112108>.
- Park, J., Chen, J., Jang, S., Ahn, T.J., Kang, K., Choi, M.S., Kwon, J.Y., 2016. A subset of enteroendocrine cells is activated by amino acids in the *Drosophila* midgut. *FEBS Lett.* 590, 493–500. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12073>.
- Park, J.-H., Kwon, J.Y., 2011. Heterogeneous expression of *Drosophila* gustatory receptors in enteroendocrine cells. *PLoS One* 6, e29022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029022>.
- Rêgo, F.D., Soares, R.P., 2021. *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector. *An. Acad. Bras. Cienc.* 93. <https://doi.org/10.1590/0001-376520210200254>.
- Silva Fernandes, T.L., Pereira-Filho, A.A., Nepomuneno, D.B., de Freitas Milagres, T., Ferreira Malta, L.G., D'Ávila Pessoa, G.C., Koerich, L.B., Pereira, M.H., Araujo, R.N., Gontijo, N. de F., Viana Sant'Anna, M.R., 2020. Galactosamine reduces sandfly gut protease activity through TOR downregulation and increases *Lutzomyia* susceptibility to *Leishmania*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 122, 103393. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103393>.
- Soares, R.P.P., Turco, S.J., 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): A review. *An. Acad. Bras. Cienc.* 75, 301–330. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000300005>.
- Spit, J., Badisco, L., Verlinden, H., Van Wielendaele, P., Zels, S., Dillen, S., Vanden Broeck, J., 2012. Peptidergic control of food intake and digestion in insects. This review is part of a virtual symposium on recent advances in understanding a variety of complex regulatory processes in insect physiology and endocrinology, including development, metabolism. *Can. J. Zool.* 90, 489–506. <https://doi.org/10.1139/z2012-014>.
- Starcher, B., 2001. A Ninhydrin-Based Assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Anal. Biochem.* 292, 125–129. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5050>.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1981. The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: Digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara*. *J. Insect Physiol.* 27, 325–331. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(81\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(81)90078-0).
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2020. Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. *Arthropod Struct. Dev.* 56, 100931. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100931>.
- Treherne, J.E., 1959. Amino acid absorption in the Locust (*Schistocerca gregaria*, Forsk.). *J. Exp. Biol.* 36, 533–545. <https://doi.org/10.1242/jeb.36.3.533>.
- Wigglesworth, V.B., 1933. The function of the anal gills of the mosquito larva. *J. Exp. Biol.* 10, 16–26. <https://doi.org/10.1242/jeb.10.1.16>.
- Wu, K., Li, S., Wang, J., Ni, Y., Huang, W., Liu, Q., Ling, E., 2020. Peptide hormones in the insect midgut. *Front. Physiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00191>.