

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

**CONTROLE DO pH NO TUBO DIGESTIVO DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus,
1762) EM DIFERENTES CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS**

DENISE BARGUIL NEPOMUCENO

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS – BRASIL

2015

Denise Barguil Nepomuceno

CONTROLE DO pH NO TUBO DIGESTIVO DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) EM DIFERENTES CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de Concentração: Entomologia

Orientador: Dr. NELDER DE FIGUEIREDO GONTIJO

Co-Orientador: Dr^a VÂNIA CRISTINA DOS SANTOS

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos

Departamento de Parasitologia – ICB - UFMG

Outubro/2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, minha família, meus amigos, e por todas as oportunidades que Ele pôs no meu caminho.

A meus pais Geraldo e Jorgeana, obrigada por todo o apoio e carinho que sempre me deram e por fazerem de tudo para que pudesse alcançar meus objetivos, pelos puxões de orelha e por todos os “não” que me fizeram amadurecer. A minha cachorrinha Lola, que faleceu no início desse ano, mas sempre estará presente na minha memória, por ter tornado o tempo que estive comigo uns dos melhores da minha vida. Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo pela confiança, atenção e paciência. Obrigada pela dedicação a esse projeto, por indicar o melhor caminho a ser seguido e por me auxiliar sempre que necessário, mesmo que algumas “aberrações” tenham acontecido!

A minha co-orientadora Dr^a. Vânia Cristina dos Santos, por me aconselhar, me acalmar nos momentos de nervosismo e ansiedade, pela paciência em me ensinar como realizar os experimentos, obrigada!

A Dr^a. Veruska Barros por ter sido a pessoa que deu início a tudo. Muito obrigada pela confiança e por ter me introduzido nesse mundo de trabalho duro, mas muito recompensador.

Ao Laboratório de Malária do Instituto René Rachou (FIOCRUZ – MG), na pessoa do Dr. Luciano Moreira e da Dr^a Caroline Oliveira por gentilmente cederem material biológico.

Ao Departamento de Parasitologia e aos professores do programa de Pós-Graduação em Parasitologia, por todos os ensinamentos passados e pela disponibilidade em esclarecer dúvidas.

A todos do LFIH que me receberam de braços abertos na primeira vez conheci o laboratório e àqueles que conheci posteriormente: Rafa, Mércia, Monique, Elizângela, Antônio, Naylene, Paula, Adalberto, Tati, César, Márcia. Vocês são todos muito importantes para mim e tornaram meus dias muito mais alegres!

Agradeço também a Luciana Ramos, por ter me acolhido de braços abertos nas minhas primeiras vindas a Belo Horizonte e por me ajudar a familiarizar com a cidade, com o laboratório e com dicas para a prova de seleção, e até mesmo com as minhas primeiras tentativas de cozinhar. Você me ajudou mais do que imagina!

Ao Alexandre Nascimento pela amizade, pelos momentos de grandes risadas, por ficar até tarde comigo no laboratório quando precisei, e pela incrível capacidade de conseguir pedir

uma coisa mais difícil que a outra, o que me diverte muito! Você é chato, implicante, prestativo, cuidadoso e preocupado como todo irmão mais velho deve ser! Obrigada por tudo!

As minhas grandes amigas Laura Maggi e Andressa Noronha, obrigada por me ajudarem, me aconselharem, por darem broncas quando necessário. Por sempre estarem dispostas a me escutar e me indicar o melhor a ser feito. A amizade de vocês fez e faz muita diferença para mim e espero que a mantenhamos para sempre!

A minha turma super especial, mais que demais do mestrado! Michelle, Thayse, Gabriel, Ramon, Luíza, Jordana, Vanessa, obrigada por terem tornado esses anos de mestrado os melhores possíveis! Vocês são demais!

Às meninas da república, especialmente Cyrana e Sidô, que são duas pessoas maravilhosas, as quais me acolheram imensamente bem sem me conhecer, se tornaram grandes amigas, e sempre estão dispostas a me ajudar, escutar e aconselhar, além de terem me ajudado a amadurecer a visão de mundo que eu tinha.

A minha super amiga Thacyanne Martinelli, pelo companheirismo, amizade, por ter me acalmado em momentos de angústia e nervosismo, por estar sempre presente e disposta a me ajudar custe o que custar, e por ter lido a dissertação com o maior carinho. Obrigada por todos os conselhos e pela paciência enorme para aquelas perguntas que estou cansada de fazer e você cansada de responder! Belo Horizonte não seria a mesma sem a sua amizade!

As minhas amigas de Teresina: Nathalia, Érica, Idna, Marina, Carol, Denise e Ana Clara. Mesmo com toda a distância nunca deixaram de me auxiliar, seja com conselhos, mensagens de carinho, ou apenas perguntando como eu estava. Cada uma com seu jeito particular foram muito importantes nos momentos mais difíceis dessa caminhada e sempre vibraram com minhas conquistas. Amo vocês, meninas!

À Fapemig, pelo apoio financeiro.

À Sumara e Sibebe, da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, por estarem sempre prontas a ajudar em tudo todos os alunos do programa, pelo grande carinho e atenção.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia – ICB – UFMG, e contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Soroalbumina

EDNH - Hormônio Neurosecretado para Desenvolvimento de Ovos

EI - Inibidores de Elastase

HEPES - 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulphonic acid

IMT - Intestino Médio Torácico

IMA - Intestino Médio Abdominal

LFIH - Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos

MES - 2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid

PAI-2 - Ativador 2 de plasminogênio

SFI - Solução Fisiológica de Insetos

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema do canal alimentar de *Aedes aegypti*. *Página 13*.
- Figura 2 - Aparelho intestinal de *Aedes aegypti*. *Página 14*.
- Figura 3 - Posicionamento das fêmeas de *Aedes aegypti* para realização da técnica de alimentação forçada. *Página 20*.
- Figura 4 (A) - Cores das soluções padrão do Azul de Bromotimol em diferentes pHs. *Página 21*.
- Figura 4 (B) - Cores das soluções padrão do Púrpura de bromocresol em diferentes pHs. *Página 21*.
- Figura 5 - Representação do aparato utilizado para a medição do pH no intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*. *Página 22*.
- Figura 6 - Medição do pH do intestino médio abdominal após repasto sanguíneo. *Página 23*.
- Figura 7 - Padrão de cores do corante azul de Bromotimol diluído em soro para diferentes valores de pH.
- Figura 8 - Padrão de cores do corante azul de Bromotimol utilizado para determinar o pH após alimentação com soroalbumina e ovoalbumina. *Página 26*.
- Figura 9 (A) - Intervalos de pH observados no Intestino Médio Torácico de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com SFI + Tampão HEPES 160mM, contendo azul de bromotimol 0,1%. *Página 28*.
- Figura 9 (B) - Intervalos de pH observados no Intestino Médio Abdominal de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com SFI + Tampão HEPES 160mM, contendo azul de bromotimol 0,1%. *Página 28*.
- Figura 10(A) - Intervalos de pH observados no Intestino Médio Torácico de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com SFI + Tampão HEPES 160mM, púrpura de bromocresol 0,1%. *Página 29*.
- Figura 10 (B) - Intervalos de pH observados no Intestino Médio Abdominal de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com SFI + Tampão HEPES 160mM, púrpura de bromocresol 0,1%. *Página 29*.
- Figura 11 - Intestinos Médio Torácico (IMT) e Abdominal (IMA) de *Aedes aegypti* após alimentação forçada utilizando SFI + HEPES 160mM + Azul de Bromotimol 0,1%. *Página 29*.
- Figura 12 - Valores de pH observados no intestino médio torácico em fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue após ingestão de sacarose 10% com o corante indicador azul de bromotimol. *Página 30*.

Figura 13 - Valores de pH observados no intestino médio torácico em fêmeas alimentadas com sangue após ingestão de sacarose 10% com o corante indicador púrpura de bromocresol. *Página 30.*

Figura 14 - pHs observados em diferentes horários após o repasto sanguíneo no intestino médio abdominal de fêmeas de *Aedes aegypti*. *Página 31.*

Figura 15 - (A) - Intestino Médio Torácico. pHs observados a partir da alimentação com soro total humano em pH 6. *Página 32.*

Figura 15 (B) - Intestino Médio Abdominal. pHs observados a partir da alimentação com soro total humano em pH 6. *Página 32.*

Figura 16 - Colorações adquiridas pelo intestino médio torácico (IMT) e abdominal (IMA) de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com soro total em pH 6. *Página 33.*

Figura 17 - Efeito da alimentação com soro dialisado no pH do intestino médio abdominal de fêmeas de *Aedes aegypti*. *Página 34.*

Figura 18 - Efeito do soro total + MES 30mM (pH 6,0) no pH do intestino médio abdominal (n=18). *Página 35.*

Figura 19 - Efeito do soro dialisado + MES 30mM (pH 6,0) no pH do intestino médio abdominal (n=18). *Página 35*

Figura 20 - Colorações adquiridas pelo intestino médio torácico (IMT) e abdominal (IMA) de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com ovoalbumina pH 7,5. *Página 39.*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - – Efeito da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou solução de aminoácidos 100mM + MES 30mM (pH 6) no pH do intestino médio. *Página 33.*

Quadro 2 – Efeito da alimentação com Soro Total ou Soro Dialisado (pH 6) no pH do intestino médio. *Página 35.*

Quadro 3 - Efeito da alimentação com Soro Total ou Soro Dialisado tamponados com MES 30mM (pH 6) no pH do intestino médio. *Página 36.*

Quadro 4 - Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou Soroalbumina 5%, tamponadas com MES 30mM (pH 6) no pH do intestino médio. *Página 36.*

Quadro 5 - Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou Soroalbumina 5%, tamponadas com HEPES 30mM (pH 7,5) no pH do intestino médio. *Página 37.*

Quadro 6 - Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou Lisozima 5%, tamponadas com MES 30mM (pH 6) no pH do intestino médio. *Página 376.*

Quadro 7 - Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou Ovoalbumina 5% tamponadas com MES 30mM (pH 6) no pH do intestino médio. *Página 38.*

Quadro 8 - Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou Ovoalbumina 5% tamponadas com HEPES 30mM (pH 7,5) no pH do intestino médio. *Página 38.*

Quadro 9 - Distribuição da atividade da enzima alfa-glicosidase nas porções torácica e abdominal do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti* mantidas em jejum. *Página 40.*

Quadro 10 - pH nas regiões torácica e abdominal do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti* após alimentação forçada com diferentes soluções. *Página 44.*

RESUMO

Aedes (Stegomyia) aegypti é importante vetor de patógenos como os vírus da febre amarela, da dengue e, mais recentemente, da febre chikungunya. Apesar da importância da fisiologia do tubo digestivo e do pH intestinal para a digestão e provavelmente para o desenvolvimento de patógenos, pesquisas sobre a regulação do pH em mosquitos adultos são escassas. Flebotomíneos pertencem à mesma subordem dos mosquitos: a subordem Nematocera. Estudos já realizados com fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* mostraram que seu intestino é ligeiramente ácido (pH 6) antes da ingestão de sangue e que o intestino médio abdominal sofre um processo de alcalinização até pH 8,1 logo após o repasto sanguíneo. Desta forma, esse trabalho visou estudar a hipótese de que dípteros nematóceros hematófagos das subfamílias Culicinae e Phlebotominae compartilham os mesmos mecanismos de regulação do pH, já que apresentam o mesmo padrão anatômico e alimentar. Assim, *Aedes aegypti* foi escolhido como modelo experimental. O pH foi medido com microeletrodos sensíveis a concentração de H^+ ou com o uso de corantes vitais indicadores de pH. A enzima alfa-glicosidase, responsável pela digestão de açúcares, foi ensaiada com o substrato sintético p-Nitrofenil-alfa-D-glucopiranosídeo. Os resultados mostram que o intestino médio das fêmeas que se alimentaram somente com açúcar tinha o pH próximo ao pH 6. O pH 6 era mantido mesmo que o mosquito ingerisse soluções tampão com pH diferente. O pH do divertículo mantinha-se semelhante ao da solução ingerida. Quando alimentadas com sangue, o pH do intestino médio abdominal subiu para pH 7,8, enquanto a porção torácica manteve-se ácida (pH~6,0). Na medida em que a digestão avançava o pH do intestino médio abdominal foi caindo lentamente até voltar a pH6. A atividade da enzima alfa-glicosidase mostrou-se proporcionalmente maior no intestino médio torácico, local cujo pH sempre se manteve igual a pH 6, o pH ótimo de ação desta enzima. O mecanismo responsável pelo desligamento do mecanismo de manutenção do pH 6 e pelo disparo do mecanismo de alcalinização, após a ingestão de sangue, parece depender do reconhecimento da presença de uma serpina plasmática no interior do intestino médio abdominal. Em *Aedes* a digestão de sangue e açúcares é compartimentalizada de modo a ocorrerem simultaneamente em pHs diferentes. Nossos resultados estão de acordo com a hipótese de que os Nematocera hematófagos possuem fisiologia digestiva semelhante.

ABSTRACT

Aedes (Stegomyia) aegypti is an important vector of several pathogens, such as yellow fever virus, dengue virus and more recently, chikungunya fever. Despite gut's physiology and intestinal pH importance in digestion and probably for pathogens transmission, there are only a few studies about pH regulation in adult mosquitoes. Studies of digestive physiology in *Lutzomyia longipalpis* females showed they are able to adjust the intestinal pH and enzymatic activity according to the physiological state. In unfed sand flies, midgut's pH is slightly acidic (pH 6,0), and after blood meal the abdominal midgut (where blood is stored to be digested) undergoes abrupt alkalization until pH 8,15. The alkalization mechanism is triggered by the presence of any protein or by free amino acids in high concentration inside midgut. This work aimed to study the hypothesis that hematophagous nematocerans have a mechanism of pH regulation similar to that seen in *Lutzomyia longipalpis*, since they have the same feeding pattern. We chose *Aedes aegypti* as a model to develop our study. We used H⁺-sensitive microelectrodes and indicator dyes to estimate intestinal pH of adult female *A.aegypti* submitted to different conditions: blood feeding, feeding on rich proteins solutions or amino acids solution, and feeding on solutions without proteins. Using buffered solutions provided by forced feeding, we observed that pH in unfed females midgut is acid (pH 6,0). In blood-fed female, pH in abdominal midgut reached a maximum pH of 7,8, while thoracic midgut remained acidic. Unlike *L. longipalpis* female, the mechanism by which *A. aegypti* females notice blood ingestion is linked to the perception of specific proteins found in plasma. These proteins belongs to the serpin family, proteins similar to ovalbumin, which was the only protein tested that was able to influence abdominal midgut's pH. Alpha-glucosidase is a digestive enzyme responsible for sucrose digestion, a common sugar ingested by mosquitoes, and has an optimum pH near pH 6,0. According to our results, this enzyme activity was proportionally higher in thoracic midgut than in abdominal midgut. Therefore, *A. aegypti* also presents compartmentalization of blood and sugar digestion. Our results are in accordance to the hypothesis that hematophagous nematocerans have a similar digestive physiology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 ASPECTOS GERAIS DA BIOLOGIA DE <i>Aedes aegypti</i> E SUA IMPORTÂNCIA COMO VETOR.....	11
1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E DO TUBO DIGESTIVO DOS MOSQUITOS.....	12
1.3 ESTUDOS DO pH INTESTINAL EM INSETOS.....	14
1.4 ALFA-GLICOSIDASE EM MOSQUITOS.....	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE <i>Aedes aegypti</i>	19
4.2 VERIFICAÇÃO DO pH NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> SEM REPASTO SANGUÍNEO.....	19
4.2.1 Procedimento de Alimentação Forçada (adaptado de Hertig & Hertig ,1927).....	19
4.2.2. Medição do pH nas diferentes partes do tubo digestivo.....	20
4.3 MEDIDA DO pH NO INTESTINO MÉDIO ABDOMINAL E NO INTESTINO MÉDIO TORÁCICO DURANTE A DIGESTÃO DO REPASTO SANGUÍNEO EM FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i>	21
4.3.1 Medida do pH no intestino médio abdominal.....	21
4.3.1.a. Confeção de microeletrodos e montagem do aparato para medida do pH no intestino médio abdominal.....	21
4.3.1.b Alimentação de fêmeas e medida do pH intestinal.....	22
4.3.2 Medidas de pH no intestino médio torácico em fêmeas com repasto sanguíneo.....	23

4.4 VERIFICAÇÃO DA POSSÍVEL ATIVAÇÃO DA ALCALINIZAÇÃO DO INTESTINO MÉDIO POR AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS EM FÊMEAS SEM REPASTO SANGUÍNEO.....	24
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA DIGESTIVA ALFA-GLICOSIDASE NAS PORÇÕES TORÁCICA E ABDOMINAL DO INTESTINO MÉDIO	26
4.6 COMITÊ DE ÉTICA.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1 MEDIÇÃO DO pH E AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO ATIVA DO pH 6,0 NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> SEM REPASTO SANGUÍNEO	28
5.2 MEDIDA DO pH INTESTINAL EM FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> ALIMENTADAS COM SANGUE.....	30
5.2.1 Medição do pH no intestino médio torácico.....	30
5.2.2 Medição do pH no intestino médio abdominal.....	31
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO ESTÍMULO QUE PROMOVE ALCALINIZAÇÃO INTESTINAL EM FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> ALIMENTADAS COM SANGUE	32
5.4 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA ATIVIDADE DE ALFA-GLICOSIDASE NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> EM JEJUM.	39
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO I	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DA BIOLOGIA DE *Aedes aegypti* E SUA IMPORTÂNCIA COMO VETOR.

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) é um díptero pertencente à família Culicidae (subfamília Culicinae) encontrado em regiões tropicais e subtropicais entre 35°N e 35°S. Em áreas frias, resiste a temperaturas de até 10°C durante o inverno, e apesar de ter sido encontrado acima de 45°N, sua presença em regiões mais frias relaciona-se a sua capacidade de colonizar tais áreas durante as temporadas de calor. Na América do Sul, o histórico de dispersão de *Aedes aegypti* ocorre em torno de altas latitudes e de áreas tropicais para subtropicais (Díaz-Nieto et al., 2013). Acredita-se que inicialmente tenha migrado da África Ocidental para o Novo Mundo no período entre os séculos XV e XVII através dos navios negreiros. De qualquer forma, a evolução dos hábitos domésticos em uma espécie originalmente selvagem foi crucial para permitir a ocupação e o desenvolvimento do mosquito na água acumulada em toneis de armazenamento que eram mantidos nos porões de tais navios (Lounibos, 2002).

Assim como outros culicídeos, *Aedes aegypti* apresenta desenvolvimento completo (holometabolía), passando pelos estágios de ovo, larvas (L1-L4), pupa e adulto. Os ovos são elípticos ou ovais, e quando postos em contato direto com água usualmente eclodem logo que o desenvolvimento embrionário é concluído. As larvas sempre são aquáticas, com aparelho bucal mastigador-raspador; quando atingem o quarto estágio, passam a fase de pupa, que não se alimenta e então transformam-se em adultos. O tempo de desenvolvimento deste inseto é relativamente curto, e sofre interferência de vários fatores como temperatura, umidade, e número de larvas em um mesmo criadouro. De larva até adulto, são necessários cerca de 7 a 10 dias (Silva et al., 1998). Apenas as fêmeas são hematófagas, e a ingestão de sangue relaciona-se ao desenvolvimento dos ovos; contudo, o metabolismo energético é influenciado diretamente pela ingestão de carboidratos, os quais podem ser obtidos a partir da seiva de plantas, frutos ou flores (Consoli & Oliveira, 1998).

A. aegypti é uma espécie extremamente adaptada a ambientes urbanos, e entra prontamente nas residências com o objetivo de alimentar-se e descansar. A natureza doméstica dessa espécie influencia mais na sua distribuição do que as condições climáticas em si. As fêmeas alimentam-se preferencialmente de sangue humano, e em menor proporção

em outras espécies de vertebrados (Jansen & Beebe, 2010). Isso porque segundo Harrington et al. (2001), ao se alimentarem de sangue humano, estes mosquitos conseguem um melhor aproveitamento de nutrientes e aumentam sua capacidade reprodutiva e de sobrevivência.

Devido a sua elevada proximidade dos seres humanos, *Aedes aegypti* tem grande potencial como vetor de vírus, a exemplo dos vírus da febre amarela, da dengue e, mais recentemente, da febre chikungunya. Estima-se em aproximadamente 390 milhões o número de infecções pelo vírus da dengue por ano, dos quais 96 milhões dos infectados desenvolvem sintomas (Bhatt et al. 2013), o que transforma esta na doença viral, transmitida por um artrópode, de maior morbidade e mortalidade. Em relação ao vírus da febre chikungunya, cerca de 200 casos foram confirmados no Brasil, com a maioria deles tendo sido reportados na costa leste da Bahia, com duas linhagens do vírus detectadas, uma de origem africana e a outra de origem asiática (Maron, 2014).

1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E DO TUBO DIGESTIVO DOS MOSQUITOS

As formas adultas dos mosquitos caracterizam-se por apresentar cabeça globular em ambos os sexos, sendo a metade anterior preenchida por olhos compostos que aproximam-se dorsal e ventralmente da cabeça. Entre eles ficam as antenas, plumosas e maiores nos machos, e pilosas (cerdas mais esparsas) nas fêmeas, as quais são constituídas por três segmentos: escalpo, pedicelo e flagelo, sendo este último formado por 14 seções (Christophers, 1960). Os culicídeos apresentam probóscida longa, reta, escura e cilíndrica, sendo maior nos machos do que nas fêmeas. As peças bucais são constituídas por um par de palpos maxilares (as únicas partes que não fazem parte da probóscida), lábio, labro, hipofaringe, um par de mandíbulas e um par de maxilas. O tórax nas fêmeas é mais largo do que nos machos e consiste em protórax, mesotórax e metatórax, que compreendem as asas, pernas e halteres. As asas são estruturas rígidas, bidimensionais planas, estreitas e membranosas, e não possuem escamas brancas (Andrew & Bar, 2013).

As Figuras 1 e 2 mostram o canal alimentar dos mosquitos, o qual tem início com a bomba cibarial, que tem por função a sucção de alimento, seguida pelos dentes do cibário e a bomba faríngea, a qual induz pressão negativa para que ocorra a ingestão dos alimentos. O esôfago termina em um esfíncter, ao qual se seguem dois divertículos dorsais e um grande divertículo ventral; as glândulas salivares estão anexas ao intestino anterior, com a bomba

salivar desembocando na base da hipofaringe. O intestino médio é elástico e dividido nas porções torácica e abdominal; e, por fim, o intestino posterior é composto pelo íleo, reto e ânus (Consoli & Oliveira, 1998).

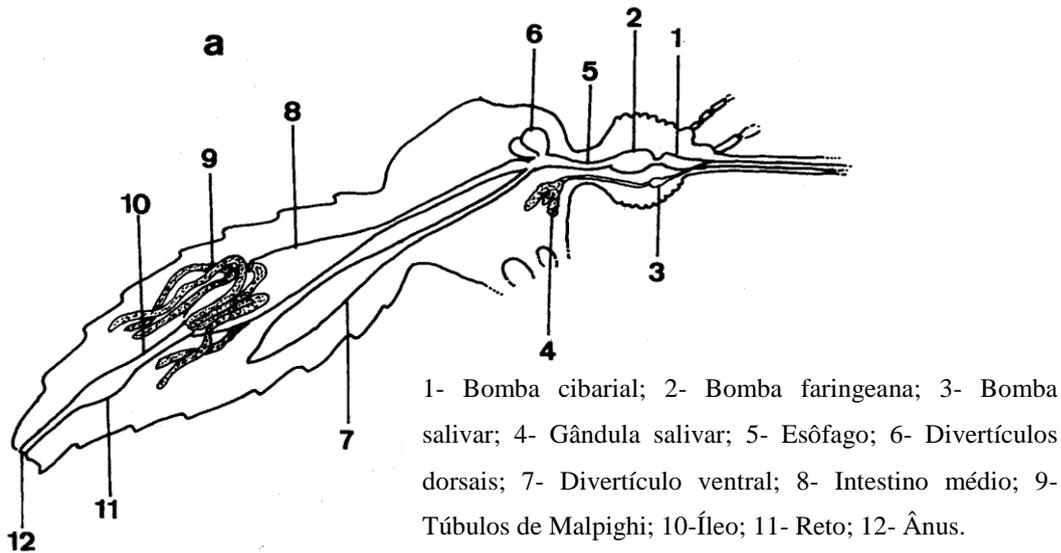


Figura 1 - Esquema do canal alimentar de *Aedes aegypti* (Adaptado de Consoli & Oliveira, 1998).

Os divertículos dorsais são pequenos compartimentos, planos e alongados, enquanto o divertículo ventral é mais longo e delgado, expandindo-se na metade anterior do abdômen, tendo em geral função de armazenar as soluções açucaradas ingeridas pelas fêmeas. O intestino médio, correspondente ao estômago funcional do inseto, é um tubo estreito que estende-se acima e através do tórax e então retorna ao abdômen, onde termina em um alargamento com forma semelhante a de um saco (Snodgrass, 1959). A junção entre os intestinos médio e posterior caracteriza-se por ser o local de inserção dos túbulos de Malpighi. O intestino posterior é composto pela câmara pilórica, intestino anterior, reto e canal anal; já os cinco túbulos de Malpighi são derivados da fase larval, sem qualquer perda celular ou reorganização aparente (Clements, 1992). Esse compartimento em conjunto com os túbulos de Malpighi atua primariamente na osmorregulação, atuando também na reabsorção seletiva de íons aminoácidos e água.

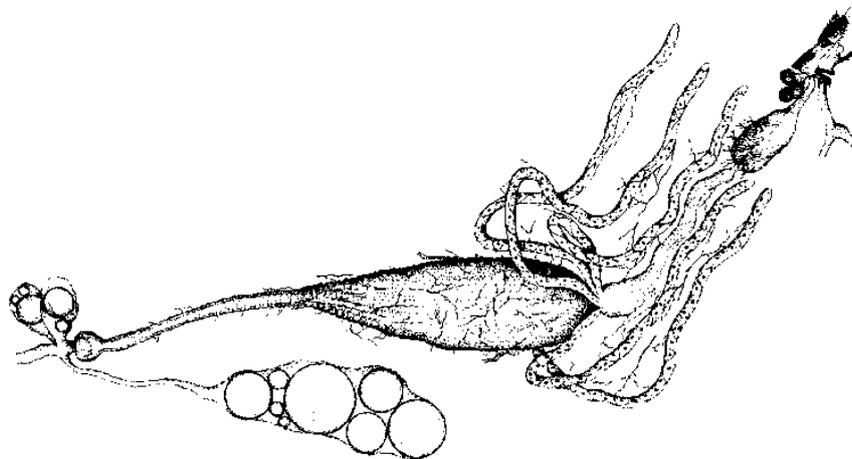


Figura 2 - Aparelho intestinal de *Aedes aegypti* (adaptado de Jobling & Lewis, 1987).

Aedes aegypti conta com intestino composto por uma única camada de células polarizadas envoltas por uma membrana basal, fibras musculares, fibras nervosas e traqueíolas. (Bertram & Bird, 1961). O epitélio intestinal apresenta duas faces: a luminal e a voltada para hemolinfa, as quais têm morfologia muito diferente. O lado luminal consiste basicamente em células que apresentam suas superfícies cobertas por microvilosidades; enquanto o lado voltado para a hemolinfa, além de contar com membrana basal também apresenta fibras musculares e traqueíolas (Zieler et al. 2000).

1.3 ESTUDOS DO pH INTESTINAL EM DÍPTEROS NEMATÓCEROS HEMATÓFAGOS

Até o momento, pouco é conhecido sobre os mecanismos de regulação do pH intestinal em nematóceros hematófagos adultos. Considerando que o pH intestinal pode modular o desenvolvimento de formas promastigotas de *Leishmania*, Gontijo et al. (1998) mediram o pH do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem repasto sanguíneo utilizando os corantes azul de bromotimol e púrpura de bromocresol. Os resultados mostraram que o pH no divertículo é dependente do pH da solução ingerida, porém o pH no intestino médio e no posterior é ativamente controlado por mecanismos que dependem do estado fisiológico do inseto. Também estudando o pH em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* Santos et al. (2008, 2011) verificaram que insetos que não haviam ingerido sangue tinham o intestino médio ligeiramente ácido (pH 6) enquanto que logo após a ingestão do sangue havia a

atuação de dois mecanismos responsáveis por promover alcalinização (liberação de CO₂ e um mecanismo dependente do transporte de íons), os quais faziam o pH subir para aproximadamente pH 8. Percebeu-se então que a ingestão de proteínas era o sinal para promover essa mudança fisiológica em flebotomíneos.

Um dos poucos estudos envolvendo o pH intestinal em mosquitos adultos foi feito por Bilker et al. (2000), que utilizaram microeletrodos H⁺ sensíveis para medir o pH em fêmeas de *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* com repasto sanguíneo. Foi possível verificar que enquanto em fêmeas de *A. stephensi* o pH do intestino médio abdominal atingiu média de 7,84 nas 10 primeiras horas após o repasto sanguíneo e se manteve elevado até 24 horas após o início da digestão, em *A. aegypti* o pH atingiu valor máximo de 7.52 e começou a decair logo nas primeiras horas após o repasto sanguíneo.

del Pilar Corena et al. (2005), ao utilizarem corantes indicadores de pH estimaram que o pH no intestino médio de fêmeas de sem repasto sanguíneo seria entre 8,5 e 9,5. Contudo os mosquitos usados neste experimento haviam ingerido corante indicador juntamente com soro fetal bovino, o que não torna possível afirmar que o mesmo resultado seria verificado caso as fêmeas tivessem ingerido solução desprovida de conteúdo proteico.

Tomando esses dados em conjunto acreditamos haver indícios de que os dípteros hematófagos da subordem Nematocera tais como flebotomíneos, os mosquitos, os simulídeos e os ceratopogonídeos possuem as mesmas características fisiológicas no que diz respeito ao controle do pH intestinal e digestão em geral.

1.4 ALFA-GLICOSIDASE EM MOSQUITOS

Sabe-se que além do sangue, a ingestão de açúcares também é essencial para a sobrevivência e desenvolvimento dos mosquitos. A fonte mais comum é o néctar das flores, mas também podem ser obtidos a partir de secreção de afídios, néctar extraflorais, e até mesmo de secreções produzidas por fungos parasitos (Foster, 1995). Dentre outros componentes, a sacarose é um dos principais constituintes das soluções açucaradas ingeridas por mosquitos (Marinotti & James, 1990) e por ser um dissacarídeo, sua digestão até glicose e frutose deve anteceder a absorção desses monossacarídeos pelo intestino.

Em dípteros hematófagos a digestão de sacarose é realizada pela alfa-glicosidase intestinal, enzima que requer pH ácido, em torno de 6,0 para atuar de maneira ótima (Gontijo et al. 1998), e já foi demonstrado que em *Lutzomyia longipalpis* a digestão de açúcares se dá

no intestino médio torácico em pH ácido, independente da digestão do sangue em pH alcalino no intestino médio abdominal. (Santos et al., 2008).

Segundo Lee & Craig (1983), mosquitos adultos apresentam sensilas cibárias sensíveis à ingestão de sangue e açúcares, permitindo que essas substâncias sejam direcionadas a diferentes compartimentos, como já constatado para *Anopheles darlingi* (Okuda et al. 2005).

Segundo estudo realizado por Souza-Neto et al. (2007) com *Anopheles aquasalis* as alfa-glicosidases que atuam na digestão de açúcares não seriam provenientes das glândulas salivares, mas sim produzidas por células do epitélio intestinal do mosquito, e sua presença não seria dependente da ingestão de açúcar, uma vez que também foram detectadas em fêmeas não alimentadas. Além disso verificou-se que após a ingestão de açúcares a atividade de alfa-glicosidases se concentrou na porção posterior do intestino, sugerindo que seja esse o local onde se concentra a digestão de açúcares.

Acreditamos que por seguirem a mesma alimentação dual, outros dípteros nematóceros hematófagos também apresentem a mesma compartimentalização da digestão e padrão semelhante de distribuição da enzima alfa-glicosidase.

2. JUSTIFICATIVA

A ordem Diptera e subordem Nematocera englobam insetos que atuam como vetores de algumas das mais importantes doenças da atualidade. Billker et al. (1997) relataram que o aumento do pH e a queda na temperatura no intestino podem induzir a exflagelação de *Plasmodium berghei in vitro*. Segundo Salazar et al. (2007) o tecido intestinal de *Aedes aegypti* é o primeiro a ser afetado quando o inseto é infectado pelo vírus DENV-2, o que pode estar relacionado a algum aspecto fisiológico do órgão, havendo também a possibilidade de que alfa-glicosidasas encontradas em *A. aegypti* atuem como fatores determinantes para o sucesso da infecção por DENV-2 (Kang et al., 2014).

Em *Lutzomyia longipalpis*, o pH do intestino médio já foi determinado em diferentes situações fisiológicas, e observou-se que este inseto possui mecanismos capazes de ajustar o pH intestinal de acordo com o tipo de alimento ingerido a ser processado (sangue ou açúcares) (Santos et al., 2011). Mais recentemente, estudos realizados em *L. longipalpis* infectados com *Leishmania* mostraram que há uma complexa relação entre a fisiologia intestinal do flebotomíneo e o ciclo de reprodução e diferenciação do protozoário em seu tubo digestivo (Santos et al., 2014).

Visto que a fisiologia de *A. aegypti* também parece afetar o desenvolvimento do vírus da dengue, e considerando que ainda há muito que se esclarecer sobre a fisiologia do tubo digestivo de culicídeos adultos, o presente trabalho visou a estudar a hipótese de que os dípteros nematóceros hematófagos possuem mecanismo de regulação do pH semelhante ao descrito para flebotomíneos, uma vez que compartilham o mesmo padrão alimentar.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar o pH do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti* e os mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação do pH durante a digestão de sangue e açúcares.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o pH nas porções torácica e abdominal do intestino médio em fêmeas sem repasto sanguíneo;
- Medir o pH nas porções torácica e abdominal do intestino médio em fêmeas alimentadas com sangue;
- Determinar quais estímulos presentes no sangue induzem mudança no pH intestinal;
- Avaliar se ocorre compartimentalização da atividade da enzima digestiva alfa-glicosidase no intestino médio de fêmeas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE *Aedes aegypti*

Para a realização dos experimentos foram utilizadas fêmeas de *Aedes aegypti*, linhagem Br, não infectadas com *Wolbachia*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Malária (LAMAL), do Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz Minas).

Os espécimes adultos foram mantidos em gaiolas de náilon, a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e umidade de 70%, com variação de $\pm 10\%$, e alimentados com sacarose 10%. Todos os mosquitos utilizados nos experimentos tinham idade mínima entre 03 e 04 dias.

4.2 VERIFICAÇÃO DO pH NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS DE *Aedes aegypti* SEM REPASTO SANGUÍNEO.

Para determinar o pH do intestino médio de *Aedes aegypti* foram utilizadas fêmeas com 3 a 4 dias até idade aproximada de 7 a 8 dias. Para isto, os mosquitos ingeriram soluções altamente tamponadas com HEPES 160 mM ($\text{pK}_a=7,48$) pH 7,5 contendo corantes indicadores de pH em concentração final de 0,1%. Foram utilizados dois corantes indicadores vitais para essas medidas: azul de bromotimol ($\text{pK}_a = 7,1$) e púrpura de bromocresol ($\text{pK}_a = 6,3$). Supondo-se que em *A. aegypti* o pH do intestino médio em fêmeas não alimentadas com sangue seja ácido, soluções fortemente tamponadas em pH diferente do hipotetizado para essa condição fisiológica permitiria verificar se o intestino possui mecanismo ativo de manutenção de pH.

4.2.1 Procedimento de Alimentação Forçada (adaptado de Hertig & Hertig ,1927)

O procedimento para alimentação forçada foi inicialmente idealizado por Hertig & Hertig (1927) e, desde então, submetida a várias adaptações de acordo com os objetivos envolvidos. Através desta técnica as peças bucais do mosquito foram inseridas em um microcapilar de vidro, o que desencadeia o reflexo da ingestão, estimulando a sucção da solução contida no microcapilar.

Fêmeas de *Aedes aegypti* são capazes de ingerir até 2 μl de sangue durante o repasto sanguíneo, cujo peso bruto é predominantemente representado por proteínas (Isoe et al. 2009). Através da técnica de alimentação forçada foi possível estimular a ingestão de aproximadamente 1 μl de soluções tamponadas com HEPES e MES ($\text{pK}_a = 6,1$), em

concentrações suficientes para permitir a visualização dos corantes nas diferentes partes do intestino.

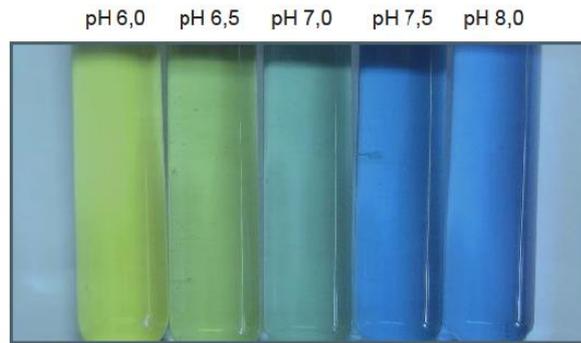
Os tubos microcapilares foram obtidos a partir da constrição das extremidades de tubos capilares de vidro, para que a probóscida do mosquito fosse inserida no orifício obtido. Utilizou-se massa de modelar como suporte para o microcapilar, o que permitiu a movimentação e o ajuste deste às peças bucais do mosquito. Os insetos foram postos com a parte dorsal voltada para uma ponteira de plástico de 1,0mL coberta por uma tela de tecido voal, e assim mantidos pela sucção contínua de uma bomba de vácuo (FANEN[®] 089-CA) conectada à ponteira (Figura 3). Tal procedimento foi realizado com o auxílio de uma lupa estereoscópica (SZ-PT, Olympus[®], Japan).



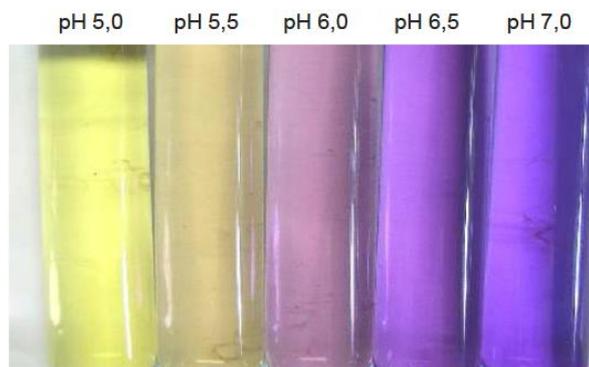
Figura 3 - Posicionamento das fêmeas de *Aedes aegypti* para realização da técnica de alimentação forçada.

4.2.2. Medição do pH nas diferentes partes do tubo digestivo

Logo após o término da alimentação forçada as fêmeas foram dissecadas sob lupa estereoscópica e o pH intestinal foi dado a partir da comparação da cor do corante ingerido com as cores de soluções padrão para azul de bromotimol e púrpura de bromocresol apresentada na Figura 4. Todas as observações foram feitas sob a mesma iluminação.



A) Azul de Bromotimol



B) Púrpura de Bromocresol

Figura 4 - Cores das soluções padrão em diferentes pH.

4.3 MEDIDA DO pH NO INTESTINO MÉDIO ABDOMINAL E NO INTESTINO MÉDIO TORÁCICO DURANTE A DIGESTÃO DO REPASTO SANGUÍNEO EM FÊMEAS DE *Aedes aegypti*.

4.3.1 Medida do pH no intestino médio abdominal

Uma vez que não é possível medir o pH de fêmeas alimentadas com sangue usando corantes indicadores de pH foi necessário utilizarmos outra metodologia, a qual consiste no uso de microeletrodos construídos com ionóforo de H^+ (Santos et al., 2008).

4.3.1.a Confecção de microeletrodos e montagem do aparato para medida do pH no intestino médio abdominal.

A partir de micropipetas com pontas finas, foram confeccionados dois tipos de microeletrodos: de referência e condutor de íons H^+ . À ponta das micropipetas utilizadas como microeletrodos de referência foram adicionados 0,5 μ l de solução de agarose 0,2% em KCl 3,0M, e após gelificação da agarose as micropipetas foram preenchidas com solução KCl

3,0M. Àquelas utilizadas como microeletrodos condutores de H^+ foi adicionado 1,0 μ l de mistura constituída por 0,7 μ l de PVC 0,075% dissolvido em tetrahidrofurano e 0,3 μ l de ionóforo para H^+ , posteriormente sendo postas em câmara de dessecação por sete dias para evaporação do solvente tetrahidrofurano.

Imediatamente antes de serem utilizados, os microeletrodos H^+ sensíveis foram preenchidos com tampão MES/Tris, pH 4,3 0,1M, contendo KCl 0,1M. Ambos os microeletrodos foram conectados a um multímetro de alta impedância através de fios de Ag-AgCl. Para cada experimento, fez-se a calibração dos microeletrodos em seis diferentes pontos de pH (pH 6 a pH 8,5) antes e depois das medições no intestino. Os valores obtidos possibilitaram construir uma curva de calibração, e a partir desta determinar o pH das porções do tubo digestivo onde os microeletrodos foram inseridos. Apenas as medições que mantiveram calibração com variação de até 5%, antes e depois das medições, foram consideradas válidas. O aparato que foi utilizado para esta metodologia está representado esquematicamente na Figura 5.

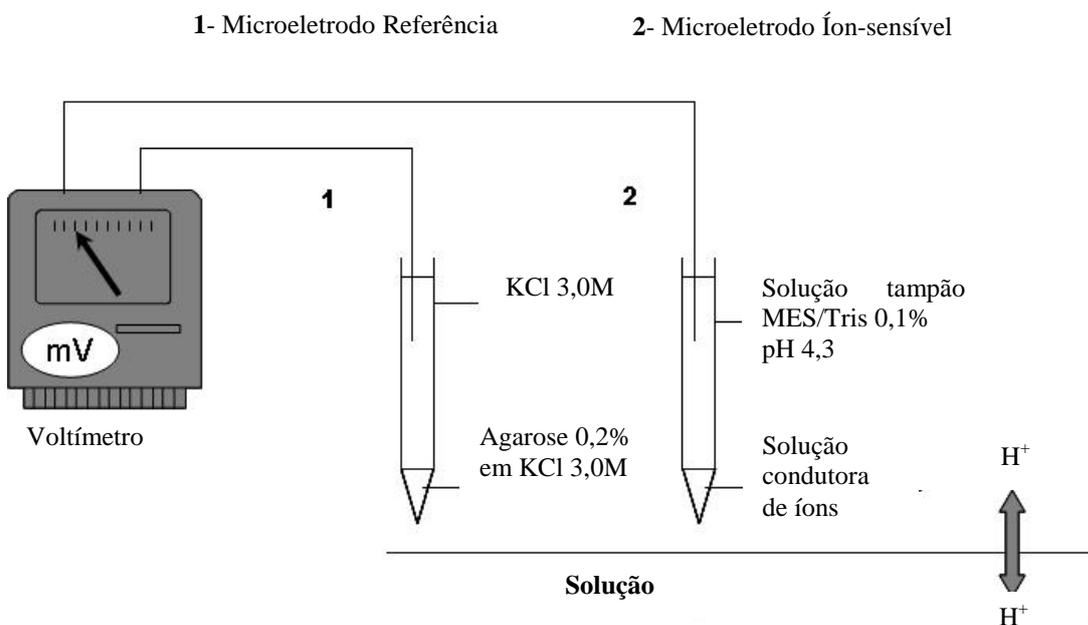


Figura 5 - Representação do aparato utilizado para a medição do pH no intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*.

4.3.1.b Alimentação de fêmeas e medida do pH intestinal.

Para o repasto sanguíneo de *Aedes aegypti* foram utilizados *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) anestesiados com Tiopental® (0,2ml/100g). Depois de anestesiados, foi posto um *hamster* em cada gaiola de náilon contendo fêmeas de 3 a 4 dias de idade, as quais tiveram 1 hora para realizar o repasto. As medidas do pH intestinal foram feitas no intervalo de 0 a 50

horas após o repasto sanguíneo, e, para isso, uma fêmea ingurgitada era escolhida e então posicionada ventralmente em suporte metálico apropriado.

Com auxílio de micromanipuladores, e lupa estereoscópica (SZ-PT, Olympus[®], Japan) um par de microeletrodos previamente calibrado foi introduzido no intestino médio abdominal da fêmea, o que foi feito através da cutícula do abdômen, não havendo necessidade de dissecar o inseto (Figura 6).

Os valores de pH obtidos foram distribuídos em três intervalos de tempo após o repasto sanguíneo: 0-3h, 20-24h e 45-50h. O teste de D'Agostino & Pearson foi aplicado para testada a normalidade da distribuição dos dados em cada intervalo de tempo pelo, seguido de ANOVA. Tendo-se verificado diferença significativa entre os grupos, aplicou-se o teste de Tukey para verificar se haveria diferença estatística significativa entre os valores médios de cada grupo.



Figura 6 - Medição do pH do intestino médio abdominal após repasto sanguíneo.

4.3.2 Medidas de pH no intestino médio torácico em fêmeas com repasto sanguíneo.

Uma vez que o intestino médio torácico é muito estreito, não foi possível utilizar os microeletrodos para medir seu pH após a ingestão sanguínea. Já que essa parte do intestino não armazena sangue em digestão é possível o uso de corantes indicadores de pH para efetuar as medidas. Soluções 0,1% de indicadores de pH azul de bromotimol ($pK_a=7$) e púrpura de bromocresol ($pK_a=6,3$) foram preparadas em sacarose 10%, as quais tiveram seus pH ajustados respectivamente para 7,0 e 6,5. Fêmeas com 4 a 5 dias foram alimentadas em *hamsters* anestesiados, e então separadas em dois grupos. No intervalo de 1 a 3 horas, soluções recém-preparadas de sacarose contendo um dos dois corantes foram oferecidas à

cada um dos grupos embebidas pequenas porções de algodão. Após 24h, as fêmeas que haviam ingerido a solução de sacarose eram dissecadas, e a cor observada no intestino médio torácico comparada à cor de soluções-padrão dos corantes em diferentes pHs (5,5 a 8,0), como anteriormente apresentado na Figura 4.

4.4 VERIFICAÇÃO DA POSSÍVEL ATIVAÇÃO DA ALCALINIZAÇÃO DO INTESTINO MÉDIO POR AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS EM FÊMEAS SEM REPASTO SANGUÍNEO.

Para verificar se o soro humano seria capaz de provocar alcalinização do intestino médio abdominal (IMA), também pela alimentação forçada fêmeas ingeriram soro humano total (inativado em banho-maria, por 30 minutos a 56°C) em pH 6, contendo apenas o corante indicador azul de bromotimol. O pH foi avaliado após a dissecação dos insetos a partir da observação da cor assumida pelo corante, de acordo com a Figura 7.

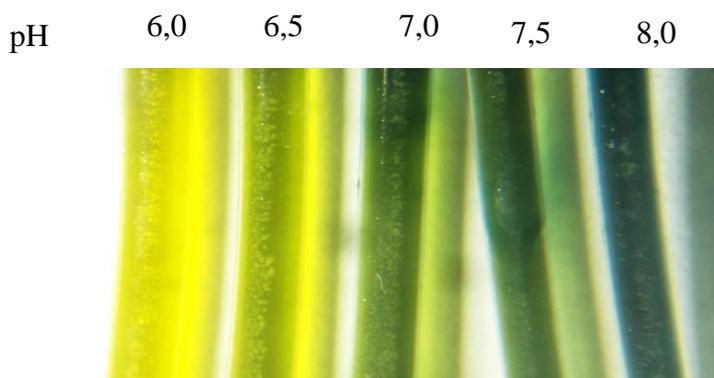


Figura 7 – Padrão de cores do corante azul de Bromotimol diluído em soro para diferentes valores de pH.

Juntamente às proteínas e aminoácidos a serem testados, fêmeas de *Aedes aegypti* ingeriram Solução Fisiológica para Insetos (SFI) – NaCl 9,7mM; KCl 2,68mM; CaCl₂ 1,36mM; glicose 0,56mM, – contendo ATP 1mM (Sigma A-2383) e corante azul de bromotimol 0,1% (pKa=7,0).

O intestino de *Lutzomyia longipalpis* sofreu alcalinização quando a fêmea do inseto ingeriu mistura de aminoácidos em alta concentração. Para verificar se uma solução de aminoácidos seria também capaz de estimular a alcalinização do intestino médio em *Aedes aegypti*, fêmeas foram alimentadas com SFI tamponada por MES 30mM (pKa=6,1) em pH 6 contendo uma variedade de aminoácidos (Arginina 0,87 mM, Cisteína 0,15 mM, Histidina

0,28 mM, Isoleucina 0,58 mM, Leucina 0,58 mM, Lisina 0,58 mM, Metionina 0,15 mM, Fenilalanina 0,29 mM, Treonina 0,58 mM, Triptofano 0,07 mM, Tirosina 0,29 mM, Valina,0,58mM) provenientes da diluição de MEM *amino acids solution* (SIGMA, M-5550) em SFI, com concentração final de 100mM (1,62%). Como controle um segundo grupo de fêmeas foi alimentado com SFI tamponada em pH 6 com MES 30mM. Após alimentação e dissecação dos insetos, a cor assumida pelo intestino médio foi comparada com a cor padrão do corante em diferentes valores de pH (Figura 4).

Com o intuito de verificar se o soro humano, mesmo sem as pequenas moléculas que o compõem, seria capaz de alcalinizar o IMA, este foi colocado no interior de uma membrana de diálise de 12 kDa e posto em um béquer contendo solução fisiológica de insetos (SFI) sob agitação. No intervalo de 1 e 2 horas após o início do procedimento realizou-se a troca de SFI. Essa troca foi repetida duas vezes, a cada 10 horas, no período de aproximadamente 20 horas. Ao final do procedimento, o soro dialisado obtido foi alíquotado e armazenado a -20°C até ser utilizado. Nos testes, o soro dialisado foi fornecido em pH 6,0, contendo apenas o corante azul de bromotimol, e após a dissecação dos insetos o pH foi avaliado a partir da cor assumida pelo corante (Figura 7).

Para fins de comparação, e para verificar se uma possível alcalinização também seria observada caso o soro total e o soro dialisado estivessem tamponados, foram realizados experimentos testes com soro humano total e soro dialisado, porém, tamponados com MES 30mM, em pH 6,0.

Nos testes com proteínas foram utilizadas soroalbumina bovina (Sigma, A3059-50G) 5% dissolvida em SFI em pH 6,0 ou pH 7,5 tamponadas com MES 30mM ou HEPES 30mM, respectivamente. Com a finalidade de verificar se a indução da alcalinização seria provocada unicamente pela albumina contida no soro ou se qualquer outra proteína teria o mesmo efeito, outro grupo de fêmeas foi alimentado com lisozima de ovo (Sigma, L7651-5G) a 5% e ovoalbumina (Sigma, A-5378, 50G) a 5%, todas em SFI com pH ajustado para pH 6,0 ou pH 7,5 tamponados em MES 30mM ou HEPES 30mM, respectivamente. Nesses testes, o grupo controle correspondeu aos mosquitos que ingeriram SFI tamponada em pH 6,0 ou 7,5, tamponada com MES 30mM ou HEPES 30mM, respectivamente.

Após a alimentação com as soluções contendo azul de bromotimol as fêmeas foram dissecadas e seus tubos digestivos analisados em lupa estereoscópica, sendo todas as observações realizadas sob a mesma luz. O valor de pH foi dado a partir da comparação da cor observada com soluções tampão contendo os corantes em pHs conhecidos, tendo-se

utilizado os padrões mostrados na Figura 4 para lisozima, e os padrões apresentados na Figura 8 para soroalbumina e ovoalbumina.

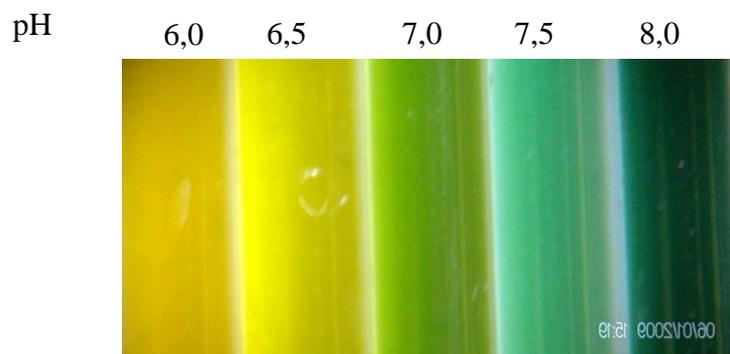


Figura 8 – Padrão de cores do corante azul de Bromotimol utilizado para determinar o pH após alimentação com soroalbumina e ovoalbumina.

Em todos os experimentos, a proporção de intestinos que se alcalinizaram para pH maior ou igual a 6,5 ou que permaneceram com pH menor que 6,5 foi comparada a proporção observada nos respectivos grupos controle, através do teste de proporções de Fisher. pHs intestinais maiores ou iguais a pH 6,5 quando comparados ao pH inicial (pH 6,0) foram considerados alcalinizados, e as proporções entre testes e controles foram consideradas diferentes quando p foi menor que 0,05.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA DIGESTIVA ALFA-GLICOSIDASE NAS PORÇÕES TORÁCICA E ABDOMINAL DO INTESTINO MÉDIO.

Para a realização deste experimento, foram utilizadas 20 fêmeas com idades entre 04 e 06 dias mantidas em jejum, as quais tiveram seus intestinos médios dissecados em salina 0,9% com auxílio de lupa estereoscópica (Leica EZ4). Para cada fêmea dissecada a porção torácica foi desconectada da porção abdominal, e então separadamente transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 200 μ l de Triton X-100 1% v/v identificados como intestino médio torácico (IMT) e intestino médio abdominal (IMA), que foram levados para sonificador de banho (Branson – 1510) por 15 segundos.

Em seguida, foram retiradas alíquotas de 50 μ l de cada tubo que foram transferidas separadamente para outros dois tubos de microcentrífuga contendo 100 μ l de água destilada e 100 μ l de tampão MES/NaOH 0,5M (pH 6). Por último, adicionou-se a cada tubo 250 μ l de

solução aquosa de substrato p-nitrofenil α -D glucopiranosídeo 12mM (concentração final 6mM), os quais foram então levados para banho-maria a 30°C por 40 minutos. Finalizada a incubação, adicionou-se a cada tubo 1mL de tampão glicina/NaOH 0,375M (pH 10,5), com a finalidade de interromper a reação e induzir ionização do p-nitrofenol liberado pela enzima, que desta forma se torna amarelo. Como controle foram utilizados 50 μ l de Triton X-100 1%.

As amostras e o controle foram levados para o espectrofotômetro, e a leitura realizada à 400nm contra água destilada. O valor obtido da absorbância do tubo controle (sem enzima) foi descontado do valor obtido das amostras. Realizou-se o teste de D'Agostino & Pearson para verificar a normalidade da distribuição dos dados, em seguida aplicando-se o teste de Wilcoxon para amostras pareadas a fim de comparar as médias da atividade enzimática para cada região do intestino médio.

4.6 COMITÊ DE ÉTICA

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os manuais de experimentação animal e aprovados pelo comitê de ética para utilização de animais (CEUA/ICB-UFMG) sob o protocolo de número 61/2015.

5. RESULTADOS

5.1 MEDIÇÃO DO pH E AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO ATIVA DO pH 6,0 NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS DE *Aedes aegypti* SEM REPASTO SANGUÍNEO.

Como pode ser visto na Figura 7 (A), em todas as fêmeas alimentadas com SFI e corante azul de bromotimol verificou-se a acidificação do intestino médio torácico, destacando-se que em 19 delas (76%) o pH foi reduzido para 6,0. Resultado similar foi observado no intestino médio abdominal, sendo que a acidificação para pH 6,0 ocorreu em 24 fêmeas (96%, N=24), como mostrado na Figura 7 (B). As colorações adquiridas pelas duas porções do intestino médio podem ser vistas na Figura 9.

Uma vez que o corante azul de bromotimol não cobre intervalos de pH menores do que 6,0 utilizamos o indicador púrpura de bromocresol para certificar se tal processo poderia atingir valores de pH ainda menores. Para isso, outro grupo de fêmeas (N=25) foi alimentado com SFI tamponada em pH 7,5, com adição do corante púrpura de bromocresol, bom indicador para o intervalo de pHs entre 5,0 a 6,0.

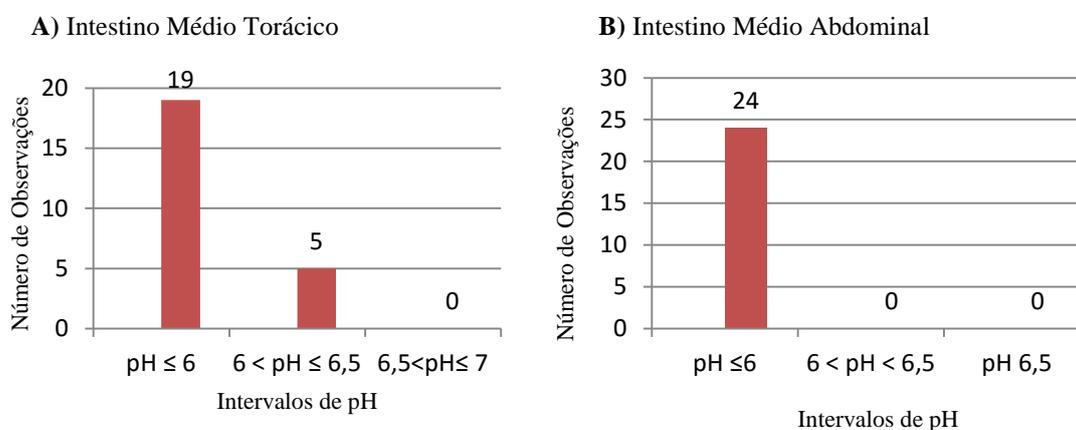


Figura 9 - Efeito da alimentação com SFI + Tampão HEPES 160mM + azul de bromotimol 0,1% no pH do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*

Pela Figura 8 (A), observa-se que em 84% das fêmeas testadas (21/25) houve a acidificação da parte torácica do intestino médio a valores abaixo de 6 (pH 5,5). Quanto ao intestino médio abdominal, os resultados obtidos foram menos concordantes, com apenas 10 fêmeas acidificando a valores de pH abaixo de 6, como pode ser observado na Figura 8 (B). A maior variação de resultados observada para o IMA quando consideramos o uso do púrpura

de bromocresol pode ser multifatorial, entre os quais podemos citar a menor estabilidade do corante.

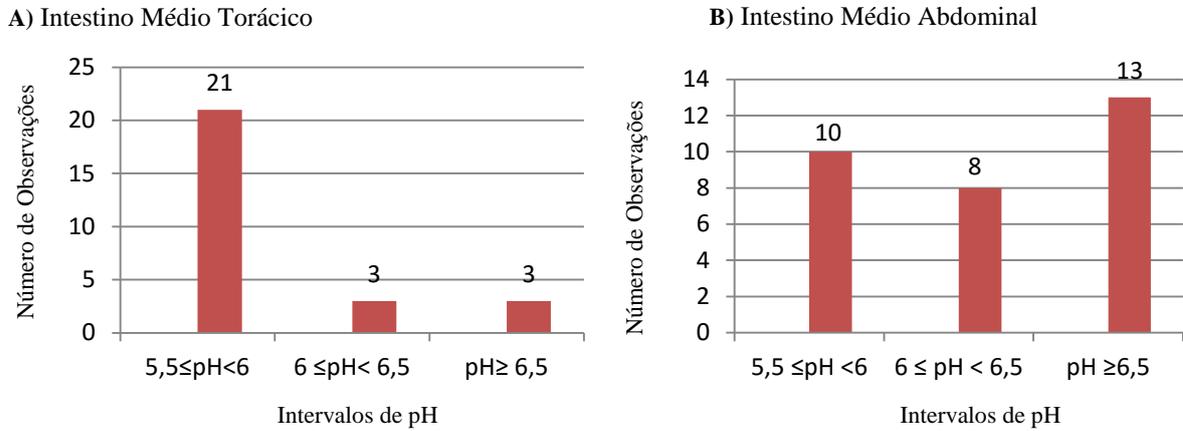


Figura 10 – Efeito da alimentação com SFI + Tampão HEPES 160mM + púrpura de bromocresol 0,1% no pH do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*.

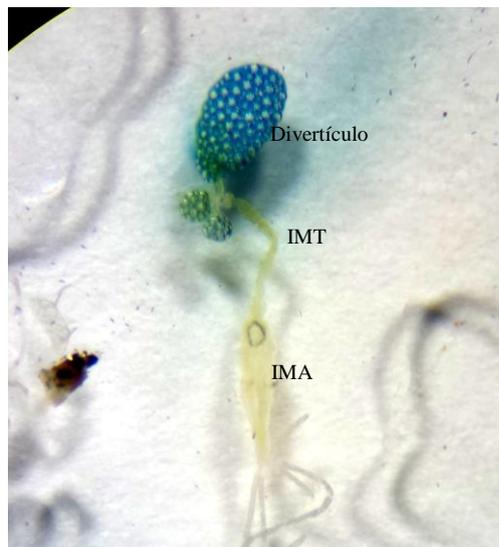


Figura 11 - Intestinos Médio Torácico (IMT) e Abdominal (IMA) de *Aedes aegypti* após alimentação forçada utilizando SFI + HEPES 160mM + Azul de Bromotimol 0,1%.

Com base nesses resultados é possível afirmar que o pH no intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti* não alimentadas é ácido, com valores entre 5,5 e 6,0 na porção torácica, e em torno de 6,0 na porção abdominal, e que o pH nesses compartimentos é ativamente mantido ácido. Quanto ao divertículo, foi observado que houve a manutenção do pH inicial

das soluções ingeridas pelas fêmeas, o que condiz com a ausência de mecanismos de regulação do pH nesse compartimento.

5.2. MEDIDA DO pH INTESTINAL EM FÊMEAS DE *Aedes aegypti* ALIMENTADAS COM SANGUE

5.2.1 Medição do pH no intestino médio torácico.

Nesse experimento foram formados dois grupos de mosquitos com 15 fêmeas cada, e ambos realizaram repasto sanguíneo em *hamsters* por aproximadamente 1 hora. Em todas as fêmeas que haviam ingerido o corante azul de bromotimol, foi verificada a acidificação do conteúdo intestinal, com valores de $\text{pH} \leq 6,0$ (Figura 10). Já para as fêmeas que ingeriram o corante púrpura de bromocresol (Figura 11), verificou-se que em 14 das 15 fêmeas analisadas o pH manteve-se bastante ácido, com valores entre 5,5 e 6,0.

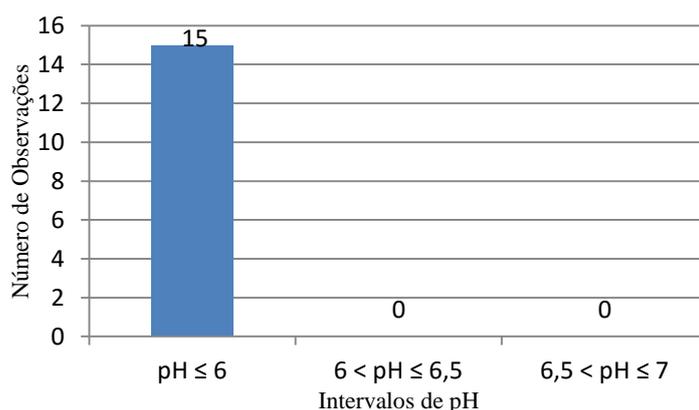


Figura 12 - Valores de pH observados no intestino médio torácico em fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue após ingestão de sacarose 10% com o corante indicador azul de bromotimol.

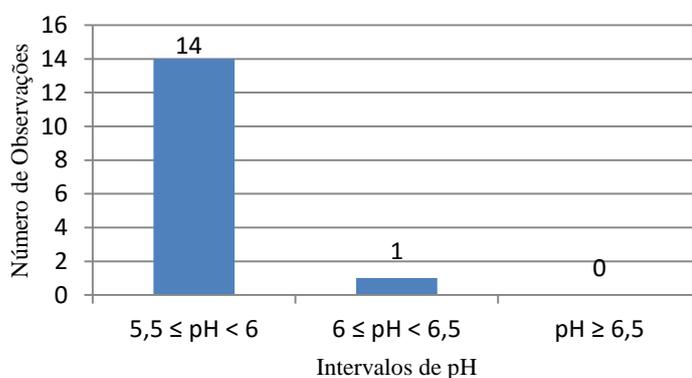


Figura 13 - Valores de pH observados no intestino médio torácico em fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue após ingestão de sacarose 10% com o corante indicador púrpura de bromocresol.

5.2.2 Medição do pH no intestino médio abdominal.

A medida do pH com uso de microeletrodos foi possível em 31 fêmeas de *A. aegypti* em diferentes intervalos de tempo entre zero e cinquenta horas após a hematofagia. Como pode ser observado na Figura 12, o tempo após o repasto sanguíneo em que as medições foram realizadas influencia o valor de pH encontrado.

Foi no tempo de 0-3h em que se verificou maior alcalinização do conteúdo intestinal, com valor médio de pH igual a 7,54 (variando de 7,12 a 7,93; n = 10). A partir dessa faixa de tempo, os valores de pH foram decrescendo gradativamente, atingindo valor médio de 7,39 no intervalo de 20 a 24 horas e chegando a 6,99 no intervalo de 45 a 50 horas. Após constatar a normalidade dos dados por meio do teste de D'Agostino & Pearson, realizou-se análise da variância por ANOVA, sendo possível verificar diferença significativa ($p = 0,0002$) entre os dados. A partir do teste de Tukey constatou-se diferença significativa entre as médias dos pHs observados nos intervalos de 0-3h e 45-50h ($p < 0,0001$) e entre as médias de pHs observados nos intervalos de 20-24h e 45-50h ($p < 0,001$).

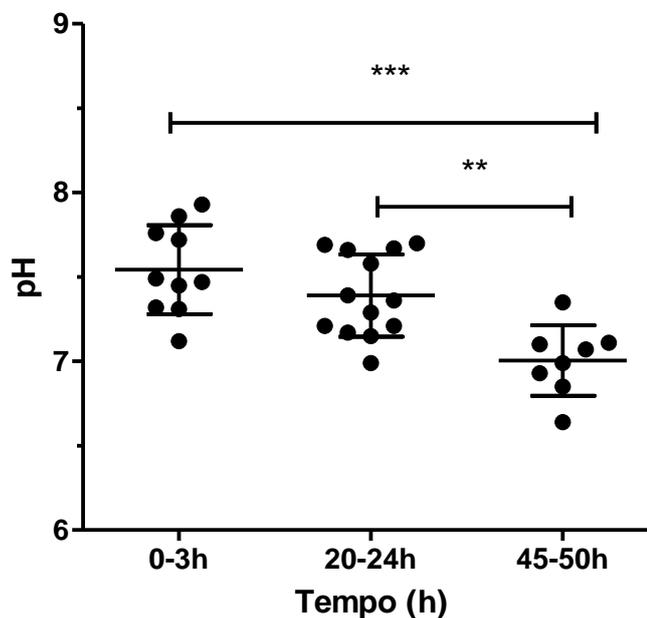


Figura 14 - pHs observados em diferentes horários após o repasto sanguíneo no intestino médio abdominal de fêmeas de *Aedes aegypti*.

Considerando que o pH inicial do sangue ingerido é 7,4, em conjunto com os dados obtidos constata-se que a ingestão de sangue é capaz de desligar o mecanismo de acidificação e ativar o de alcalinização no intestino médio abdominal; contudo, a intensidade desse mecanismo é reduzida ao longo da digestão, como observado anteriormente por Bilker et al.

(2000). Se a tendência de queda do pH ao longo da digestão se mantiver constante, então o pH intestinal, 72 horas após a hematofagia, seria de 6,8.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO ESTÍMULO QUE PROMOVE ALCALINIZAÇÃO INTESTINAL EM FÊMEAS DE *Aedes aegypti* ALIMENTADAS COM SANGUE.

Tendo como base os resultados anteriormente apresentados, em que foi verificado que a ingestão de sangue é capaz de desligar o mecanismo que mantém o pH intestinal ácido e de ativar o processo de alcalinização no intestino médio abdominal, surgiu a questão de sabermos qual ou quais componentes do sangue seriam os responsáveis por desencadear tal processo.

Inicialmente, fêmeas de *Aedes aegypti* foram alimentadas com soro total humano inativado (pH 6), contendo o corante indicador de pH azul de bromotimol (0,1%). Nesse teste verificou-se que 92% das fêmeas mantiveram o pH do intestino médio torácico semelhante ao da solução ingerida (Figura 14A), enquanto para o intestino médio abdominal (Figura 14B) foi verificada a alcalinização do pH em todas as fêmeas, destacando-se que em 85% o pH intestinal elevou-se para valores acima de 7,0; assim constatamos que o soro é eficaz em reverter o pH ácido do intestino médio abdominal e induzir a alcalinização desse compartimento. Um exemplo de resultado observado é mostrado na Figura 15.

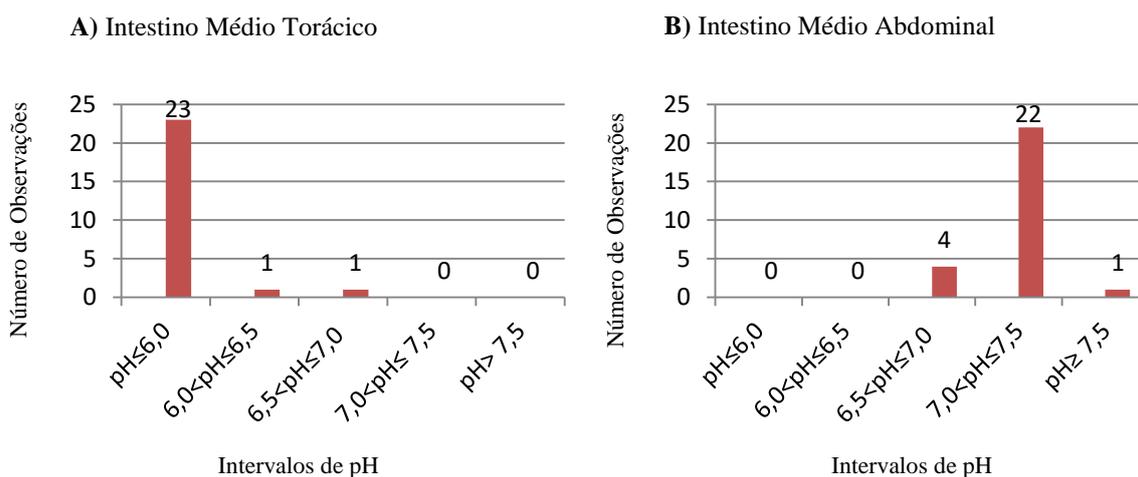


Figura 15 – Efeito da alimentação com soro total no pH do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*.

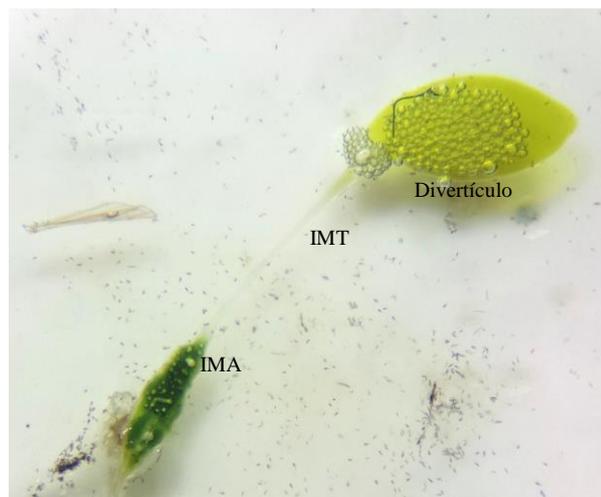


Figura 16 - Colorações adquiridas pelo intestino médio torácico (IMT) e abdominal (IMA) de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com soro total em pH 6.

Santos et al. (2011) constataram que quaisquer proteínas ou aminoácidos (em elevadas concentrações) eram capazes de promover a alcalinização do intestino médio abdominal em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Com o propósito de verificar se o mesmo ocorreria com nosso modelo experimental, procedemos aos testes com aminoácidos para verificar se eles seriam os responsáveis pelo aumento do pH no intestino médio abdominal do inseto.

Utilizou-se solução de aminoácidos a 100mM (1,62%) tamponada em pH 6, e tendo conhecimento de que quando em elevadas concentrações eles foram capazes de alcalinizar o intestino médio de flebotomíneos, esperava-se que aminoácidos fossem os responsáveis por desencadear tal processo. Contrariando as expectativas, não foi verificada alcalinização do intestino médio, com manutenção do pH original da solução ingerida (Quadro 1).

Quadro 1 – Efeito da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou solução de aminoácidos 100mM + MES 30mM em pH 6.

Intervalos de pH	Número de Intestinos Médio Torácico Observados		Número de Intestinos Médio Abdominal Observados	
	SFI (controle)	Aminoácidos (teste)	SFI (controle)	Aminoácidos (teste)
pH < 6,5	20	12	20	21
pH ≥ 6,5	0	1	0	1
Amostra	N = 20	N = 13	N = 20	N = 22
Estatística	$p = 0.3939$ (Fisher)		$p = 1,000$ (Fisher)	

Uma vez que a solução de aminoácidos não foi eficaz em promover a alcalinização do conteúdo do intestino médio abdominal, ao contrário do soro humano, testou-se soro dialisado em membrana de diálise com poros que permitem passar moléculas com até 12kDa (pH 6) para verificar se após a saída das moléculas menores, alguma macromolécula presente, como proteínas, seriam capazes de induzir alcalinização.

Como pode ser observado na Figura 16, em todas as fêmeas alimentadas com soro dialisado em pH 6 (n=21) houve a alcalinização do conteúdo do intestino médio abdominal (IMA), com a maioria (52%) das fêmeas alcalinizando para valores de pH acima de 7; enquanto que no intestino médio torácico o pH manteve-se ácido em $\text{pH} \approx 6$.

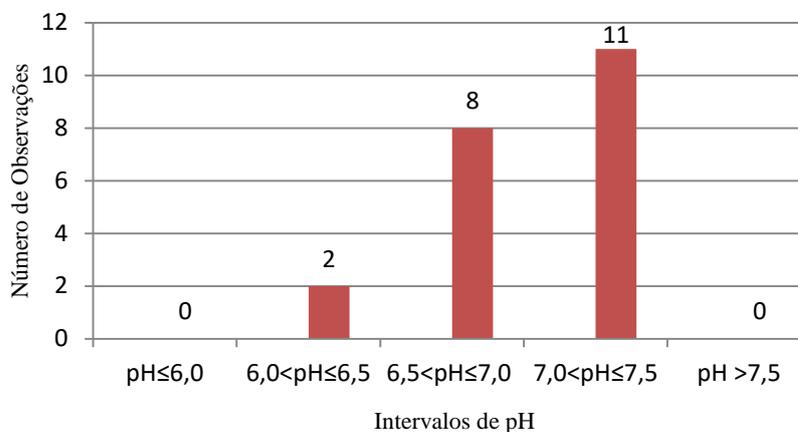


Figura 17 - Efeito da alimentação com soro dialisado no pH do intestino médio abdominal de fêmeas de *Aedes aegypti*.

Quando comparamos os dados obtidos para soro dialisado e soro total, como mostrado no Quadro 2, verificamos a concordância dos resultados e que ambos são eficazes em promover a alcalinização do intestino médio. Esse resultado pode ser tido como indicativo que nenhuma das pequenas moléculas dialisadas ajudam o soro a promover a alcalinização.

Quadro 2 – Efeitos da alimentação com Soro Total ou Soro Dialisado em pH 6,0.

Intervalos de pH	Número de Intestinos Médio Torácico Observados		Número de Intestinos Médio Abdominal Observados	
	Soro Total	Soro Dialisado	Soro Total	Soro Dialisado
pH < 6,5	23	15	0	1
pH ≥ 6,5	2	0	27	22
Amostra	N = 25	N = 15	N = 27	N = 23
Estatística	$p = 0,5192$ (Fisher)		$p = 0,4600$ (Fisher)	

Para verificar se mesmo tamponado em pH 6,0, o soro humano também seria alcalinizado pelo intestino médio, dois grupos de fêmeas de *Aedes aegypti* foram forçadas a ingerir soro total tamponado ou soro dialisado tamponado, ambos em pH 6. Como resultado, observou-se que ambos os tipos de soro foram capazes de estimular a alcalinização do intestino médio abdominal (IMA), porém, com menor eficiência (Figuras 17 e 18; Quadro 3).

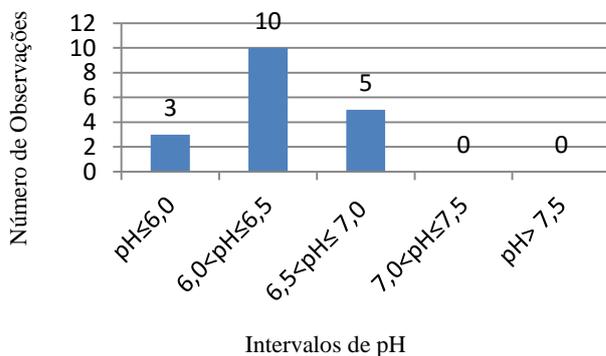


Figura 18 – Efeito do soro total + MÊS 30mM (pH 6,0) no pH do intestino médio abdominal (n=18).

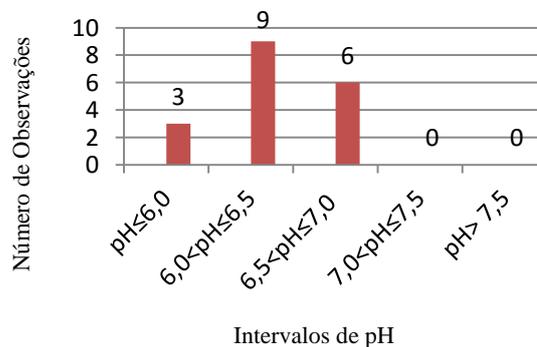


Figura 19 - Efeito do soro dialisado + MÊS 30mM (pH 6,0) no pH do intestino médio abdominal (n=18).

Quadro 3 – Efeitos da alimentação com Soro Total ou Soro Dialisado tamponados (pH 6,0) no pH do intestino médio.

Intervalos de pH	Número de Intestinos Médio Torácico Observados		Número de Intestinos Médio Abdominal Observados	
	Soro Total Tamponado	Soro Dialisado Tamponado	Soro Total Tamponado	Soro Dialisado Tamponado
pH < 6,5	10	9	3	3
pH ≥ 6,5	0	1	15	15
Amostra	N = 11	N = 10	N = 18	N = 18
Estatística	$p = 1,000$ (Fisher)		$p = 1,000$ (Fisher)	

Considerando-se que o soro total e soro dialisado foram eficazes em induzir a alcalinização mesmo quando tamponados, iniciaram-se os testes com proteínas para verificar se qualquer uma seria capaz de provocar efeito semelhante, ou se haveria um reconhecimento mais seletivo em *Aedes aegypti*. A primeira proteína a ser testada foi soroalbumina bovina, uma das proteínas plasmáticas mais concentradas. Inicialmente foi preparada uma solução de soroalbumina 5% tamponada em pH 6, a qual esperávamos ser capaz de estimular a alcalinização do conteúdo intestinal. Contudo, como pode ser observado no Quadro 4, nas fêmeas alimentadas houve apenas a manutenção do pH inicial da solução ingerida. Isto é, não ocorreu alcalinização.

Quadro 4 – Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou Soroalbumina 5%, tamponadas com MES 30mM (pH 6) no pH do intestino médio .

Intervalos de pH	Número de Intestinos Médio Torácico Observados		Número de Intestinos Médio Abdominal Observados	
	SFI (controle)	Soroalbumina (teste)	SFI (controle)	Soroalbumina (teste)
pH < 6,5	20	18	21	19
pH ≥ 6,5	1	1	1	0
Amostra	N = 21	N = 19	N = 22	N = 19
Estatística	$p = 1,000$ (Fisher)		$p = 1,000$ (Fisher)	

Também foi testada solução de soroalbumina 5% tamponada em pH 7,5. Nesse caso, levando-se em consideração que a mesma solução em pH ácido não foi capaz de estimular a

alcalinização, esperava-se que quando em pH básico o intestino médio das fêmeas revertisse o pH da solução para algo próximo do seu estado não alimentado, ou seja um pH ácido (Item 5.1). Como pode ser visto no Quadro 5, tal hipótese foi confirmada.

Quadro 5 – Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou Soroalbumina 5%, tamponadas com HEPES 30mM (pH 7,5) no pH do intestino médio.

Intervalos de pH	Número de Intestinos Médio Torácico Observados		Número de Intestinos Médio Abdominal Observados	
	SFI (controle)	Soroalbumina (teste)	SFI (controle)	Soroalbumina (teste)
pH < 6,5	21	9	24	17
pH ≥ 6,5	2	0	0	3
Amostra	N = 23	N =9	N =24	N =20
Estatística	$p = 1,000$ (Fisher)		$p = 0,0861$ (Fisher)	

Em seguida foi testada a proteína lisozima, em concentração 5%, com adição do tampão MES 30mM em pH 6. De acordo com os dados mostrados no Quadro 6, não foi verificada alcalinização seja na porção torácica ou abdominal do intestino médio.

Quadro 6 - Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou Lisozima 5%, tamponadas com MES 30mM (pH 6) no pH do intestino médio.

Intervalos de pH	Número de Intestinos Médio Torácico Observados		Número de Intestinos Médio Abdominal Observados	
	SFI (controle)	Lisozima (teste)	SFI (controle)	Lisozima (teste)
pH < 6,5	20	20	21	19
pH ≥ 6,5	1	0	1	0
Amostra	N = 21	N =20	N =22	N =20
Estatística	$p = 1,000$ (Fisher)		$p = 1,000$ (Fisher)	

Quando as fêmeas foram forçadas a ingerir ovoalbumina 5% tamponada em pH 6, obteve-se resultado semelhante ao de lisozima e soroalbumina em pH 6. Em todas as fêmeas alimentadas com essa solução, não foi observada alteração de pH em nenhuma das porções do intestino médio, como pode ser visto no Quadro 7.

Quadro 7 - Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos ou Ovoalbumina 5% tamponadas com MES 30mM (pH 6) no pH do intestino médio.

Intervalos de pH	Número de Intestinos Médio Torácico Observados		Número de Intestinos Médio Abdominal Observados	
	SFI (controle)	Ovoalbumina (teste)	SFI (controle)	Ovoalbumina (teste)
pH < 6,5	20	18	21	20
pH ≥ 6,5	1	0	1	0
Amostra	N = 21	N = 18	N = 22	N = 20
Estatística	$p = 1,000$ (Fisher)		$p = 1,000$ (Fisher)	

Contudo, quando as fêmeas foram alimentadas com ovoalbumina tamponada em pH 7,5, observou-se o único caso dentre as proteínas testadas em que o pH do intestino médio abdominal manteve-se alcalino. O pH na porção torácica foi revertido para 6 (Figura 19) em 95% das 20 fêmeas alimentadas (Quadro 8), havendo expressiva significância ($p < 0,0001$) pelo teste de Fisher. Assim, podemos interpretar que a ovoalbumina seria capaz apenas de desligar o mecanismo que mantém o pH intestinal ácido ($5,5 < \text{pH} < 6$), não sendo eficaz em ativar os mecanismos que levariam a alcalinização do conteúdo intestinal.

Quadro 8 - Efeitos da alimentação com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) ou Ovoalbumina 5% tamponadas com HEPES 30mM (pH 7,5) no pH do intestino médio.

Intervalos de pH	Número de Intestinos Médio Torácico Observados		Número de Intestinos Médio Abdominal Observados	
	SFI (controle)	Ovoalbumina (teste)	SFI (controle)	Ovoalbumina (teste)
pH < 6,5	20	20	24	0
pH ≥ 6,5	2	0	0	19
Amostra	N = 24	N = 22	N = 24	N = 19
Estatística	$p = 1,000$ (Fisher)		$p < 0,0001$ (Fisher)	

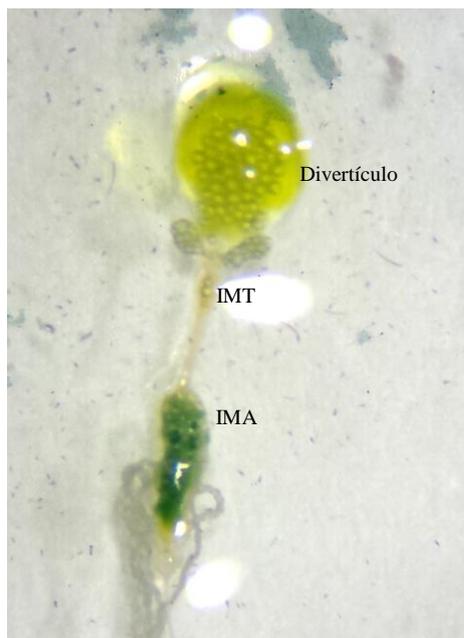


Figura 20 - Colorações adquiridas pelo intestino médio torácico (IMT) e abdominal (IMA) de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com ovoalbumina pH 7,5.

5.4 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA ATIVIDADE DE ALFA-GLICOSIDASE NO INTESTINO MÉDIO DE FÊMEAS DE *Aedes aegypti* EM JEJUM.

A partir do ensaio enzimático realizado obteve-se os valores para atividade da alfa-glicosidase no intestino médio torácico (IMT) e intestino médio abdominal (IMA) de 20 fêmeas (Quadro 9). Após realizar o teste de D'Agostino & Pearson e constatar que os dados não seguiam distribuição normal, aplicou-se o teste de Wilcoxon, sendo então possível verificar diferença significativa ($p = 0.0011$) entre as médias da atividade enzimática no IMT e IMA. Assim, inferimos que a atividade enzimática é aproximadamente 2.70 vezes maior no intestino médio torácico do que no intestino médio abdominal, mesmo com a área da porção abdominal expressivamente maior que da porção torácica. Assim, considerando a área das diferentes porções do intestino médio, tem-se que a atividade alfa-glicosidásica é aproximadamente 13 vezes maior por unidade de área na parte torácica do que na parte abdominal.

Quadro 9 - Distribuição da atividade da enzima alfa-glicosidase nas porções torácica e abdominal do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti* mantidas em jejum.

Fêmea	Atividade no Intestino Médio Torácico*	Atividade no Intestino Médio Abdominal*
01	0.335	0.016
02	0.214	0.029
03	1.189	0.336
04	0.492	0.082
05	0.470	0.323
06	0.983	0.016
07	0.311	0.086
08	0.810	0.138
09	1.777	0.018
10	1.211	0.542
11	1.011	0.518
12	2.514	1.446
13	0.826	0.296
14	1.569	0.263
15	1.165	0.232
16	0.651	0.007
17	0.695	0.422
18	0.293	0.351
19	0.154	0.852
20	0.219	0.222
Média ± Desvio Padrão	0,844 ± 0.608	0.310 ± 0.346
Estatística (Teste de Wilcoxon)	$p = 0,0011$	

*(Densidade óptica x h⁻¹ x intestino⁻¹)

Os resultados obtidos estão em concordância com os dados disponíveis na literatura, uma vez que a alfa-glicosidase encontrada no intestino de mosquitos (enzima de membrana) atua na digestão de açúcares em pH ácido ($5,5 < \text{pH} < 6$), e que tal processo se concentra no intestino médio torácico mesmo em fêmeas alimentadas com sangue.

6. DISCUSSÃO

O hábito hematofágico surgiu independentemente entre as diferentes ordens de insetos, inclusive na ordem Diptera (Ribeiro, 1995). A tradicional divisão de Diptera em duas subordens é contestada uma vez que Nematocera é considerada parafilética, sendo substituída por várias infra-ordens incluindo Psycodomorpha e Culicomorpha. Isso significa pelo menos dois eventos independentes de hematofagia em insetos não-Brachycera. Culicomorpha pode ter se originado de um único ancestral hematófago durante o Triássico, o qual originou 11 famílias, das quais somente quatro mantiveram a hematofagia: Culicidae, Simuliidae, Ceratopogonidae e Corethrellidae. Por outro lado, dado às extensas perdas da hematofagia em Culicomorpha, um evento mais parsimônico seria que tal hábito evoluiu do último ancestral comum de Psycodomorpha e Culicomorpha, com perda expressiva do hábito hematofágico através das linhagens. Em alternativa, a hematofagia pode ter evoluído independentemente em cada família principal de Nematocera (Ribeiro, Mans, & Arcà, 2010).

Levando-se em consideração que Culicidae e Psychodidae compartilham a característica de apenas fêmeas alimentarem-se de sangue, e tendo como base os estudos realizados envolvendo a fisiologia intestinal de flebotomíneos e mosquitos, o presente trabalho objetivou elucidar como seria a regulação dos mecanismos envolvidos na manutenção do pH intestinal de *Aedes aegypti*, e o quão semelhantes eles seriam ao de *Lutzomyia longipalpis*, cuja fisiologia intestinal, no que toca ao controle do pH intestinal, é a espécie mais bem estudada dentre os dípteros nematóceros.

Os dados obtidos envolvendo os testes com Solução Fisiológica de Insetos (SFI) e o corantes indicadores de pH sugerem que o mecanismo de manutenção do pH intestinal em *Aedes aegypti* é semelhante ao observado em *Lutzomyia longipalpis* (Santos et al., 2008). Quando as fêmeas foram alimentadas com soluções alcalinas com pH aproximado de 7,5 o intestino médio, em especial a porção abdominal, age para acidificar o conteúdo intestinal, retornando ao valor original, de modo que na maioria das fêmeas houve redução até pH ~ 6.

Similar ao verificado por Gontijo et al. (1998) em fêmeas de *L. longipalpis*, o divertículo de fêmeas de *A. aegypti* manteve o pH inicial das soluções ingeridas, corroborando os dados de que este compartimento não possui mecanismos de controle de pH. Ressalta-se que em alguns dos experimentos verificou-se que o pH do divertículo, que deveria ter-se mantido alcalino uma vez que o pH inicial das soluções testadas era 7,5, na verdade acidificou para valores variando de 5,5 a 6. Essa observação não contradiz a afirmação de que nesse compartimento não há regulação de pH, e pode ser explicada pela presença de bactérias no

divertículo de *Aedes aegypti*. Em experimento realizado por Gusmão et al. (2007) foi identificar as principais bactérias que habitam o divertículo ventral de *A. aegypti* e determinou-se que tais bactérias são capazes de promover acidificação a partir da fermentação de soluções açucaradas.

É estabelecido que a digestão de sangue por insetos pertencentes à subordem Nematocera desencadeia várias alterações no ambiente intestinal, e dentre as enzimas que atuam nesse processo, a principal é a tripsina. Em *Simulium venustum* e *Simulium rugglesi* o pH ótimo para atuação da tripsina é 8,4 (Yang & Davies, 1968); em *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus langeroni*, tripsina e aminopeptidases têm atividade ótima em pH alcalino (Dillon & Lane, 1993). Em *Aedes aegypti* a digestão do sangue leva à expressão de diferentes tipos de tripsina (precoce e tardia) que atuam em diferentes momentos (Noriega & Wells, 1999), e de exopeptidases cujos picos de atividade coincidem com os momentos de maior atuação da tripsina tardia, e que apresentam ampla faixa de pH ótimo, variando entre 6,5 e 8,5 (Noriega et al., 2002).

Considerando que as enzimas que atuam na digestão do repasto sanguíneo requerem pH alcalino para atuarem de maneira ótima, é plausível que a ingestão de sangue promova a alcalinização do IMA (intestino médio abdominal). Santos et al. (2008) verificaram que a digestão do repasto sanguíneo em *Lutzomyia longipalpis* promove intensa alcalinização do pH do IMA, o qual atinge valores de até 8,15 nas primeiras 10 horas após o início da digestão. .

Em concordância com o descrito por Bilker et al. (2000), observamos em nossos experimentos que a digestão do repasto sanguíneo em fêmeas de *Aedes aegypti* estimula a alcalinização do IMA, mas de modo menos intenso, quando consideramos que o pH elevou-se apenas durante as 3 primeiras horas após o início da digestão, com valor médio máximo de 7,54.

Vários são os fatores que influenciam na digestão do sangue em mosquitos, como idade, acasalamento, tempo para formação da matriz peritrófica e presença de bactérias no intestino (Downe, 1975; Villalon et al., 2003; Gaio et al., 2011), mas os mecanismos envolvidos na alcalinização da porção abdominal do intestino durante a digestão do sangue em mosquitos permanecem para serem elucidados.

Em *Lutzomyia longipalpis*, o intestino médio torácico é responsável pela digestão de açúcares, e é nessa porção onde há a maior concentração das enzimas responsáveis por este processo. As principais enzimas pertencem ao grupo das alfa-glicosidases, que atuam em pH ácidos, com pH ótimo variando entre 5,0 a 6,5. São enzimas capazes de hidrolizar

oligosacarídeos, e a ocorrência de uma alfa glicosidase que hidroliza sacarose melhor do que maltose estaria relacionada à maior ingestão de sacarose na dieta, como ocorre com *Aedes aegypti* adultos (Terra & Ferreira 1994).

Segundo Santos et al. (2008) a concentração de alfa-glicosidase em flebotomíneos é maior no intestino médio torácico justamente pelo pH dessa região após a ingestão de sangue ser próximo do pH ideal para sua ação (pH 5,8), o que pode ser tido como importante evidência de que essa porção do intestino médio é o ambiente em que há a digestão de sacarose pela alfa-glicosidase em fêmeas alimentadas com sangue (Gontijo et al., 1998). Desta forma, a digestão simultânea de carboidratos e proteínas ocorreria nas porções torácica e abdominal do intestino, cada qual em diferentes pHs.

Levando-se em consideração que a morfologia do tubo digestivo e o hábito alimentar de *A. aegypti* e *L. longipalpis* são similares, partimos do pressuposto que em fêmeas de *A. aegypti* a região torácica do intestino médio seria também o local de digestão de açúcares, e assim, mesmo após o repasto sanguíneo o pH desse local se manteria ácido; e que, portanto, a atividade de alfa-glicosidase seria proporcionalmente maior na porção torácica do que na abdominal.

Corroborando nossa hipótese, foi verificado em nossos experimentos que em todas as fêmeas avaliadas o intestino médio torácico manteve-se ácido, com pH entre 5,5 e 6,0; e em concordância com tais resultados, o ensaio enzimático para avaliar onde haveria maior atividade alfa-glicolítica mostrou que a ação da enzima concentra-se principalmente no intestino médio torácico, sendo 2,70 vezes maior do que no intestino médio abdominal.

Segundo Okuda et al. (2005) o perfil da atividade de alfa-glicosidase permitiria que parte dos açúcares ingeridos fosse diretamente ao intestino, caso esse estivesse vazio, enquanto a maior parte do açúcar seria gradativamente liberado nas horas que seguem a refeição, e à medida que a digestão prossegue, os níveis de alfa-glicosidase diminuiriam até valores basais, o que pode demonstrar a existência de um equilíbrio entre síntese e uso.

Uma vez constatado que a ingestão de sangue é capaz de promover a alcalinização da porção abdominal do intestino médio, foram realizados testes para tentar elucidar quais componentes do sangue seriam responsáveis por ativar tal mecanismo. Os experimentos realizados e os resultados obtidos encontram-se resumidos no quadro 10.

Quadro 10 - pH nas regiões torácica e abdominal do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti* após alimentação forçada com diferentes soluções.

SUBSTÂNCIA TESTADA	pH ANTES DA ALIMENTAÇÃO	Intervalo de pH com Maior Frequência Após Alimentação			
		Intestino Médio Torácico		Intestino Médio Abdominal	
		< 6,5	≥ 6,5	< 6,5	≥ 6,5
Solução Fisiológica de Insetos (SFI) + HEPES 160mM	7,5	X		X	
Soro Total Inativado	6,0	X			X
Aminoácidos a 100mM + MES 30mM	6,0	X		X	
Soro Dialisado	6,0	X			X
Soro Total + MES 30mM	6,0	X			X
Soro Dialisado + MES 30mM	6,0	X			X
Lisozima 5% + MES 30mM	6,0	X		X	
Soroalbumina + MES 30mM	6,0	X		X	
Soroalbumina + MES30mM	7,5	X		X	
Ovoalbumina + MES 30mM	6,0	X		X	
Ovoalbumina + MES 30mM	7,5	X			X

Em estudo prévio realizado por Santos et al. (2011) foi testado o efeito de diferentes soluções no pH do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis*. Assim como em flebotomíneos, o soro humano total foi prontamente eficaz em estimular a alcalinização da porção abdominal do intestino médio.

Uma vez que o soro total promoveu a elevação de pH, uma solução de aminoácidos a 100mM foi a próxima a ser testada. Ao contrário do verificado em flebotomíneos, os aminoácidos, mesmo em elevada concentração não foram eficazes em induzir alcalinização, o que nos levou a testar em seguida o soro dialisado em membrana de 12 kDa. Com a retirada

das pequenas moléculas que compõem o soro, permaneceram apenas as macromoléculas constituídas principalmente de proteínas as quais pensávamos ser responsáveis pela elevação do pH quando da ingestão de soro.

Os testes mostraram que o soro dialisado foi capaz de promover o aumento do pH no intestino médio abdominal (IMA). Quando consideramos que em 52% das fêmeas alimentadas com soro dialisado houve alcalinização do pH para valores acima de 7,0, contra 85% nas fêmeas alimentadas com soro total, percebemos que o soro dialisado é eficaz em promover alcalinização do IMA, apesar da menor intensidade. Também verificamos aumento do pH quando as fêmeas foram alimentadas com soro total e soro dialisado tamponados com MES 30mM, o que reforçou o fato de que alguma macromolécula presente no soro seria a responsável por desencadear a alcalinização.

Partindo do princípio de que macromoléculas, possivelmente proteínas presentes no soro, podem estar envolvidas no processo de percepção da ingestão de sangue e que por isso são capazes de alcalinizar o intestino, iniciamos os testes com diferentes soluções proteicas. No estudo realizado por Santos et al. (2011) foram utilizadas diversas soluções proteicas com o intuito de verificar se mesmo proteínas que não fazem parte da dieta de *L. longipalpis* seriam capazes de estimular a alcalinização do intestino médio abdominal, e com base nesse estudo selecionamos as proteínas utilizadas em nossos experimentos.

A primeira solução testada foi soroalbumina em pH 6, a qual estimulou a alcalinização tanto no intestino médio torácico quanto no abdominal em *L. longipalpis*, mas não foi capaz de desativar o mecanismo de manutenção de pH ácido e promover a alcalinização em *A. aegypti*. Mesmo quando testada em pH 7,5, a soroalbumina não forneceu o estímulo necessário para ao menos manter o pH da solução alcalino.

Em seguida testamos lisozima 5% em pH 6 tamponada com MES 30mM. Apesar de tal proteína não estar presente na dieta de *A. aegypti* em condições naturais, nem de outros insetos, lisozima a 5% em pH 6 foi capaz de estimular prontamente a alcalinização do intestino médio abdominal em *Lutzomyia longipalpis* (Santos et al., 2011). Já em *A. aegypti* não foi verificado qualquer efeito no pH do IMA.

A última solução proteica testada foi de ovoalbumina 5% tamponada com MES 30mM. A ovoalbumina é a proteína mais abundante em ovos de aves e foi uma das primeiras a ser isolada em sua forma pura. É uma glicoproteína com massa molecular de 45 kDa, pertencente a superfamília das serpinas, a qual também abrange desde inibidores de serino-

proteases do plasma humano até proteínas sem qualquer função inibitória conhecida, como a própria ovoalbumina (Huntington & Stein 2001).

Constatamos que as soluções proteicas testadas não foram capazes de estimular a alcalinização do intestino médio de fêmeas de *Aedes aegypti*, o que contrasta com o observado em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Santo et al., 2011), em que as mesmas soluções utilizadas em nossos experimentos, igualmente tamponadas, foram capazes de induzir a alcalinização eficientemente o intestino médio desses insetos. Devemos, contudo, considerar que sendo o mecanismo de alcalinização em *Aedes aegypti* menos eficaz do que o verificado em outros dípteros nematóceros hematófagos, há a possibilidade do tamponamento das soluções utilizadas ter interferido na ativação da alcalinização.

Diferentemente do observado para as outras soluções avaliadas, o intestino de *Aedes* foi capaz de responder à presença de ovoalbumina no pH 7,5 e não acidificou o conteúdo intestinal como fez com todas as outras proteínas. Este foi um resultado bastante surpreendente, pois nenhum inseto hematófago ingere albumina de ovo e não poderiam ter desenvolvido um mecanismo de alcalinização que dependesse de perceber a ingestão dessa proteína.

Assim, consideramos a hipótese do resultado obtido com a ovoalbumina ter sido discrepante em relação às demais proteínas testadas devido ao provável reconhecimento de alguns dos aminoácidos que são comuns entre ovoalbumina e alguma das proteínas plasmáticas. De fato, o sangue possui algumas proteínas da superfamília das serpinas que são bastante semelhantes à ovoalbumina. Dentre elas, poderíamos citar as proteínas plasmáticas humanas PAI-2 (ativador 2 de plasminogênio), α 1-antitripsina, e EI (inibidores de elastase) com percentual de pares idênticos de aminoácidos com ovoalbumina de, respectivamente 39,9%, 32,5% e 39,2%. Além disso, também foi verificada a similaridade de pares de aminoácidos com e de 29,8% com antitrombina III (Remold-O'Donnell, 1993).

É muito provável que o intestino de *Aedes aegypti* reconheça uma ou mais dessas proteínas plasmáticas da superfamília das serpinas de modo a identificar um repasto sanguíneo e responder alterando o pH intestinal de modo a se preparar para começar a digestão do sangue.

Como a ovoalbumina apresenta similaridade parcial com algumas proteínas plasmáticas, julgamos que um reconhecimento “parcial” dessa proteína pelo intestino médio abdominal das fêmeas de *A. aegypti* foi suficiente manter a solução de ovoalbumina 5% alcalina quando testada em pH 7,5, mas por outro lado insuficiente para desencadear a

alcalinização da solução ingerida em pH 6, como deveria acontecer com a(s) proteína(s) plasmática(s) que o inseto utiliza como indicadora(s) da ingestão de sangue.

A identificação das proteínas responsáveis pelo estímulo alcalinizante poderia ser feita a partir do fracionamento das proteínas plasmáticas por meio de cromatografia líquida seguida de sua identificação por espectrometria de massa. E a proteína purificada poderia ser utilizada em ensaios para confirmação do seu papel nesse processo fisiológico.

Logo após a detecção da presença de sangue no interior do intestino médio abdominal, outros mecanismos fisiológicos devem entrar em ação. Hormônios liberados na hemolinfa após a ingestão de sangue certamente têm um papel relevante no controle da digestão (Lea, 1972). Estes hormônios poderiam vir de células endócrinas presentes no próprio intestino e/ou de outros órgãos do inseto como o sistema nervoso e ovários. Um exemplo seria o hormônio neurosecretado para desenvolvimento de ovos (EDNH), o qual é secretado a partir da ingestão de sangue e que estimula a síntese vitelogênica pelos corpos gordurosos do inseto (Lea & Handel 1982).

O padrão geral de funcionamento do tubo digestivo de *Aedes aegypti*, caracterizado por um pH ácido antes da ingestão de sangue e alcalino no intestino médio abdominal após sua ingestão, é muito semelhante ao do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Provavelmente esse seja o padrão geral entre todos os Nematocera hematófagos. É possível que a condição primária entre todos os Diptera Nematocera adultos, incluindo os não hematófagos, seja um intestino médio ligeiramente ácido com pH próximo ao pH 6.

7. CONCLUSÃO

Os insetos pertencentes às subfamílias Culicinae e Phlebotominae apresentam hábitos alimentares semelhantes, onde apenas as fêmeas necessitam ingerir tanto açúcares quanto sangue para dar continuidade a seu desenvolvimento. Assim, é plausível que *Aedes aegypti* e *Lutzomyia longipalpis* apresentem características similares quanto à fisiologia intestinal.

Em *A. aegypti* o sangue ingerido pelo repasto sanguíneo promove a alcalinização do pH do intestino médio abdominal de modo a compartimentalizar a digestão do sangue, assim permitindo que esse evento ocorra independentemente da digestão de açúcares, a qual tem lugar no intestino médio torácico.

Acreditamos que uma proteína plasmática semelhante estruturalmente a ovoalbumina funcione como sinal para que o intestino perceba que ocorreu ingestão de sangue. Deste modo, daremos prosseguimento ao nosso estudo para tentar elucidar quais os mecanismos envolvidos na regulação do pH em *A. aegypti* e qual (is) seriam os componentes do soro envolvidos na alcalinização do pH intestinal.

REFERÊNCIAS

- Andrew J, Bar A 2013. Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Adult Mosquito. *Annu. Rev. Res. Biol.* 3: 52–69.
- Bertram DS, Bird RG 1961. Studies on mosquito-borne viruses in their vectors. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 55: 404–423.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GRW, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504–507.
- Billker O, Shaw MK, Margos G, Sinden RE 1997. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology* 115 (Pt 1: 1–7.
- Christophers SR 1960. *Aedes aegypti* (L.) THE YELLOW FEVER MOSQUITO - ITS LIFE HISTORY, BIONOMICS AND STRUCTURE. : 750.
- Clements AN 1992. Structure of the adult alimentary canal. In: *Biol. mosquitoes Vol. 1 Dev. Nutr. Reprod.*, Chapman & Hall, London, pp. 263–271.
- Consoli RAGB, Oliveira RL de 1998. *PRINCIPAIS MOSQUITOS DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA NO BRASIL*. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Díaz-Nieto LM, Maciá A, Perotti MA, Berón C. 2013. Geographical Limits of the Southeastern Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *PLoS Negl Trop Dis* 7: 1–6.
- Dillon RJ, Lane RP 1993. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitol. Res.* 79: 492–496.
- Downe AE 1975. Internal regulation of rate of digestion of blood meals in the mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 21: 1835–1839.
- Foster WA 1995. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 443–474.
- Gaio A de O, Gusmão DS, Santos A V, Berbert-Molina MA, Pimenta PFP, Lemos FJA 2011. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). *Parasit. Vectors* 4: 105.
- Gontijo NF, Almeida-Silva S, Costa FF, Mares-Guia ML, Williams P, Melo MN 1998. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. *Exp. Parasitol.* 90: 212–219.
- Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Russo É de S, Peixoto AMD, Júnior MB, Berbert-Molina MA, Alves FJ, Lemos 2007. First isolation of microorganisms from the gut

- diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 919–924.
- Harrington LC, Edman JD, Scott TW 2001. Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood? *J. Med. Entomol.* 38: 411–422.
- Hertig AT, Hertig M. 1927. A technique for artificial feeding of sandflies (*Phlebotomus*) and mosquitoes. *Science (80-)*. 65: 328–329.
- Huntington JA, Stein PE 2001. Structure and properties of ovalbumin. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 756: 189–198.
- Isoe J, Rascón AA, Kunz S, Miesfeld RL 2009. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 903–912.
- Jansen CC, Beebe NW 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect.* 12: 272–279.
- Jobling B, Lewis DJ 1987. *Anatomical drawings of biting flies*. British Museum (Natural History) and Wellcome Trust, London.
- Kang S, Shields AR, Jupatanakul N, Dimopoulos G 2014. Suppressing Dengue-2 Infection by Chemical Inhibition of *Aedes aegypti* Host Factors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: e3084.
- Lea AO 1972. Regulation of egg maturation in the mosquito by the neurosecretory system: the role of the corpus cardiacum. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3: 602–608.
- Lea AO, Handel E Van 1982. A Neurosecretory Hormone-Releasing Factor From Ovaries Of Mosquitoes Fed Blood. *J. Insect Physiol.* 28: 503–508.
- Lee RMKW, Craig DA 1983. Cibarial sensilla and armature in mosquito adults (Diptera: Culicidae). *Can. J. Zool.* 61: 633–646.
- Lounibos LP 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 233–266.
- Marinotti O, James AA 1990. AN ALPHA-GLUCOSIDASE IN THE SALIVARY GLANDS OF THE VECTOR MOSQUITO, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 20: 619–623.
- Maron DF 2014. New Type of More Problematic Mosquito-Borne Illness Detected in Brazil. *Sci. Am.*
- Noriega FG, 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.
- Noriega FG, Wells M a. 1999. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 45: 613–620.

- Okuda K, Caroci A, Ribolla P, Marinotti O, Bianchi AG De, Bijovsky AT 2005. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *J. Insect Physiol.* 51: 769–776.
- Pilar Corena M del, VanEkeris L, Salazar MI, Bowers D, Fiedler MM, Silverman D, Tu C, Linser PJ 2005. Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. *J. Exp. Biol.* 208: 3263–3273.
- Remold-O'Donnell E 1993. The ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS Lett.* 315: 105–108.
- Ribeiro JM 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4: 143–152.
- Ribeiro JMC, Mans BJ, Arcà B 2010. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 767–784.
- Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* 7: 9.
- Santos VC, Araujo RN, Machado LAD, Pereira MH, Nelder F, Gontijo 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J. Exp. Biol.* 211: 2792–2798.
- Santos VC, Nunes CA, Pereira MH, Gontijo NF 2011. Mechanisms of pH control in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*: roles for ingested molecules and hormones. *J. Exp. Biol.* 214: 1411–1418.
- Santos VC, Vale VF, Silva SM, Nascimento AAS, Saab NAA, Soares RPP, Marques MSM, Araujo RN, Pereira MH, Fujiwara RT, Gontijo NF 2014. Host Modulation by a Parasite: How *Leishmania infantum* Modifies the Intestinal Environment of *Lutzomyia longipalpis* to Favor Its Development. *PLoS One* 9: 1–9.
- Silva HHG Da, Silva Ionizete G da, Lira KDS 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev. Patol. Trop.* 27: 53–63.
- Snodgrass RE 1959. THE ANATOMICAL LIFE OF THE MOSQUITO. *Smithson. Misc. Collect.*: 87.
- Souza-Neto JA, Machado FP, Lima JB, Valle D, Ribolla PEM 2007. Sugar digestion in mosquitoes: Identification and characterization of three midgut α -glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 147: 993–1000.
- Terra WR, Ferreira C 1994. Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 109: 1–62.

- Villalon JM, Ghosh A, Jacobs-Lorena M 2003. The peritrophic matrix limits the rate of digestion in adult *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 49: 891–895.
- Yang YJ, Davies DM 1968. DIGESTION, EMPHASIZING TRYPSIN ACTIVITY, IN ADULT SIMULIIDS (DIPTERA) FED BLOOD, BLOOD-SUCROSE MIXTURES, AND SUCROSE. *J. Insect Physiol.* 14: 205–222.
- Zieler H, Garon CF, Fischer ER, Shahabuddin M 2000. A tubular network associated with the brush-border surface of the *Aedes aegypti* midgut: implications for pathogen transmission by mosquitoes. *J. Exp. Biol.* 203: 1599–1611.

ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Nelder de Figueiredo Gontijo,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Estudo do mecanismo de controle do pH intestinal em mosquitos, submetido a esta comissão pelo protocolo 61 / 2015, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 25/05/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 26/05/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br