

VÂNIA CRISTINA DOS SANTOS

**Caracterização do mecanismo de controle do pH no tubo
digestivo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912)
(Diptera: Psychodidae) e sua importância no desenvolvimento
de *Leishmania* Ross, 1903**

**Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2010**

Vânia Cristina dos Santos

Caracterização do mecanismo de controle do pH no tubo digestivo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) e sua importância no desenvolvimento de *Leishmania* Ross, 1903

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em ciências.

Orientador: Dr. Nelder de Figueiredo
Gontijo

Co-orientador: Marcos Horácio
Pereira

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2010

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiro a Deus, pela minha vida, e por Ele colocar tantas pessoas especiais em meu caminho até aqui;
- aos meus pais, Wilson e Geralda, por me apoiaram incondicionalmente neste trabalho e em todos os meus projetos de vida; sempre serão minha melhor referência, meu horizonte, e maravilhosos exemplos de dignidade pra mim;
- aos meus irmãos, Alysson e Helen, pelo grande carinho e torcida, e por compartilharem comigo as alegrias das minhas conquistas e os sentimentos dos momentos difíceis, e à todos os meus familiares, que sempre torcem muito por mim;
- ao Renato, pela compreensão, pelo apoio, e por ser meu grande amor em todos os momentos, desde que nos conhecemos, e aos seus familiares, Dona Lourdinha, Sr. Antônio, Glorinha, Cristina, Marina, Marcelo, Otávio, Sérgio, Marquinho, Cleomar, Meire, Serginho, João Henrique, Rodriguinho, Julinha, Sophia, Aninha e Dudu;
- ao meu Orientador, Professor Dr. Nelder Gontijo, que além de toda a dedicação a este nosso trabalho, sempre me incentivou a buscar o conhecimento, seja de forma direta, ou simplesmente servindo de exemplo de amor à pesquisa;
- ao meu co-orientador, Professor Dr. Marcos Pereira, pelas idéias e sugestões neste trabalho e na minha vida científica, além do convívio alegre no laboratório;
- aos avaliadores da tese, Dr. Adriano M. de Castro Pimenta, Dr. Miguel José Lopes, Dr. Rodrigo Pedro P. Soares, e Dr. Simon Luke Elliot, pelas críticas e sugestões;
- ao Professor Dr. Álvaro Eiras, pela atenção em relatar o projeto deste trabalho, pelas críticas, sugestões e contribuições;
- à Dra. Alessandra Guarneri, à Professora Dra. Élide Mara Rabelo, e à Dra. Luciane Gomes Batista Pereira, pela dedicação e cuidado no exame de

qualificação desta tese, além das idéias e contribuições durante a avaliação do trabalho;

- aos alunos de IC, Cássio Nunes e Annalice Chandoha, que além de contribuírem muito nos experimentos, são ótimas pessoas, com um belo futuro profissional, e com as quais eu aprendi muito ao longo do trabalho; Agradeço também ao estudante Wiglen, pela ajuda durante o estágio realizado no LFIH;
- ao Sydney, que contribuiu com muita competência e disposição na parte da infecção experimental dos flebotomíneos; além de ser um excelente profissional, é uma pessoa muito generosa e prestativa, enfim, um grande companheiro com quem se pode sempre contar; sou grata também ao Eder, funcionário do departamento de Parasitologia, pela prestabilidade e disponibilidade nos experimentos realizados no canil do departamento;
- ao técnico do LFIH César Nonato, pela atenção e prestabilidade no fornecimento dos flebotomíneos, pela amizade, e por ser uma inspiração em termos de honestidade e caráter;
- à Ceres, minha grande amiga desde muito (do pré-vestibular ao Doutorado!), por todo o carinho, amizade e disponibilidade, me apoiando e me acompanhando sempre na realização deste trabalho;
- aos amigos que encontrei no LFIH, Adrianinha, Rafa, Ricardo, Vlad, Kolyvan, Dimitri e aos que encontraram o LFIH, Xandoca, Lú Ramos, Kleber, e Antônio, por serem essas pessoas especiais, que de várias formas, são como uma família na minha vida profissional, me apoiando, me alegrando, e me dando ânimo para seguir em frente;
- aos que já passaram pelo LFIH, Fernandinha, Natasha, Lucas, Bruno, Iâncor, Veruska, Luandy, Luiza, Isabella, Adriana Chefa, Andrezza, Jéssica, Érica, Arthur, Raquel, Thelma, Dani, Artur, Warrison, Maurício, Sílvia, Reginaldo, agradeço pelo alegre convívio, e desejo que o sucesso continue acompanhando vocês;
- A minha querida e eterna "turma do bico" (Mestrado - 2004): Carol, Elisa, Andrey, Michel, Silvia, Marcelle, Daniel, Haendel, Juliana, Eveline e Bárbara. Esta turma fez história no Departamento de Parasitologia, e continua fazendo

história na minha caminhada. Agradeço a Deus por ter encontrado grandes e verdadeiras amizades nessa turma, importantes na realização deste trabalho, e sempre importantes na minha vida;

- aos amigos do Departamento de Parasitologia, Tati Mingote, Rodrigo (Zé graça), Pedro Gazinelli, Iara, Ana Flávia, Kelly, Lara, Juliana Santos, Diana, Helen, Norinne, Gigante, Iuri, Laila, Letícia, Júlia Gatti, Anderson, Vitor, Hudson, todos vocês me proporcionaram muitos e muitos momentos alegres, que sempre me dão ânimo e vontade de continuar em frente na caminhada acadêmica; o departamento é um lugar muito melhor com vocês lá!
- Aos funcionários do Departamento de Parasitologia: Sr. Nery, Ana Carrusca, Geni, Zuleika, Tati, pela atenção e pela torcida, além de serem pessoas de ótimo convívio;
- aos grandes amigos da Biologia, (99/2) em especial aos queridos Lu ADM, Marjorie, Pri, Lud, Marina, Déia, Aninha, Flávia, Bruno e Antônio, pela amizade sincera, pela torcida, e por todos os momentos vividos;
- ao Laboratório de Membranas Excitáveis (Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB - UFMG), na pessoa do Dr. Paulo Beirão, pela disponibilidade e gentileza no uso de equipamentos;
- ao Laboratório de Parasitologia Molecular (Departamento de Parasitologia do ICB - UFMG) na pessoa da Dra. Elida Mara Leite Rabelo, pela disponibilidade e gentileza no uso de equipamentos;
- ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (Departamento de Parasitologia do ICB - UFMG) em nome da Professora Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu e do Professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, pela disponibilidade e gentileza no uso de equipamentos e reagentes;
- ao Laboratório de Toxoplasmose (Departamento de Parasitologia do ICB - UFMG) em nome do Professor Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor e da Funcionária Rosalida Estevan Nazar, pela disponibilidade e gentileza no empréstimo de equipamentos;

- à secretária do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Sumara, pelo grande apoio, por todos os conselhos, e pelo grande carinho e atenção dedicados a mim e a todos os alunos;
- aos professores do Departamento de Parasitologia, em especial ao Professor Alan Lane de Melo; de várias formas, vocês me deram muitos ensinamentos dentro e fora das salas de aula;
- À comunidade de São Joaquim/Januária - MG, em especial aos funcionários do Centro de Controle de Esquistossomoses, pela receptividade, pelas lições, e pela oportunidade de aprender muito sobre a realidade das doenças parasitárias;
- ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa do Dr. Marcos Horácio Pereira, pela grande oportunidade de realizar este trabalho de doutorado e pelo apoio financeiro na divulgação dos resultados em Congressos.

Este Trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), do Departamento de Parasitologia - ICB - UFMG, e contou com o apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) (concessão de Bolsa de Doutorado), e com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do *CAPES* - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

“Meu Deus! Ajuda-me a dizer a palavra da verdade na cara dos fortes, e a não mentir para obter o aplauso dos débeis. Se me dás dinheiro, não me tomes a felicidade, se me dás força, não me tires o raciocínio, se me dás êxito, não me tires a humildade. Se me dás humildade, não tires a minha dignidade. Ajuda-me a conhecer a outra face da realidade, e não me deixes acusar meus adversários, apodando-os de traidores porque não partilham do meu critério. Ensina-me a amar aos outros como amo a mim mesmo, e a julgar-me como o faço com os outros. Não me deixes embriagar com o êxito quando o consigo, e nem desesperar, se fracasso. Sobretudo, faz-me sempre recordar que o fracasso é a prova que antecede o êxito. Ensina-me que a tolerância é o mais alto grau da força, e que o desejo de vingança é a primeira manifestação da debilidade. Se me despojas do dinheiro, deixa-me a esperança, e se me despojas do êxito, deixa-me a força de vontade para poder vencer o fracasso. Se me despojas do dom da saúde, deixa-me a graça da fé. Se causo dano a alguém, dá-me a força da desculpa, e se alguém me causa dano, dá-me a fora do perdão e da clemência. Meu Deus... se me esquecer de Ti, Tu não Te esqueças de mim.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O controle do pH intestinal em *Lutzomyia longipalpis* é primordial para o inseto lidar com os diferentes itens de sua dieta. Os flebotômíneos necessitam mudar repentinamente de um pH 6,0, adequado a digestão de açúcares, para um pH próximo de pH 8,0, que aumenta a eficiência da digestão do repasto sanguíneo. Antes da ingestão de sangue, o pH no intestino médio de *L. longipalpis* é rigorosamente mantido em pH 6,0 por um eficiente mecanismo regulador. Aparentemente, a alcalinização observada seria viabilizada pela volatilização do CO₂ presente no sangue ingerido, e também por outro mecanismo ainda não caracterizado até então. Assim, o presente trabalho teve como primeiro objetivo, caracterizar o estímulo inicial, presente no sangue ingerido, responsável pela desativação da manutenção do pH 6,0, e pelo disparo do mecanismo de alcalinização do pH no intestino médio abdominal. De acordo com os nossos resultados, a ingestão de diferentes proteínas (não só aquelas presentes no sangue), induziu o processo de alcalinização do pH intestinal. Aminoácidos livres, na concentração normalmente encontrada no sangue não foram capazes de promover o aumento de pH no intestino médio, mas quando ingeridos em alta concentração, dispararam o mecanismo de alcalinização do pH. Um extrato preparado com o conteúdo de células intestinais foi capaz de promover uma suave alcalinização do pH intestinal quando aplicado diretamente em intestinos dissecados, e previamente acidificados. A serotonina, um hormônio provavelmente liberado na hemolinfa logo após o início do repasto sanguíneo, também foi aplicada em tubos digestivos dissecados, mas se mostrou ineficiente em promover a alcalinização do pH intestinal. A anidrase carbônica parece estar envolvida no processo de aumento do pH intestinal, uma vez que a acetazolamida (inibidor da anidrase carbônica) diminuiu a eficiência de alcalinização do intestino médio abdominal promovida pela ingestão de proteína. Um modelo geral para explicar o mecanismo de alcalinização é sugerido no presente trabalho. Utilizando-se microeletrodos íons sensíveis, foram medidas as concentrações de sódio e potássio no conteúdo intestinal ao longo da digestão do repasto sanguíneo. Foi observado que o sódio diminui, ao passo que o potássio aumenta à medida que o sangue é digerido. Estes resultados indicam que a manutenção do pH alcalino durante o processo digestivo pode ter relação com o transporte de sódio e potássio entre o lúmen e o citoplasma das células intestinais. Levando-se em consideração a importância do pH intestinal no desenvolvimento de *Leishmania infantum* em seu vetor, o pH do intestino médio de *L. longipalpis* infectados foi medido através de microeletrodos H⁺ sensíveis. Foi observado que, 30h após o repasto sanguíneo, ocorre uma acidificação precoce do pH nos insetos infectados (pH ~7,0), quando comparados com insetos não infectados (pH ~7,5). Um pH mais ácido pode estar relacionado com o atraso na digestão do sangue observado em *L. longipalpis* infectados por *Leishmania*.

ABSTRACT

The midgut pH control is a key step during *Lutzomyia longipalpis* digestion process. Phlebotomines have to change from a favorable carbohydrate digestion (luminal pH = 6) to blood digestion (luminal pH~8). Until blood ingestion, the acidic pH in the midgut is rigorously maintained closely to pH 6 by an efficient mechanism. Apparently, alkalization in the abdominal midgut of *L. longipalpis* can occur due to CO₂ volatilization from blood and by a second unknown mechanism. The first objective of our study was to characterize the primary stimulus, responsible for changing the pH from 6 to 8. Our data showed that any ingested protein could induce alkalization. At the concentration found in the blood, amino acids were ineffective to do that, while higher concentrations did. Midgut extracts were able to slightly alkalize the midgut lumen when applied upon dissected intestines. Serotonin did not promote alkalization of dissected intestines. The carbonic anhydrase enzyme (CA) seems to be involved in the alkalization of the midgut since acetazolamide (a CA inhibitor) when ingested with proteins interfered in this process. A general model of alkalization control was provided. Using ion sensible microelectrodes, we found that potassium (K⁺) concentration in the abdominal midgut content increased during the blood digestion. On the other hand, sodium (Na⁺) concentration was slightly reduced 26h after blood ingestion. These results indicated that alkalization in the abdominal midgut during blood digestion can be related to sodium/potassium transport between lumen and enterocytes. To determine the importance of the intestinal pH in the *Leishmania infantum* development inside *L. longipalpis*, infected phlebotomines were examined. In these insects, pH inside the midgut lumen was acidified more rapidly (pH ~ 7.0) than in uninfected ones (pH ~ 7.5). These data suggested that this acidification may be responsible for a digestion process delay in the infected sandflies.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1A | Desenho descritivo do tubo digestivo de fêmea de Flebotomíneo (Jobling, 1987) | 6 |
| Figura 1B | Intestino dissecado de fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após ingestão de açúcar e do repasto sanguíneo | 6 |
| Figura 2 | Esquema do ciclo vetorial de <i>Leishmania</i> sp. (adaptado de Bates, 2007) | 11 |
| Figura 3 | Alimentação forçada de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 25 |
| Figura 4 | Intestino de fêmea alimentada com solução contendo o corante azul de bromotimol e soluções do corante em pHs conhecidos | 30 |
| Figura 5 | Esquema do aparato para medida de concentrações de íons no intestino médio abdominal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 37 |
| Figura 6A | Montagem dos microeletrodos em micromanipuladores | 39 |
| Figura 6B | Introdução dos microeletrodos no intestino médio abdominal de fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> ingurgitada | 39 |
| Figura 7 | Anestesia e preparo do local para o repasto sanguíneo de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 42 |
| Figura 8 | Repasto sanguíneo de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em orelha de cão | 42 |
| Figura 9 | Seqüência de aminoácidos da lisozima com os pontos de clivagem esperados em uma digestão da proteína por ácido fórmico | 56 |
| Figura 10 | Gel de poliacrilamida 15% corado com nitrato de prata. PPM = Padrão de peso molecular; A= lisozima íntegra; B= lisozima digerida | 57 |
| Figura 11 | Esquema do modelo proposto para explicar a regulação do pH no intestino médio abdominal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 90 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|------------------|--|----|
| Quadro 1A | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de aminoácidos a 5,0 mM tamponado em pH 7,4 | 47 |
| Quadro 1B | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de aminoácidos a 5,0 mM em pH 6,0 (sem tampão) | 47 |
| Quadro 2 | Intervalos de pHs observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de aminoácidos (172 mM) em pH 7,4 sem tamponamento | 48 |
| Quadro 3A | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de peptona 2% em pH 7,4 sem tamponamento | 49 |
| Quadro 3B | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de peptona 1% em pH 6,0 sem tamponamento | 50 |
| Quadro 4A | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com soro total em pH 7,4 | 51 |
| Quadro 4B | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com soro total em pH 6,0 | 51 |
| Quadro 5A | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com soroalbumina 5% em pH 7,4 ou salina fisiológica de insetos, ambas sem tamponamento | 52 |
| Quadro 5B | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com soroalbumina 5% em pH 6,0 ou salina fisiológica de insetos, ambas sem tamponamento | 53 |
| Quadro 6A | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com lisozima 5% ou salina fisiológica para insetos, ambas em pH 7,4 não tamponadas | 54 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Quadro 6B | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com lizozima 5% ou salina fisiológica para insetos, ambas em pH 6,0 não tamponadas | 54 |
| Quadro 7 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com caseína 5% em pH 7,4 ou salina fisiológica para insetos, ambas sem tamponamento | 55 |
| Quadro 8 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com lizozima íntegra (5%) ou digerida (2,5%), ambas tamponadas com MES 30mM em pH 6,0 | 58 |
| Quadro 9 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação externa de albumina 5% ou salina fisiológica de insetos em intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica de insetos | 59 |
| Quadro 10 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação externa de lizozima 5% ou salina fisiológica de insetos em intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica de insetos | 59 |
| Quadro 11 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução de lizozima 5% tamponada em pH 6,0 contendo ou não acetazolamida | 61 |
| Quadro 12 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de extrato de intestino (3 intestinos/ μ L) ou salina fisiológica para insetos sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos | 62 |
| Quadro 13 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de Serotonina a 100 μ M ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos | 63 |
| Quadro 14 | Intervalos de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de Serotonina a 100 μ M ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com soroalbumina 5% | 63 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Quadro 15 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de Forskolin a 100µM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos | 65 |
| Quadro 16 | Intervalos de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de Forskolin a 100µM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com soroalbumina 5% | 66 |
| Quadro 17 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de AMPc 10mM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos | 67 |
| Quadro 18 | de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de AMPc 10mM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com soroalbumina 5% | 67 |
| Quadro 19 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de dideoxiadenosina 1,0 mM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos | 68 |
| Quadro 20 | Intervalos de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de dideoxiadenosina 1,0 mM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com soroalbumina 5% | 68 |
| Quadro 21 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de calcimicina 4,0 µM dissolvida em SFI ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos | 70 |
| Quadro 22 | Intervalos de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de calcimicina 4,0 µM dissolvida em SFI ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com soroalbumina 5% | 70 |
| Quadro 23 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos contendo ou não, o nitrato de potássio (KNO ₃) 100mM tamponado com HEPES 160mM em pH 7,5 | 72 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Quadro 24 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos contendo ou não nitrato de potássio (KNO ₃) 100mM tamponada com MES 160mM em pH 5,0 | 72 |
| Quadro 25 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação direta de SFI contendo ou não nitrato de potássio (KNO ₃) 100mM sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com Soroalbumina | 73 |
| Quadro 26 | Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação direta de SFI contendo ou não nitrato de potássio (KNO ₃) 100mM sobre intestinos dissecados de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com solução fisiológica para insetos | 74 |
| Quadro 27 | Concentrações de potássio (K ⁺) no sangue exposto ao meio ambiente e após ser ingerido por fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 75 |
| Quadro 28 | Concentrações de sódio (Na ⁺) no sangue exposto ao meio ambiente e no sangue após ser ingerido por fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 76 |
| Quadro 29 | pH no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após a digestão do sangue, 6 dias após a infecção por <i>Leishmania</i> | 78 |
| Quadro 30 | Eliminação dos restos de sangue do intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectadas e não infectadas por <i>Leishmania</i> | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | pH no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectadas e não infectadas por <i>Leishmania</i> | 78 |
| Tabela 2 | pH do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após ingestão de diferentes substâncias | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| EDTA | Ethylenediamine-tetraacetic acid |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulphonic acid |
| IMA | Intestino médio abdominal |
| IMT | Intestino médio torácico |
| MES | 2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid |
| SFI | Solução fisiológica para insetos |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| | 1.1 As leishmanioses | 1 |
| | 1.2 Biologia e morfologia dos Flebotomíneos | 3 |
| | 1.3 Ciclo intravetorial de <i>Leishmania</i> : fatores envolvidos e ambiente intestinal do flebotomíneo | 7 |
| | 1.4 Regulação do pH em artrópodes | 14 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 19 |
| 3 | OBJETIVO GERAL | 21 |
| | 3.1 Objetivos Específicos | 21 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| | 4.1 Manutenção de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 23 |
| | 4.2 Estudo do efeito da presença de aminoácidos, peptídeos e proteínas na desativação da manutenção do pH 6,0 e ativação do mecanismo de alcalinização no intestino de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> não alimentadas com sangue | 23 |
| | 4.3 Estudo do possível papel de hormônios no controle do pH do intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 31 |
| | 4.4 Estudo da participação do AMPc e do Ca ²⁺ na regulação do pH intestinal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 33 |
| | 4.5 Estudo do mecanismo responsável pelo controle do pH intestinal em fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> não alimentadas com sangue utilizando um inibidor de H ⁺ V-ATPases | 34 |
| | 4.6 Determinação da concentração dos íons Na ⁺ e K ⁺ no conteúdo alimentar do intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com sangue | 35 |
| | 4.7 Medida do pH no intestino médio abdominal e no intestino médio torácico de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectadas com <i>Leishmania infantum</i> durante e após a digestão do repasto sanguíneo | 40 |
| | 4.8 Observação do tempo de eliminação dos restos de sangue não digeridos em fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectadas com <i>Leishmania infantum</i> e em fêmeas não infectadas | 44 |
| 5 | RESULTADOS | 46 |
| 5.1 | Estímulos responsáveis pela alcalinização no intestino médio em fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> não alimentadas com sangue | 46 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5.2 | Efeito do extrato intestinal e da serotonina no controle do pH do intestino médio abdominal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 61 |
| 5.3 | Concentrações intracelulares de Ca^{2+} e AMPc e regulação do pH intestinal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem repasto sanguíneo | 64 |
| 5.4 | Efeito de íons nitrato (que atuam como inibidores da H^+ ATPase) no controle do pH intestinal em <i>Lutzomyia longipalpis</i> não alimentados com sangue | 71 |
| 5.5 | Concentrações normais dos íons K^+ e Na^+ no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com sangue de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) | 75 |
| 5.6 | pH intestinal e tempo de digestão do sangue em fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> naturalmente infectadas em cães com leishmaniose | 77 |
| 6 | DISCUSSÃO | 81 |
| 7 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 93 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 95 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são doenças negligenciadas de grande importância que impactam a saúde pública, e a economia de vários países em desenvolvimento (Desjeux, 2004). Aproximadamente 350 milhões de pessoas residem em áreas de risco para leishmaniose (Handman, 2000), sendo registrada a ocorrência de mais de 2 milhões de novos casos a cada ano (Desjeux, 2004). A expansão das leishmanioses na população humana tem como causa, uma série de fatores relacionados às alterações ambientais provocadas pelo homem, que levam à adaptação dos vetores ao ambiente artificial nos últimos tempos (Shaw, 2007). A ausência de uma vacina humana, e o aparecimento de resistência aos fármacos antimoniais contribuem também para a expansão da doença (Gazzinelli et al., 2004; Singh e Sivakumar, 2004). Os agentes etiológicos dessa doença pertencem à classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*.

Entre as várias espécies de *Leishmania* descritas (Shaw, 1994), aproximadamente 20 podem provocar leishmanioses em seres humanos (Ashford, 2000), com sintomas clínicos diversos que se manifestam principalmente nas formas cutânea e cutânea difusa, cutâneo-mucosa, e visceral. As formas cutâneas, e a forma cutâneo-mucosa se caracterizam pela multiplicação do protozoário em macrófagos da derme, e da mucosa naso-orofaríngea, respectivamente, e provocam lesões locais. Já na leishmaniose visceral (também conhecida como calazar), o protozoário se multiplica nas células do sistema mononuclear fagocitário, ocasionando uma infecção sistêmica que atinge principalmente baço, medula óssea, e fígado. Em muitos casos, a infecção é assintomática ou oligossintomática; entretanto, na leishmaniose visceral clássica o doente apresenta sintomas como febre, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, e caquexia, e leva ao óbito em mais de 90% dos casos se não tratada (Herwaldt, 1999).

O calazar no Brasil inicialmente era uma doença de ambientes silvestres ou rurais, mas nas últimas décadas, muitos casos têm ocorrido em centros urbanos e em áreas residenciais (Lainson e Rangel, 2005). Em Belo Horizonte-MG, Genaro e colaboradores (1990) relataram os primeiros casos de leishmaniose visceral urbana na população humana na década de 80. Na América Latina, a doença já foi relatada em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (Deane e Grimaldi 1985; Lainson e Rangel, 2005).

Dentre os vertebrados, *Leishmania* ocorre somente em mamíferos, incluindo roedores, canídeos, primatas, edentados e marsupiais (Lainson, 1988). Do ponto de vista epidemiológico, a leishmaniose pode se apresentar como uma antroponose, quando a doença circula somente entre humanos (leishmaniose visceral provocada por *Leishmania donovani*), ou como uma zoonose, quando circula entre o homem e outros mamíferos (Alvar et al., 2004). A leishmaniose visceral provocada por *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Sinonímia *L. chagasi*, Cunha e Chagas, 1937), tem o cão doméstico (*Canis familiaris*) como principal reservatório em ambientes ocupados por humanos (Deane e Deane, 1962; Quinnell et al., 1997), e ocorre em aproximadamente 50 países, afetando principalmente a China, algumas áreas mediterrâneas, e o Brasil (Alvar et al., 2004). Estima-se que só na América do Sul, milhões de cães estejam infectados, com altas taxas de infecção no Brasil e na Venezuela, locais aonde a alta prevalência da leishmaniose em cães vem sendo associada com o aumento do risco da doença para o homem (Werneck, et al., 2006; Baneth et al., 2008). Assim como nos humanos, a leishmaniose visceral nos cães tem um amplo espectro de manifestações, sendo que os animais podem se apresentar assintomáticos, ou desenvolver sintomas principalmente na epiderme (dermatites em geral) e nos linfonodos (Baneth et al., 2008).

Na natureza, *Leishmania* é transmitida ao homem e aos outros mamíferos através da picada de insetos dípteros da família Psychodidae (subfamília Phlebotominae), conhecidos como flebotomíneos. No Velho Mundo, flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* são os responsáveis pela

transmissão do protozoário, ao passo que no Novo Mundo, os vetores de *Leishmania* pertencem ao gênero *Lutzomyia*. O flebotomíneo *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) tem sido incriminado como o principal vetor de *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas (Chagas, 1936; Lainson et al., 1977).

1.2 Biologia e morfologia dos Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, cujo desenvolvimento a partir do ovo passa por quatro estádios larvais e pelo estágio de pupa (Ward, 1990; Killick-Kendrick, 1999). Os criadouros de flebotomíneos na natureza são de difícil localização, mas sabe-se que as larvas se alimentam de matéria orgânica do solo (Ferro et al., 1997). Os adultos, machos e fêmeas, podem utilizar seiva de plantas (Schlein e Warburg 1986), secreções açucaradas de insetos (Chaniotis, 1974; Molyneux et al., 1991) e néctar de flores (Alexander e Usma, 1994) como fonte de carboidratos na alimentação. Somente as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas, e o sangue obtido durante o repasto sanguíneo é utilizado para a maturação dos ovários.

Em *L. longipalpis* oriundos de colônia fechada, foi observado que a digestão do sangue no intestino de insetos alimentados em hamsters dura aproximadamente 72 horas, sendo que a oviposição é realizada a partir do quinto dia após o repasto sanguíneo. O ciclo desta espécie, da fase de ovo até a emergência dos adultos, tem a duração aproximada de 40 dias. Este período pode variar, dependendo das condições de criação. Rangel e colaboradores (1986), por exemplo, observaram um período de desenvolvimento que variou de 28 a 36 dias para *L. longipalpis* e *Lutzomyia intermedia*, respectivamente, criados em condições de laboratório.

Os adultos de *L. longipalpis* se caracterizam pelo tamanho reduzido (entre 2,0 e 3,0mm), e pelo corpo densamente coberto de cerdas finas. As pernas e as antenas são relativamente longas e finas. Quando vivos e em repouso, os flebotomíneos mantêm suas asas em posição semi-ereta. O abdômen é formado por 11 segmentos, sendo a extremidade posterior bem diferenciada entre os

sexos. Nas fêmeas, a porção final do abdome é ligeiramente arredondada, sendo os últimos segmentos telescopados. Nos machos, o 9^o e o 10^o segmentos são bifurcados, e compõem, juntamente com outros elementos, a genitália masculina. As peças bucais são do tipo sugador pungitivo, constituídas de labro, um par de mandíbulas, hipofaringe, um par de maxilas e o lábio (Young e Duncan, 1994). Os ductos provenientes dos dois ácinos salivares se unem e formam um canal único que se abre na extremidade da hipofaringe, de onde a saliva é liberada no local da picada.

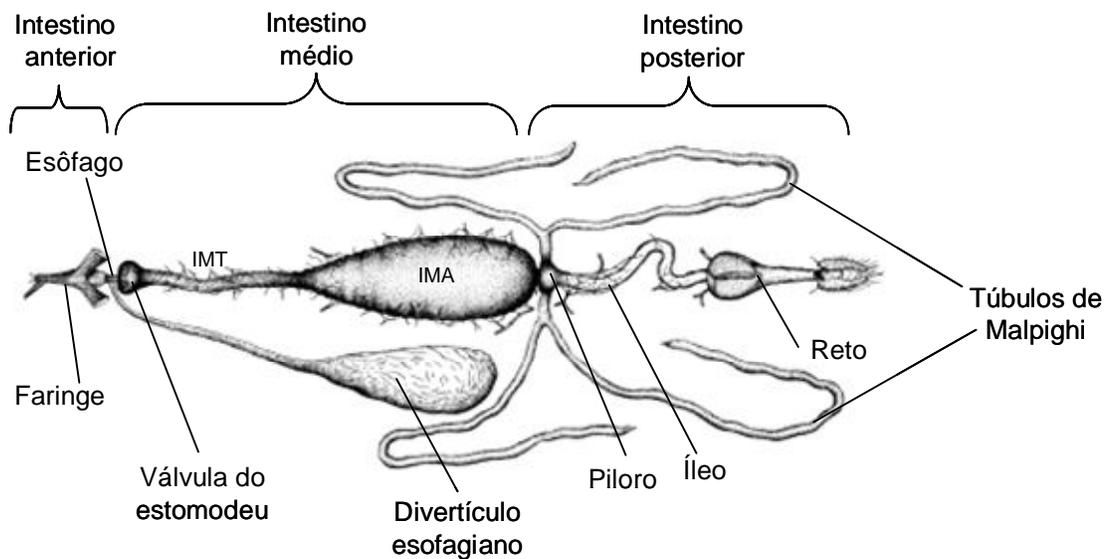
A saliva das fêmeas dos flebotomíneos é rica em biomoléculas ativas de grande importância no processo da hematofagia (Ribeiro, 1987a). Além disso, a saliva é capaz de facilitar a implantação da infecção de *Leishmania* sp. nos hospedeiros vertebrados (Ribeiro, 1987b). Vasodilatadores (Ribeiro et al., 1989) e inibidores do sistema de complemento dos mamíferos (Cavalcante et al., 2003), são apenas alguns exemplos de biomoléculas presentes na saliva dos flebotomíneos.

Quanto à anatomia interna, os flebotomíneos apresentam um intestino anterior formado pelo cibário, pela faringe, e por um curto esôfago (**Fig. 1A**). Nestas duas primeiras regiões encontram-se as bombas cibarial e faringiana, que funcionando em conjunto, permitem a sucção do alimento. A válvula do estomodeu é a ligação entre o intestino anterior e o intestino médio do inseto. Da região imediatamente anterior a válvula do estomodeu (ainda no intestino anterior) emerge um divertículo esofágico (Jobling, 1987), responsável pelo armazenamento inicial de açúcares (Schlein, 1986; Tang e Ward, 1998). Os açúcares armazenados no divertículo são enviados ao intestino médio, e esta passagem é controlada pela válvula presente no estomodeu (Tang e Ward, 1998). Já a digestão do sangue ingerido durante o repasto ocorre exclusivamente no intestino médio abdominal, conforme mostrado na **Fig. 1B**.

O intestino médio de *L. longipalpis*, como em todos os flebotomíneos, se subdivide em duas regiões distintas: o intestino médio torácico e o intestino médio abdominal (**Fig. 1**). O

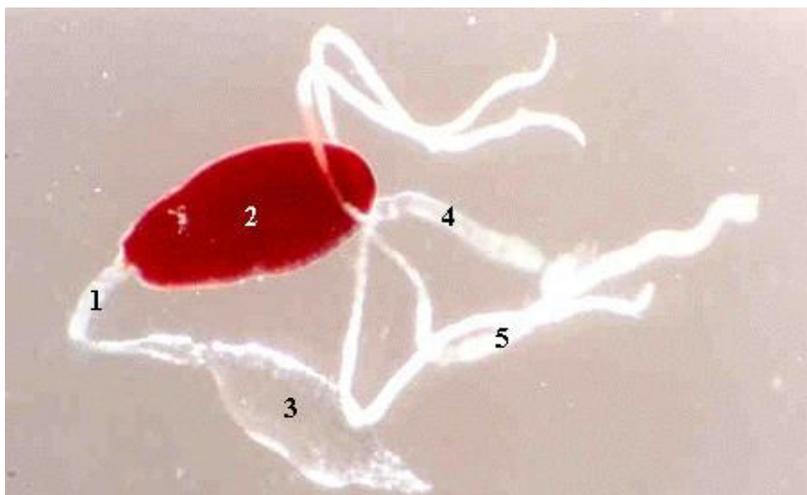
intestino médio torácico é uma porção estreitada para onde se dirigem, gradativamente, os açúcares ingeridos que se encontravam, inicialmente, armazenados no divertículo (Tang e Ward, 1998). O intestino médio abdominal é uma porção dilatada para onde vai todo o sangue ingerido durante o repasto sanguíneo.

O intestino posterior dos insetos é constituído principalmente por células cujos ápices são ricos em mitocôndrias, e tais células são responsáveis pelo transporte de íons e água. Nos flebotomíneos, semelhante ao observado em outros insetos (Chapman, 1998) o intestino posterior é diferenciado em piloro, íleo e reto (Jobling, 1987). O piloro funciona como uma válvula, e dele emergem dois pares de túbulos de Malpighi que auxiliam na excreção de água e de alguns eletrólitos (Chapman, 1998).



IMT: Intestino Médio Torácico
 IMA: Intestino Médio Abdominal

Figura 1A - Desenho descritivo do tubo digestivo de fêmea de Flebotomíneo (Jobling, 1987)



- 1 - Intestino médio torácico
- 2 - Intestino médio abdominal
- 3 - Divertículo esofágico
- 4 - Intestino posterior
- 5 - Túbulos de Malpighi

Figura 1B - Intestino dissecado de fêmea de *Lutzomyia longipalpis* após ingestão de açúcar e do repasto sanguíneo

De maneira geral, o intestino médio dos insetos é o órgão responsável pelo armazenamento e digestão do sangue (em se tratando de hematófagos) e também pela digestão dos carboidratos que, *a priori*, ficam armazenados no divertículo. Em flebotomíneos e em outros insetos, o intestino médio é formado por um epitélio constituído de uma monocamada de células colunares cilíndricas densamente cobertas por microvilosidades voltadas para o lúmen intestinal. Tais células estão ativamente envolvidas na produção e secreção de enzimas, bem como na absorção de nutrientes (Billingsley e Lehane, 1996) e se apóiam numa lâmina basal fina, que separa o tubo digestivo da hemocele do inseto (Rudin e Hecker, 1982). Assim como ocorre em outros insetos, nos flebotomíneos a superfície da membrana basal encontra-se envolvida por fibras musculares longitudinais e circulares, que formam uma rede muscular responsável pelos movimentos de todo o intestino (anterior, médio e posterior) durante a passagem dos alimentos (Billingsley e Lehane, 1996; Andrade-Coelho et al., 2001).

Além da secreção de enzimas digestivas e da absorção e transporte dos produtos da digestão, as células do intestino médio abdominal dos flebotomíneos são responsáveis também pela produção e secreção da membrana peritrófica. Esta é uma estrutura acelular amorfa composta de quitina, mucopolissacarídeos e proteínas, que envolve o bolo alimentar, provavelmente ajudando a evitar danos ao epitélio intestinal e protegendo o flebotomíneo contra possíveis infecções durante a digestão do sangue (Gemetchu, 1974; Killick-Kendrick, 1979; Killick-Kendrick, 1990; Walters et al., 1993 e 1995; Pimenta et al., 1997; Secundino et al., 2005).

L. longipalpis possui dois tipos de células endócrinas dispersas na monocamada do epitélio do intestino médio. O primeiro tipo produz grânulos ativos que parecem ser enviados para a hemolinfa via membrana celular, e o segundo parece se abrir para o lúmen secretando seus produtos através das microvilosidades. Estes dois tipos celulares, e seus produtos de secreção provavelmente estão envolvidos no controle dos processos digestivos do flebotomíneo (Saraiva et al., 1995; Leite e Evangelista, 2001).

1.3 Ciclo intravetorial de *Leishmania*: fatores envolvidos e ambiente intestinal do flebotomíneo

Leishmania circula entre os hospedeiros vertebrados e os flebotomíneos vetores se apresentando sob duas formas evolutivas principais: as amastigotas, que são formas intracelulares obrigatórias, têm formato oval, e flagelo não exteriorizado, e se desenvolvem em células de mamíferos; e as promastigotas, que são flageladas, têm formato alongado e se desenvolvem no tubo digestivo dos insetos vetores. O desenvolvimento das várias espécies de *Leishmania* no tubo digestivo dos flebotomíneos pode ocorrer nos intestinos anterior, médio e até no posterior (Lainson et al., 1977; Lainson et al., 1979), onde ocorrem diversas interações entre o protozoário e o ambiente intestinal do inseto, culminando com o aparecimento de formas evolutivas denominadas promastigotas metacíclicas (Sacks e Perkins, 1984). Estas são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (Killick-Kendrick, 1990; Sacks, 2001; Bates e Rogers, 2004).

Leishmania infantum, dentro do tubo digestivo de *L. longipalpis* tem seu desenvolvimento limitado aos intestinos anterior e médio, sem passagem pelo intestino posterior, caracterizando essa espécie como sendo do grupo suprapilária, e pertencente ao subgênero *Leishmania* (Lainson et al., 1979; Walters et al., 1989). Os flebotomíneos se infectam com *Leishmania* ao se alimentarem em um hospedeiro vertebrado que apresente amastigotas do parasito nos macrófagos presentes na pele (Handman e Bullen, 2002). Estes macrófagos parasitados podem se romper no local da picada, onde o flebotomíneo vai ingerir diretamente as formas amastigotas livres, ou se romperem no intestino médio do flebotomíneo, liberando ali as formas amastigotas (Lainson et al., 1987).

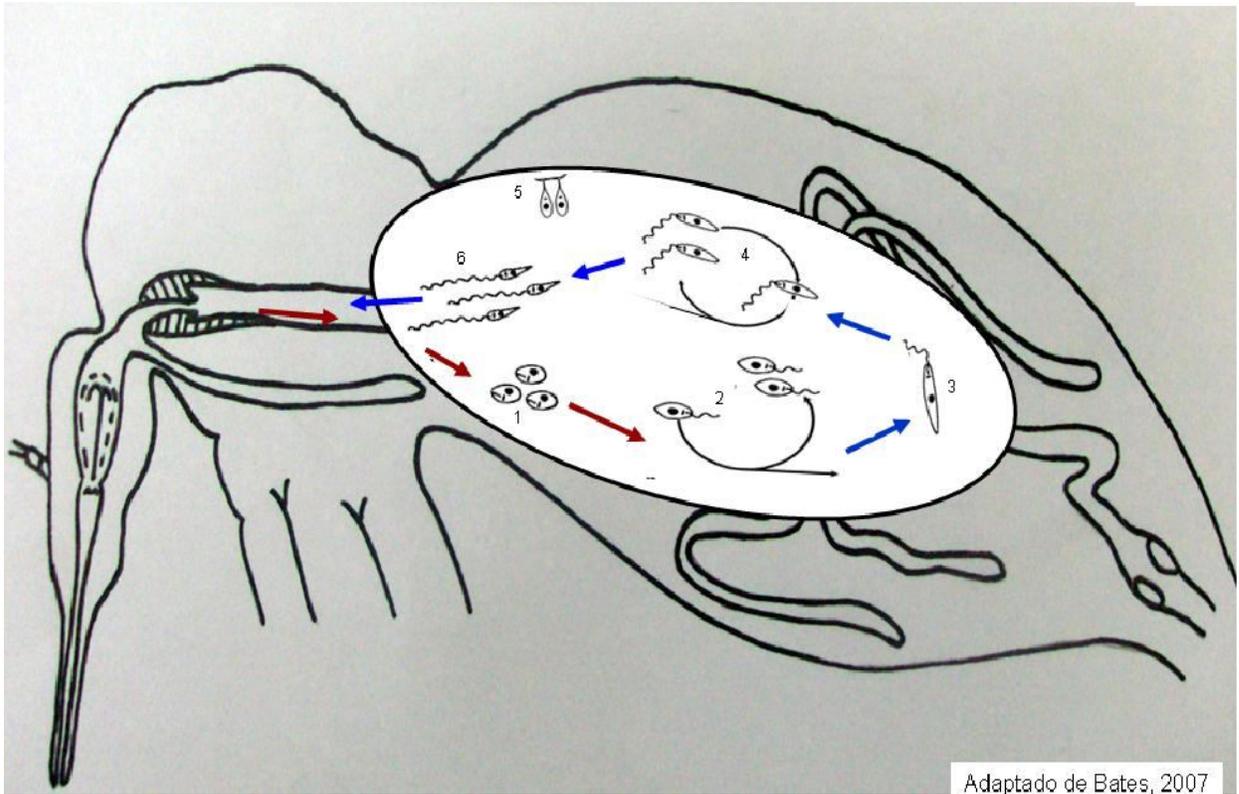
No intestino médio abdominal, os protozoários vivem no meio extracelular (lúmen intestinal) misturados ao bolo alimentar, que é envolvido pela membrana peritrófica (ver item 1.2). O ambiente no intestino do flebotomíneo oferece novas condições de temperatura e pH que desencadeiam o primeiro processo de transformação de *Leishmania* (Bates e Rogers, 2004;

Kamhawi, 2006): as amastigotas passam a se diferenciar em formas flageladas denominadas promastigotas (Killick-Kendrick, 1979 e 1990; Killick-Kendrick e Rioux, 1991; Walters, 1993), conforme a **Figura 2**. As primeiras promastigotas formadas são curtas, ovóides e pouco móveis, e são denominadas promastigotas procíclicas (Gossage et al., 2003; Bates e Rogers, 2004).

As promastigotas procíclicas ficam confinadas no interior da membrana peritrófica (Secundino et al., 2005) do intestino médio abdominal onde se dividem intensamente, e se diferenciam novamente, resultando em formas mais alongadas, denominadas promastigotas nectomônadas (Gossage et al., 2003; Bates, 2007). As nectomônadas produzem e secretam quitinases capazes de perfurar a membrana peritrófica (Schlein et al., 1991; Shakarian e Dwyer, 2000), e provavelmente, com a ajuda de quitinases produzidas pelo próprio intestino do flebotomíneo (Ramalho-Ortigão et al., 2005; Bates, 2007), conseguem escapar do bolo alimentar e migram para as porções anteriores do intestino médio abdominal. Algumas dessas formas se fixam, através da inserção dos flagelos ou do corpo celular, nas microvilosidades da região anterior do intestino médio (Molyneux e Killick-Kendrick, 1987; Walters et al., 1989; Lang et al., 1991). Esta fixação é mediada pelo LPG (lipofosfoglicano), uma molécula constituinte do glicocálice das formas promastigotas que recobre toda a superfície do protozoário, incluindo o flagelo (McConville et al., 1992; Pimenta et al., 1992; Pimenta et al., 1994; Sacks et al., 1995; Sacks et al., 2000, Soares et al., 2002; Kamhavi et al., 2004). Após a expulsão dos restos do sangue digerido e da membrana peritrófica, as nectomônadas que foram capazes de se fixarem as microvilosidades do intestino médio abdominal e escaparam da eliminação, migram paulatinamente para o intestino médio torácico (Sacks, 2001; Bates, 2007). Logo após a ruptura da membrana peritrófica, as promastigotas começam a sofrer diferenciação para formas mais curtas chamadas leptomônadas. Neste momento começam a surgir também as formas afiladas e móveis infectantes para o hospedeiro mamífero, denominadas promastigotas metacíclicas (Gossage et al., 2003, Bates, 2007). Posteriormente, uma parte das nectomônadas, leptomônadas, e metacíclicas migram para a região da válvula do estomodeu (junção entre o intestino médio e o

intestino anterior) (Bates, 2007). Algumas das leptomônadas ou nectomônadas se aderem à válvula do estomodeu, e se diferenciam em haptomônadas que permanecem no local (Killick-Kendrick et al., 1974). As leptomônadas dão continuidade ao processo de metaciclologênese iniciado logo após a eliminação da membrana peritrófica, aumentando ainda mais o número de promastigotas metacíclicas. As promastigotas metacíclicas podem ser transmitidas no momento em que o flebotomíneo as regurgita na pele do hospedeiro durante uma tentativa de obter um repasto sanguíneo (Jefferies et al., 1986; Warburg e Schlein, 1986). Os morfotipos descritos estão representados na **figura 2**.

Algumas hipóteses são propostas para explicar como ocorre a transmissão do protozoário para o hospedeiro. Schlein e colaboradores (1992) sugerem que as quitinases secretadas pelas promastigotas de *Leishmania* danificam a válvula do estomodeu, o que provoca um refluxo do conteúdo do intestino médio quando o inseto tenta realizar o repasto sanguíneo. Stierhof e colaboradores (1999) observaram que uma substância com consistência de gel encontrada no intestino de flebotomíneos infectados era um produto secretado pelo próprio protozoário. Posteriormente, Rogers e colaboradores (2002) demonstraram que eram as promastigotas leptomônadas que produziam o gel, identificado por Rogers e colaboradores (2004) como um proteofosfoglicano filamentosos (fPPG). Este gel, além de ajudar na proteção do protozoário contra as enzimas digestivas do inseto (Secundino et al., 2010), tem importante participação no processo inflamatório (recrutamento e ativação de macrófagos) decorrente da inoculação de *Leishmania* na derme do hospedeiro vertebrado (Rogers et al., 2009). A presença do fPPG e de formas do parasito no intestino médio torácico causam uma obstrução física no local. Tal obstrução, aliada a um funcionamento irregular da válvula do estomodeu (que tende a ficar aberta), permite que as formas metacíclicas livres presentes do intestino anterior sejam regurgitadas no hospedeiro vertebrado durante a picada (Bates, 2007).



- 1-amastigotas;
- 2-promastigotas procíclicas;
- 3-promastigota nectomônada;
- 4-promastigotas leptomônadas;
- 5-promastigotas haptomônodas;
- 6-promastigotas metacíclicas.

Figura 2 - Esquema do ciclo vetorial de *Leishmania* sp. (adaptado de Bates, 2007)

Durante o ciclo vetorial de *Leishmania*, uma grande variedade de fatores deve influenciar tanto na reprodução e diferenciação do parasito, quanto nos processos digestivos que ocorrem paralelamente no intestino de um flebotomíneo infectado. De fato, estudos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado alguns desses fatores.

Em meio de cultura, Melo (1982) observou que formas promastigotas de *Leishmania* se multiplicam melhor em pH neutro ou ligeiramente alcalino. Por outro lado, ocorre maior diferenciação das promastigotas em formas metacíclicas quando o cultivo é acidificado até pH 5,5 (Bates e Tetley, 1993; Zakai et al., 1998). Portanto, a acidificação do meio parece ser determinante na diferenciação de *Leishmania* em cultivo (Bates e Tetley, 1993).

Outro estímulo para a diferenciação do protozoário *in vitro* é o esgotamento de nutrientes (Sacks e Perkins, 1985). Quando uma cultura “envelhece”, isto é, passa da fase logarítmica de crescimento para a fase estacionária, o número de formas metacíclicas aumenta (Giannini, 1974). No entanto, a presença de hemoglobina (Schlein e Jacobson, 1994), hemina (Charlab e Ribeiro 1993, Charlab et al., 1995), e da tetrahydrobiopterina presente no soro de mamíferos (Cunnigham et al., 2001), ajudam a manter altos níveis de reprodução e baixos níveis de diferenciação entre as promastigotas. A queda dos níveis dessas três substâncias em cultivo, e ainda, um aumento da concentração de CO₂ do meio (Méndez, 1999) favoreceriam a transformação de *Leishmania* em promastigotas metacíclicas. Até mesmo a presença de saliva, quando hemina não está presente no meio, parece influenciar na diferenciação das formas promastigotas em metacíclicas (Charlab e Ribeiro 1993, Charlab et al., 1995).

Concomitantemente ao desenvolvimento de *Leishmania* no tubo digestivo de um flebotomíneo infectado, ocorrem os processos de digestão do sangue e dos açúcares presentes na dieta do inseto. Logo após um repasto (infectante ou não), o sangue ingerido pelo flebotomíneo se dirige para a porção abdominal do intestino médio. Se neste período, o inseto se alimentar de substâncias ricas em açúcares, estes são enviados lentamente do divertículo esofagiano (intestino

anterior) para a porção torácica do intestino médio, onde serão processados (Tang e Ward, 1998; Gontijo et al., 1998).

Com relação à digestão enzimática de proteínas e carboidratos no intestino médio, sabe-se que este processo sofre grande influência do pH. As enzimas responsáveis pela digestão das proteínas em flebotomíneos (principalmente aquelas semelhantes às tripsinas) são mais ativas em pHs ligeiramente alcalinos (Borovsky e Schlein, 1987; Mahmood e Borovsky, 1992; Dillon e Lane, 1993a; Mahmood e Borovsky, 1993). A atividade de proteases semelhantes à tripsina já foi detectada por Gontijo e colaboradores (1998) no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* após o repasto sanguíneo. Entretanto, as glicosidases responsáveis pela digestão dos açúcares em *L. longipalpis* são mais eficientes em pHs próximos a 6,0 (Gontijo et al., 1998), e sua atividade é cerca de 14 vezes maior no intestino médio torácico do que no intestino médio abdominal (Santos et al., 2008). Em conjunto, esses dados mostram que a digestão de açúcares e de sangue neste inseto pode ocorrer simultaneamente, sendo os carboidratos digeridos em meio ácido no intestino médio torácico, enquanto as proteínas sofrem digestão enzimática em pH alcalino na porção abdominal do intestino médio (Santos et al., 2008).

No intestino de um flebotomíneo infectado, para que o desenvolvimento de *Leishmania* e os processos digestivos ocorram ao mesmo tempo, e de maneira eficiente, é necessária, entre outros fatores, uma fina regulação do pH no tubo digestivo do inseto. O pH deve se manter mais alcalino durante a digestão das proteínas do sangue e também na fase de multiplicação do protozoário, ao passo que a acidificação do intestino médio seria importante para o processo de metaciclogênese das leishmânias, como foi proposto por Gontijo e colaboradores (1998).

Resultados recentes obtidos em fêmeas não infectadas de *L. longipalpis* por Santos e colaboradores (2008) estão de acordo com a hipótese proposta por Gontijo et al. (1998): logo após o repasto, o pH do sangue ingerido presente no intestino médio abdominal alcança, em média, pH 8,15; ao longo da digestão, este pH declina gradualmente até pH 7,7 decorridas as primeiras 24 horas. Além disso, Santos e colaboradores (2008) mostraram que em fêmeas não

alimentadas com sangue, o pH no intestino médio é mantido ativamente próximo a 6,0, mesmo quando os insetos são obrigados a ingerir soluções fortemente tamponadas em pH 7,5 ou pH 5,0. Tais resultados foram observados em fêmeas de *L. longipalpis* não infectadas com *Leishmania*. Contudo, *Leishmania* e outros tripanossomatídeos realizam a metabolização de açúcares produzindo ácidos orgânicos como catabólitos (Darling et al., 1987). Estes catabólitos ácidos acabam sendo liberados no meio onde o protozoário se encontra, e poderiam influenciar o pH no lúmen intestinal do flebotomíneo infectado. Um pH intestinal mais ácido poderia diminuir a eficiência das enzimas proteolíticas dos flebotomíneos, uma vez que estas, atuam melhor em pHs acima de pH 7,0 (Dillon e Lane, 1993a). Outra forma dos protozoários alterarem os parâmetros físico-químicos do ambiente onde vivem já foi observada por vários autores, pois promastigotas de algumas espécies de *Leishmania* são capazes de modular a atividade das proteases intestinais de seus vetores naturais, garantindo assim a sua própria sobrevivência (Schlein e Romano, 1986; Dillon e Lane, 1993b; Schlein e Jacobson, 1998). *Leishmania major*, por exemplo, é capaz de inibir a atividade proteolítica no intestino de *Phlebotomus papatasi*, seu vetor natural. Neste caso, foi observado que a alteração da atividade proteolítica no flebotomíneo está relacionada à liberação de glicoconjugados derivados de proteoglicanos presentes na superfície das formas promastigotas de *Leishmania* (Sacks et al., 2000).

1.4 Regulação do pH em artrópodes

O pH no tubo digestivo de larvas de lepidópteros (Dadd, 1975) e dípteros (Berenbaum, 1980) pode alcançar valores próximos a 11 no intestino médio anterior. Fazito do Vale e colaboradores (2007) também observaram valores de pH bastante alcalinos (igual ou acima de pH 9,0) na região anterior do intestino médio de larvas de *L. longipalpis*. Há várias décadas, hipóteses tem sido propostas no sentido de elucidar os mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação e manutenção de pHs altamente alcalinos no intestino desses insetos.

Um fator muito importante na regulação do pH em artrópodes seria a atividade de H^+ V-ATPases (Beyenbach e Wieczorek, 2006). Esta enzima, encontrada em quase todas as membranas celulares eucarióticas (Beyenbach e Wieczorek, 2006), possibilita vários processos fisiológicos em artrópodes, como o transporte ativo de aminoácidos pelas células intestinais, a excreção de líquidos e catabólitos pelos túbulos de Malpighi, e em vários casos, uma intensa alcalinização do intestino (Wieczorek et al., 2000).

De maneira geral, o pH da luz intestinal dos insetos depende diretamente da movimentação diferencial de íons por meio de proteínas transportadoras através da membrana plasmática das células do tubo digestivo. Por sua vez, a movimentação de íons através de qualquer proteína transportadora depende da diferença de potencial de membrana (diferença de potencial entre o lado interno e externo da membrana plasmática) e da diferença de concentração, entre o meio exterior e o meio intracelular, dos íons a serem transportados. O potencial de membrana das células intestinais de insetos é basicamente gerado pelo bombeamento de íons H^+ do interior para o exterior das células por meio de V-ATPases, que utilizam o ATP como fonte de energia (Okech et al., 2008; Harvey, 2009; Onken e Moffett, 2009; Wieczorek et al., 2009). As Na^+/K^+ -ATPases também podem estar envolvidas nesse processo (Okech et al., 2008; Onken et al., 2009; Onken e Moffett, 2009). Assim como as H^+ V-ATPases, as Na^+/K^+ -ATPases também são eletrogênicas, pois para cada $3Na^+$ que são bombeados para fora, concomitantemente $2K^+$ são bombeados para dentro, fazendo com que o interior das células fique mais negativo em relação ao meio exterior (Okech et al., 2008). Atuando desta maneira, esses sistemas transportadores energizam as membranas de modo a fornecer a energia necessária para o funcionamento de outros sistemas de transporte como, por exemplo, o sistema de antiporte NHA no qual, para cada Na^+ transportado para fora, $2H^+$ são levados para o meio intracelular (Rheault et al., 2007). Em *L. longipalpis* a regulação do pH intestinal provavelmente está ligada à atividade de H^+ V-ATPases, uma vez que transcritos de uma das subunidades desta enzima já foram encontrados por Ramalho-Ortigão et al. (2007) no intestino de fêmeas adultas com e sem o repasto sanguíneo.

Os aminoácidos provenientes da dieta dos insetos hematófagos têm reconhecida importância na fisiologia digestiva. Em fêmeas de *Aedes aegypti*, a presença de aminoácidos no intestino médio é um dos fatores responsáveis pela ativação da síntese de tripsina (Brandon et al., 2008). A presença de aminoácidos e/ou proteínas provenientes da digestão do sangue ingerido por si só, poderia ser um fator envolvido na alcalinização do pH intestinal em *L. longipalpis*. Tal hipótese se baseia no fato de que a ingestão do sangue pelo flebotomíneo é capaz de desativar imediatamente o mecanismo de manutenção do pH 6,0, e alcalinizar o pH intestinal, como já demonstrado por Santos e colaboradores (2008). O processo de alcalinização que se desencadeia a partir desse evento envolve basicamente dois mecanismos: o primeiro mecanismo de alcalinização é mais evidente, e decorre do processo de volatilização do CO₂ transportado no sangue ingerido. De acordo com a equação $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, a volatilização de CO₂ a partir do sangue desloca o equilíbrio da reação no sentido de diminuir a concentração de H⁺ no meio. Parece existir um segundo mecanismo de alcalinização, ainda não caracterizado, que entra em funcionamento assim que a manutenção do pH 6,0 é desativada pela ingestão de sangue (Santos et al., 2008).

O AMPc é um segundo-mensageiro importante na regulação de diversos processos biológicos celulares, como por exemplo, aqueles relacionados ao transporte de íons K⁺, Cl⁻, e também relacionados com o aumento de Ca²⁺ intracelular (Berridge et al., 1976; Berridge, 1977; Rein et al., 2006). Na glândula salivar de *Calliphora vicina* (Diptera), o estímulo para a produção e liberação de uma saliva ácida e rica em KCl depende de uma cascata que envolve um aumento do AMPc intracelular, induzido pela presença de 5-Hidroxitriptamina (hormônio serotonina) na hemolinfa (Zimmermann et al., 2003; Dames et al., 2006). Este aumento do AMPc, por sua vez, culmina com a ativação das V-ATPases responsáveis pelo bombeamento de H⁺ para o lúmen da glândula, o que resulta na acidificação da saliva (Schewe et al., 2008). A serotonina é reconhecidamente envolvida na regulação de atividades fisiológicas ligadas ao processo de alimentação em vários invertebrados (Long e Murdock, 1983; Lent e Dickinson, 1988; Nässel,

1988; Kaufmann et al., 2004, Orchard, 2006). Em *L. longipalpis*, tanto a ação da serotonina quanto o aumento de AMPc intracelular, poderiam estar envolvidos na manutenção do pH 6,0 ou no disparo do mecanismo de alcalinização logo após o repasto sanguíneo.

Além dos enterócitos que produzem enzimas digestivas e que absorvem os nutrientes digeridos, o intestino médio dos flebotomíneos apresenta várias células endócrinas espalhadas pelo epitélio (Leite e Evangelista, 2001) (ver item 1.2). Acredita-se que em larvas do coleóptero *Rhynchophorus ferrugineus*, hormônios produzidos por células semelhantes estão envolvidos no processo de manutenção dos pHs adequados a cada porção do tubo digestivo (Sunitha et al., 1999). Além disso, Harshini e colaboradores (2002) observaram que neuropeptídeos produzidos por insetos (análogos a hormônios envolvidos com a digestão em vertebrados) têm efeito sobre a produção e a liberação de enzimas no intestino de larvas de *Opisina arenosella* (Lepidoptera). Daí a importância de se investigar o efeito de peptídeos obtidos do intestino médio de *L. longipalpis* no pH intestinal. Esses peptídeos, que normalmente agem em concentrações mínimas, poderiam ser responsáveis pela desativação da manutenção do pH 6 e também pelo disparo do mecanismo de alcalinização logo após o repasto sanguíneo. É possível que alguns desses peptídeos também estejam envolvidos na regulação da produção de enzimas digestivas no intestino do flebotomíneo.

O transporte de íons entre os meios intra e extracelulares em eucariotos está diretamente relacionado com a concentração destes íons nos meios, sua carga elétrica, e também com a situação fisiológica das membranas celulares. A regulação do pH no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* certamente envolve o transporte intracelular/extracelular de vários íons, dentre eles, o HCO_3^- e o H^+ , cuja reação de formação a partir de CO_2 e H_2O é catalisada pela enzima anidrase carbônica no interior das células do intestino médio. De fato, a utilização de acetazolamida (inibidor da anidrase carbônica) mostrou que com a inibição da atividade da anidrase carbônica, o mecanismo de acidificação para pH 6,0 no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* sem repasto sanguíneo é menos eficaz (Santos et al., 2008). Além disso, em *L.*

longipalpis já foi detectada a presença de transcritos semelhantes à anidrases carbônicas encontradas em outros dípteros (Santos et al., 2008).

Outros íons como Cl^- e Na^+ são essenciais em muitos processos de excreção e regulação osmótica em artrópodes (Harrison e Phillips, 1992) e também podem estar envolvidos no controle de pH desses organismos. Segundo o modelo proposto por Boudko e colaboradores (2001b) ocorreria um antiporte $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ no qual o HCO_3^- seria enviado para a luz do tubo digestivo, alcalinizando o lúmen do intestino médio de larvas de *A. aegypti* (Diptera). Boudko e colaboradores (2001b) acreditam que o antiporte $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ seja controlado pela presença de íons sódio (Na^+), uma vez que já foi demonstrada a existência de transportadores $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ sódio-dependentes no trato digestivo de larvas de um outro díptero, *Drosophila melanogaster* (Romero et al., 2000). Recentemente, foi demonstrado que larvas de *Anopheles gambiae* (Diptera) utilizam íons Na^+ para alcalinizar o canal alimentar. Neste caso, transportadores de membrana específicos fazem o antiporte H^+ / Na^+ no qual íons Na^+ são enviados para o lúmen do intestino médio anterior, e em troca, H^+ são retirados deste local, provocando sua alcalinização (Okech et al., 2008). Assim, além de se conhecer o pH intestinal nos flebotomíneos, torna-se importante a medida das concentrações de íons como Na^+ , K^+ e Cl^- no lúmen intestinal destes insetos em diferentes situações fisiológicas, bem como avaliar a diferença de potencial nas membranas das células do tubo digestivo. Tais medidas são essenciais para explicar como funcionam os mecanismos responsáveis pela regulação do pH intestinal em *L. longipalpis*.

2 JUSTIFICATIVA

Até o momento se conhece pouco sobre a regulação do pH no intestino médio de *L. longipalpis*, local onde ocorre o desenvolvimento de *L. infantum*. Santos e colaboradores (2008) demonstraram que o pH é ativamente mantido em pH 6,0 em fêmeas sem o repasto sanguíneo. A atividade da enzima anidrase carbônica é apontada como outro fator envolvido no controle do pH intestinal desta espécie de flebotomíneo (Santos et al., 2008). A atividade de bombas de prótons (H^+ V-ATPases) tem grande importância na regulação do pH intestinal em larvas de lepidópteros (Wieczorek et al., 2000, Beyenbach e Wieczorek, 2006) e dípteros (Onken e Moffett, 2009). Apesar de ter sido registrada a presença de RNAm para H^+ V-ATPase em *L. longipalpis* (Ramalho-Ortigão et al., 2007), ainda não há nenhum estudo sobre como esta bomba de prótons atua no mecanismo de controle do pH intestinal em flebotomíneos.

O efeito direto ou indireto da ação de hormônios como a serotonina (Schewe et al., 2008) e de segundos mensageiros celulares como o AMPc (Dames et al., 2006) no controle do pH salivar de dípteros também tem sido estudado, apresentando resultados interessantes. Entretanto, ainda não se conhece a relação da serotonina e do AMPc com a regulação do pH no intestino médio em flebotomíneos.

A alcalinização observada no intestino médio abdominal de *L. longipalpis* após o repasto sanguíneo tem como uma das causas, a volatilização do CO_2 do sangue ingerido (Santos et al., 2008). Entretanto, ainda não se conhece quase nada sobre outros mecanismos que podem também estar envolvidos no controle do pH intestinal. Este(s) mecanismo(s) provavelmente atua(m) na manutenção de um pH alcalino durante a digestão do sangue no intestino médio abdominal. Além disso, não foi verificado se a presença de *Leishmania* no intestino do flebotomíneo implica em mudanças fisiológicas intensas o bastante para alterar algum dos mecanismos de controle do pH no intestino do inseto.

Desta forma, o presente estudo visou elucidar com maiores detalhes, os mecanismos envolvidos no controle do pH no tubo digestivo de *L. longipalpis*, o que possibilita uma melhor

compreensão do desenvolvimento de *Leishmania* nos seus vetores, bem como pode oferecer uma importante contribuição para aumentar os conhecimentos gerais sobre a fisiologia dos dípteros hematófagos.

3 OBJETIVO GERAL

Estudar os mecanismos de controle do pH no tubo digestivo de *Lutzomyia longipalpis* e relacionar as condições fisiológicas do mesmo com o desenvolvimento de *Leishmania infantum* nesse vetor.

3.1 Objetivos Específicos

-Determinar se a presença de aminoácidos, polipeptídeos ou proteínas no intestino médio pode desativar o mecanismo de manutenção do pH 6 e ativar a alcalinização no intestino de fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue;

-Investigar o possível papel de peptídeos encontrados em células endócrinas intestinais no controle do pH do intestino médio abdominal de fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue;

-Investigar a possível participação de Ca^{2+} e do AMPc na regulação do pH intestinal de fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue;

-Estudar o mecanismo responsável pelo controle do pH intestinal em fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue utilizando íons nitrato, que funcionam como um inibidores para H^+ V-ATPases;

-Determinar a concentração dos íons Na^+ e K^+ no interior do intestino médio abdominal em fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue (intestino alcalino);

-Medir o pH no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal em fêmeas de *L. longipalpis* infectadas com *L. infantum* durante e após a digestão do repasto sanguíneo infectante;

-Comparar o tempo gasto para a eliminação do bolo fecal entre fêmeas de *L. longipalpis* infectadas com *L. infantum* e fêmeas não infectadas, utilizando insetos alimentados em cães (*Canis familiaris*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção de *Lutzomyia longipalpis*

Em todos os experimentos, foram utilizadas fêmeas de *L. longipalpis* mantidas no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

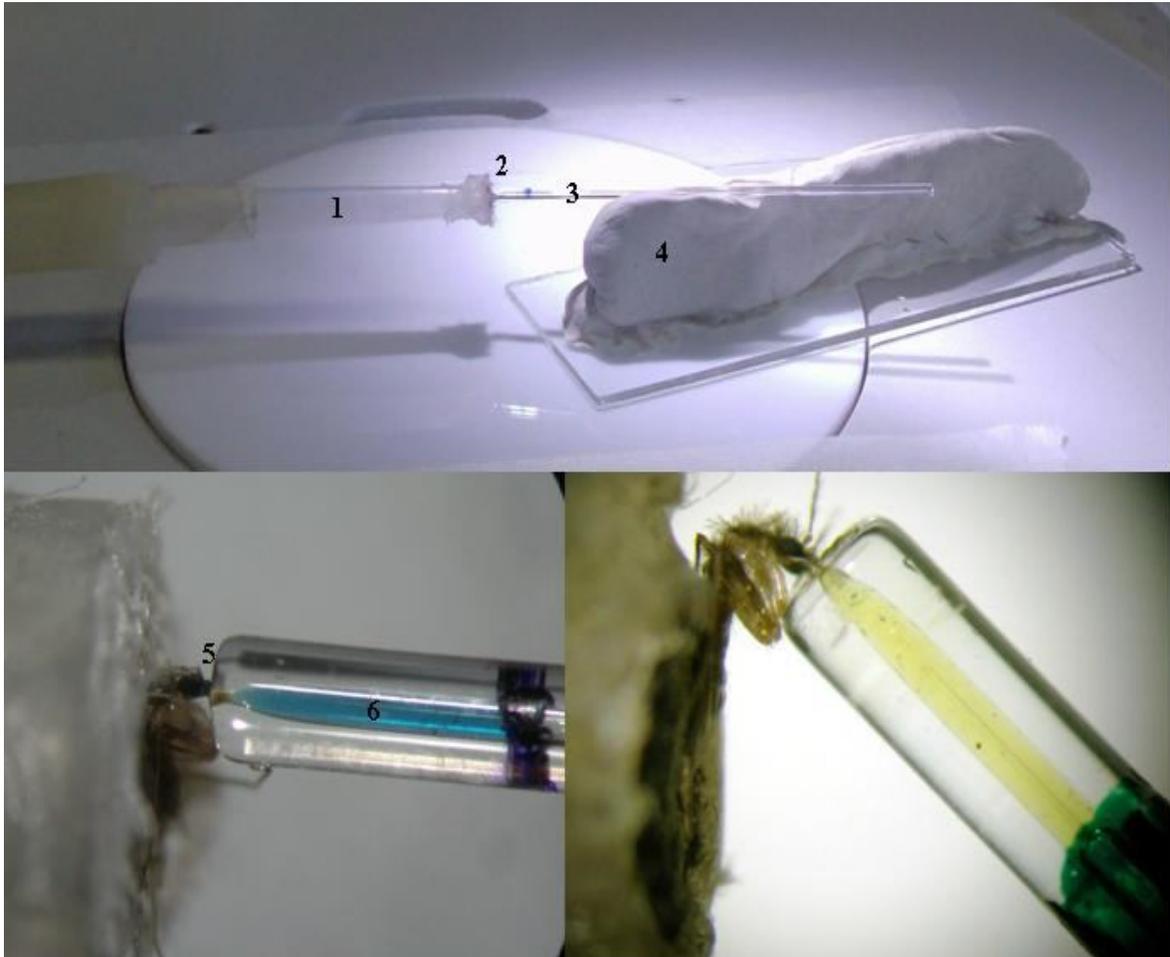
No insetário, as larvas (L1 a L4) de *L. longipalpis* foram criadas em recipientes plásticos contendo gesso como substrato (Modi e Tesh, 1983), e alimentadas com uma ração contendo húmus de minhoca e fezes de coelho. Recipientes contendo larvas mais maduras (L2) receberam complementação alimentar com Neston (Nestlé ®) misturado a farinha de germe de trigo (1/1). Os adultos, machos e fêmeas foram mantidos em gaiolas de náilon, e alimentados com sacarose a 30%. As fêmeas fizeram o repasto sanguíneo em hamsters (*Mesocricetus auratus*) anestesiados com Thiopental® (0,2ml/100g). Os flebotomíneos foram mantidos num ambiente à 25°C, com umidade relativa do ar variando entre 65 e 70%.

No início de todos os testes, as fêmeas tinham entre 2 e 5 dias de idade, e foram alimentadas, ou permaneceram em jejum, de acordo com os requisitos de cada experimento.

4.2 Estudo do efeito da presença de aminoácidos, peptídeos e proteínas na desativação da manutenção do pH 6,0 e ativação do mecanismo de alcalinização no intestino de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* não alimentadas com sangue

A presença do sangue no intestino médio abdominal de *L. longipalpis* é capaz de provocar uma expressiva alcalinização neste local (Santos et al., 2008). De acordo com a hipótese do presente trabalho, o aumento significativo de pH intestinal observado seria consequência da desativação do mecanismo que mantém o pH 6 e também de um processo ativo de alcalinização independente do mecanismo de volatilização do CO₂. Para compreender melhor como ocorre essa

desativação da manutenção do pH 6, foi investigado se substâncias presentes no sangue humano (como aminoácidos, peptídeos, albumina e o próprio soro) poderiam atuar como moléculas sinalizadoras neste processo. O método da alimentação forçada foi proposto pela primeira vez por Hertig e McConel em 1963 e, após adaptações, foi amplamente utilizado por Santos e colaboradores (2008) para a demonstração do mecanismo de manutenção do pH 6 em insetos não alimentados com sangue. Este método se baseia no fato de que, quando as peças bucais de um flebotomíneo são inseridas em um capilar (com a ponta estreitada numa chama), ocorre o disparo de um reflexo que o obriga a ingerir o líquido contido no interior do capilar. Durante os experimentos, as fêmeas foram imobilizadas e mantidas na extremidade de uma ponteira de plástico coberta de tecido, por meio de uma suave sucção proporcionada por uma bomba de vácuo elétrica (**Fig. 3**).



- 1 - Ponta ligada a uma bomba de vácuo
- 2 - Local onde o inseto permanece imobilizado
- 3 - Microcapilar de vidro
- 4 - Massa de modelar
- 5 - Inserção da peça bucal no microcapilar
- 6 - Solução a ser ingerida

Figura 3 - Alimentação forçada de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

Através da alimentação forçada, os flebotomíneos foram obrigados a ingerir Soluções Fisiológicas para Insetos (SFI) - NaCl 119,7 mM; KCl 2,68mM; CaCl₂ 1,36mM; glicose 0,56mM (Sunitha et al. 1999) - acrescidas do corante indicador de pH azul de bromotimol 0,1% (pKa = 7,0), e das substâncias cujo efeito no pH intestinal seria investigado. Desta maneira, fêmeas privadas de alimento pelo menos por 2 dias se alimentaram com SFI tamponada por HEPES 30 mM em pH 7,4 contendo vários 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) em uma concentração final de 5,0 mM (0,08%). Esta concentração de aminoácidos é próxima àquela encontrada no sangue humano, que varia entre 2,5 e 9,1 mM de acordo com as publicações consultadas (Adibi e Mercer, 1973; Baertl et al., 1974; Delaporte et al., 1978; Maclean et al., 1983). A solução com aminoácidos utilizada nos experimentos foi preparada a partir da diluição da “MEM amino acids solution” (SIGMA, M-5550) em SFI. Essa mesma solução também foi testada sem diluição, apenas com a adição do corante azul de bromotimol, permitindo verificar o efeito dos mesmos aminoácidos supracitados, em uma concentração final maior, correspondente a 172 mM (2,8%). Como controle para esses experimentos, um grupo de fêmeas foi alimentado com SFI tamponada em pH 7,4 com HEPES 30 mM (pKa = 7,55) ou SFI sem tamponamento. Também foram realizados testes com aminoácidos a 5 mM (0,08%) em SFI com o pH ajustado em pH 6,0 contendo ou não tampão MES 30mM (pKa = 6,15). No grupo controle, os insetos ingeriram SFI tamponada em pH 6,0, com MES 30 mM ou SFI sem tamponamento.

Imediatamente após a ingestão das soluções contendo o indicador de pH azul de bromotimol, as fêmeas foram dissecadas, e seus tubos digestivos foram examinados sob microscópio estereoscópico. A medida do pH foi realizada através da observação da cor adquirida pelo corante no interior do tubo digestivo, que era comparada com soluções-padrão do corante em pHs conhecidos (Gontijo et al., 1998; Santos et al., 2008).

Conforme a metodologia anterior, foi testado o efeito da ingestão de peptídeos, da soroalbumina, da lisozima e do soro humano na regulação do pH no intestino médio. Para os testes com peptídeos, as fêmeas foram alimentadas com SFI acrescida de peptona bacteriológica 1% (Biobrás, 1772) em pH 6,0 ou peptona 2% em pH 7,4 sem tamponamento.

Além da peptona, soroalbumina bovina (Sigma, A3059-50G) 5% dissolvida em SFI em pH 6,0 ou pH 7,4 sem tamponamento, foi utilizada em experimentos nos quais ela era ingerida pelos flebotomíneos, para verificar se essa abundante proteína do soro humano (50mg/mL) (Lewis, 1996), teria influência na regulação do pH intestinal. Para avaliar se o disparo da alcalinização seria provocado exclusivamente pela albumina presente no soro, ou se outras proteínas teriam esse mesmo efeito, um grupo de fêmeas foi alimentado com lisozima (Sigma, L7651-5G) a 5% em SFI com pH ajustado para pH 6,0 ou pH 7,4 (sem tamponamento). Para investigar melhor o papel das proteínas no controle do pH, as fêmeas foram alimentadas com SFI contendo caseína 5% em pH 7,4 não tamponado (a caseína é insolúvel em pH 6,0). À semelhança da lisozima, a caseína também não faz parte da dieta dos flebotomíneos. O grupo controle nesses experimentos foi formado por insetos que ingeriram apenas SFI sem tamponamento contendo corante indicador de pH.

Complementarmente, foi testado o efeito da ingestão de soro humano, soroalbumina, e lisozima, mas nestes experimentos, o soro e as proteínas foram tamponados em pH 6,0 com MES 30mM antes de serem introduzidos no intestino médio dos flebotomíneos. Os pHs medidos nestes experimentos foram comparados com os pHs observados após a ingestão de soro humano, soroalbumina, e lisozima sem tamponamento.

Para verificar se uma proteína parcialmente digerida teria o mesmo efeito da sua forma íntegra no pH intestinal do flebotomíneo, a lisozima foi escolhida para ser digerida com ácido fórmico, através de uma metodologia adaptada de Li *et al.* (2001): Em um tubo para microcentrífuga de 1,5mL (Axygen® MCT-150c), foram misturados lisozima a 5% e ácido fórmico a 4% para um volume total de 1,0 mL de água destilada. O tubo contendo a mistura foi

vedado, aquecido a 100° C, e mantido sob agitação durante 4h em um termobloco (VHD Techne/Analítica®) do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do ICB - UFMG. Para verificar a eficiência da digestão pelo ácido fórmico, lisozima digerida (1,0 µg) e lisozima íntegra (1,0 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) por 1h e 30 minutos à 140V. O gel foi corado pelo método do nitrato de prata e fotografado. Posteriormente, o produto da digestão da lisozima foi secado utilizando-se uma centrifuga evaporadora a 55° C durante 2h, para a retirada da água e do ácido fórmico. Antes dos experimentos, a lisozima digerida era redissolvida em SFI tamponada com MES 30 mM em pH 6,0. Durante os experimentos, os insetos eram forçados a ingerir primeiramente o corante azul de bromotimol 0,1% em SFI, seguido da solução com a lisozima digerida, devido à baixa solubilidade do corante no produto de digestão da lisozima (o corante interage com os peptídeos formados e precipita). Após a ingestão da lisozima digerida e do corante, o pH no interior do intestino era medido através da cor adquirida pelo indicador de pH. O grupo controle nesse experimento era formado por insetos que ingeriram SFI tamponada com MES 30 mM pH 6 misturada ao corante. Os pHs intestinais medidos após alimentação dos flebotomíneos com lisozima digerida foram comparados com os pHs observados após ingestão de lisozima íntegra.

Em todos esses experimentos, a proporção de intestinos que se alcalinizaram para pHs maiores ou iguais a 6,5 ($\text{pH} \geq 6,5$) nos grupos tratados era comparada com a proporção de intestinos com $\text{pH} \geq 6,5$ observada nos respectivos grupos controle, através do teste de proporções de Fisher. pHs intestinais maiores ou iguais a pH 6,5 foram considerados alcalinizados, e as proporções entre testes e controles foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$.

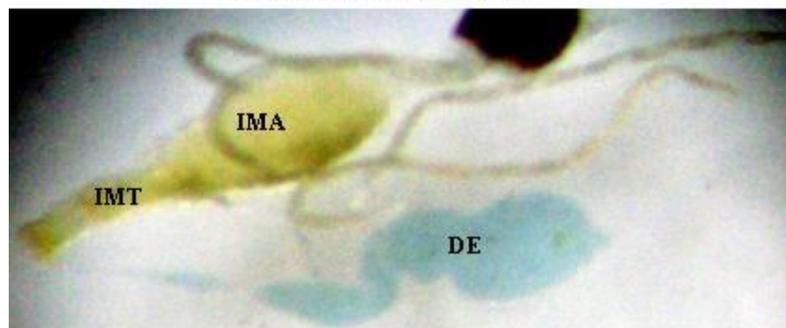
A enzima anidrase carbônica poderia participar do processo de alcalinização através do fornecimento de íons bicarbonato para serem transportados para o lúmen intestinal. Assim, a participação da anidrase carbônica no processo de alcalinização do intestino médio após a ingestão de proteínas também foi investigada. Utilizou-se a alimentação forçada para fazer as

fêmeas ingerirem uma solução de lisozima a 5%, dissolvida em SFI tamponada (pH 6) com MES 30mM e azul de bromotimol 0,1% contendo (teste) ou não (controle) a acetazolamida a 1,0mM, um conhecido inibidor da atividade da anidrase carbônica. O pH alcançado pelas soluções no tubo digestivo foi medido através da cor adquirida pelo azul de bromotimol. As proporções de intestinos que foram alcalinizados para os intervalos $\text{pH} < 7,0$ e $\text{pH} \geq 7,0$ foi comparada entre o grupo controle e o grupo tratado com acetazolamida através do teste de Fisher (as proporções foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$).

Além de testar o efeito da ingestão da albumina e da lisozima no pH intestinal, foi testado se estas proteínas teriam o mesmo efeito, quando aplicadas pelo lado de fora de intestinos médios dissecados. Para tal, o corante azul de bromotimol 0,1% em SFI não tamponada foi introduzido no tubo digestivo dos flebotomíneos por meio da alimentação forçada (descrita no primeiro parágrafo deste item). Após a ingestão desta solução, o próprio flebotomíneo se encarrega de ajustar o pH para pH 6 no intestino médio, conforme observado em experimentos preliminares. Os insetos foram então dissecados, e seus tubos digestivos colocados sobre um pequeno pedaço de gel de agarose 2% preparado com SFI, para evitar o ressecamento do intestino durante o experimento.

Três microlitros de lisozima ou albumina a 5% em SFI foram gotejados diretamente em cima dos intestinos médios que se encontravam em pH 6, e possíveis mudanças de pH no interior do intestino foram avaliadas por 5 minutos através da mudança de cor do corante azul de bromotimol (**Fig. 4**). No grupo controle, gotejava-se somente SFI sobre os intestinos. A proporção de intestinos que mantiveram $\text{pH} \leq 6,0$ após aplicação de SFI (controle) foi comparada com a proporção de intestinos que mantiveram $\text{pH} \leq 6,0$ após aplicação da proteína (teste) através do teste de Fisher (as proporções foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$).

Intestino dissecado



IMT - Intestino médio torácico
IMA - Intestino médio abdominal
DE - Divertículo esofágico

Corante azul de bromotimol

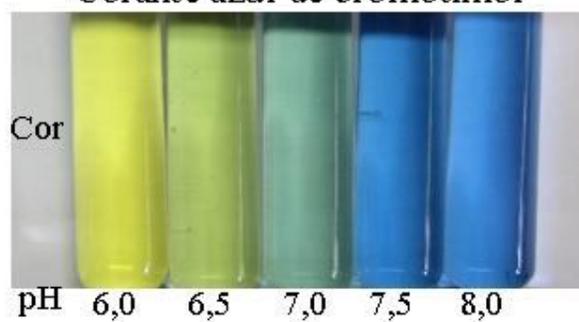


Figura 4 - Intestino de fêmea alimentada com solução contendo o corante azul de bromotimol e soluções do corante em pHs conhecidos

Através de alimentação forçada, fêmeas ingeriram também soro humano total e soro humano dialisado. A diálise permitiu que fossem retiradas do soro, todas as moléculas pequenas tais como aminoácidos, glicose, etc. permanecendo apenas as macromoléculas. O soro foi obtido a partir de sangue de voluntários, sendo que foram coletados 10mL de sangue de cada doador, utilizando-se agulhas e seringas descartáveis não heparinizadas. O sangue permanecia em repouso em tubos de ensaio por 2h para coagular espontaneamente. Após esse período, o sangue era centrifugado a 806g durante 15 minutos e armazenado à -20°C. A diálise exaustiva do soro foi feita em 400 mL de SFI (cinco trocas) através de uma membrana com limite de exclusão de 12 kDa (SIGMA-ALDRICH, 00405100PT).

Antes da alimentação forçada, o corante azul de bromotimol a 0,1% era adicionado ao soro (total ou dialisado), e o pH era ajustado para pH 6,0 ou pH 7,4 com adição de HCl ou NaOH diluídos em SFI. As proporções de intestinos alcalinizados para $\text{pH} \geq 6,5$ observadas em insetos alimentados com soro total foram comparadas com aquelas observadas em insetos que ingeriram somente SFI através do teste de proporções de Fisher. Este teste estatístico também foi utilizado para comparar as proporções de pH observadas em fêmeas que ingeriram soro total com aquelas observadas em fêmeas alimentadas com soro dialisado (as proporções foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$).

4.3 Estudo do possível papel de hormônios no controle do pH do intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

Para verificar se além dos nutrientes da dieta, a liberação de peptídeos ao nível das células intestinais de *L. longipalpis* também estaria envolvida na regulação do pH, intestinos médios de fêmeas de 3 a 4 dias de idade alimentadas somente com sacarose foram dissecados e submetidos ao seguinte protocolo para extração de peptídeos das suas células endócrinas (adaptado de Sunitha et al., 1999): Imediatamente após a dissecação em SFI, os intestinos foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 0,5mL (contendo SFI acrescida de EDTA 2,0 mM para uma

concentração final de 3 intestinos/ μL) e fervidos a 100°C durante 10 minutos para inativar proteases e precipitar as proteínas presentes. O material foi resfriado em gelo e sonicado por 10 minutos num sonicador de banho para facilitar a solubilização dos pequenos peptídeos. A preparação foi então agitada num vortex por 10 minutos para homogeneização e submetida à centrifugação por 10 minutos a $10.000g$ a 4°C . O sobrenadante foi armazenado a -20°C até a utilização.

Intestinos de fêmeas alimentadas com SFI não tamponada contendo azul de bromotimol foram dissecados sob microscópio estereoscópico, e colocados sobre um gel de agarose 2% embebido em SFI para evitar o ressecamento do intestino durante o experimento. Um microlitro do extrato de intestino obtido previamente foi gotejado diretamente sobre as preparações de intestinos (que se encontravam inicialmente no pH 6,0). O comportamento do pH no interior do intestino era acompanhado durante 5 minutos, através da visualização de qualquer mudança de cor do indicador de pH azul de bromotimol. Como controle, um grupo de fêmeas foi submetido ao mesmo protocolo descrito neste parágrafo, mas sobre seus intestinos inicialmente ácidos, foi aplicado $1,0\ \mu\text{L}$ de SFI sem o extrato intestinal. Qualquer elevação do pH para além do pH 6 foi considerada como mudança provocada pelo tratamento. A proporção de intestinos que mantiveram $\text{pH} \leq 6,0$ após aplicação de SFI (controle) foi comparada com a proporção de intestinos que mantiveram $\text{pH} \leq 6,0$ após aplicação do extrato (teste) através do teste de Fisher (as proporções foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$).

O efeito do hormônio serotonina (5-hidroxitriptamina) sobre o pH intestinal foi avaliado utilizando-se uma metodologia semelhante à aplicada na avaliação do efeito do extrato intestinal. Nestes experimentos, serotonina sintética (SIGMA, H9523) foi dissolvida em SFI para uma concentração final de $100\ \mu\text{M}$, e aplicada diretamente em intestinos em duas situações fisiológicas: fêmeas alimentadas com SFI, cujos intestinos mantêm o intestino acidificado (pH 6,0), e fêmeas alimentadas com soroalbumina bovina 5% (os intestinos se alcalinizam até $\text{pH} \sim 7,4$). Os resultados obtidos nos grupos controles (pH intestinal após aplicação de SFI) e nos

testes (pH intestinal após aplicação da serotonina) foram comparados através do teste de Fisher (as proporções foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$).

4.4 Estudo da participação do AMPc e do Ca^{2+} na regulação do pH intestinal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

As mesmas preparações descritas no item 4.3 foram utilizadas para avaliar a participação de AMPc na regulação do pH. Os intestinos dissecados em qualquer um dos dois estados fisiológicos (acidificado e alcalinizado) foram colocados sobre um gel de agarose 2% preparado com SFI. Sobre as preparações, foi aplicada SFI contendo um inibidor (2'-5' dideoxyadenosine 1,0 mM - Calbiochem, 288104) e um ativador (Forskolin, 100 μ M Sigma, F6886-10MG) da adenilato ciclase. Esta enzima é a responsável pela formação de AMPc a partir de ATP, e utilizando um inibidor e um ativador de tal enzima, foi possível estudar, respectivamente, o efeito da diminuição e do aumento do AMPc nas células intestinais do flebotomíneo. Também foi testado o efeito da aplicação direta de AMPc 10mM em intestinos ácidos ou alcalinos. Este teste permitiu verificar se a entrada repentina de AMPc no interior das células intestinais teria algum efeito na regulação do pH no tubo digestivo do inseto.

Para verificar se o aumento do Ca^{2+} intracelular teria alguma influência na regulação do pH intestinal, foi testado o efeito de calcimicina (Fluka, A23187) a 4,0 μ M em intestinos ácidos ou alcalinos. A calcimicina é um ionóforo que transporta Ca^{2+} para o interior das células, aumentando sua concentração citoplasmática. Como os testes foram realizados em SFI, que contém Ca^{2+} livre, foi possível avaliar o efeito da alteração da concentração intracelular deste íon no controle do pH intestinal do flebotomíneo.

Os pHs alcançados no intestino médio após aplicação de dideoxiadenosina, forskolin, AMPc ou calcimicina (testes) foram comparados com os pHs de intestinos que receberam

aplicação de SFI pura (controles) através do teste de Fisher (as proporções foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$).

4.5 Estudo do mecanismo responsável pelo controle do pH intestinal em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* não alimentadas com sangue utilizando um inibidor de H^+ V-ATPases

O efeito do nitrato de potássio - KNO_3 (inibidor de H^+ V-ATPases) foi testado utilizando-se duas metodologias: (1) o inibidor era ingerido pelos flebotomíneos, e era observado se ocorria alteração na manutenção do pH 6,0 no lúmen intestinal devido à inibição do transporte de prótons entre a membrana apical e o lúmen do intestino; (2) o KNO_3 era aplicado diretamente sobre intestinos em duas diferentes condições fisiológicas: intestinos com o mecanismo de acidificação ativo (pH 6,0 antes da adição do inibidor), e intestinos com mecanismo de acidificação desativado e mecanismo de alcalinização ativado (pH antes da adição do inibidor: pH~7,4). Com a segunda metodologia, pretendeu-se verificar o efeito da inibição das bombas de prótons possivelmente localizadas na membrana basal das células intestinais, que têm contato com a hemolinfa do inseto. As duas metodologias são detalhadas a seguir.

Para verificar o efeito da ingestão do nitrato de potássio na manutenção do pH intestinal, este inibidor de H^+ V-ATPases foi preparado a 100mM em SFI tamponada com MES 160mM no pH 5,0, e após a adição do corante púrpura de bromocresol ($pK_a = 5,2$) 0,1%, a solução foi introduzida no tubo digestivo de flebotomíneos por meio da alimentação forçada (descrita no item 4.2). Com esta mesma metodologia, os flebotomíneos foram obrigados a ingerir o nitrato de potássio 100mM em SFI, mas neste caso, tamponado com HEPES 160mM no pH 7,5. Os insetos dos grupos controle se alimentaram das mesmas soluções, mas estas não continham o inibidor. Em ambos os casos, os intestinos foram dissecados, e foi observada, através do indicador de pH, a proporção de intestinos que tiveram a capacidade de ajustar o pH inicial da solução (pH 5,0 ou pH 7,5) para pH 6,0. As proporções de pHs medidos no grupo teste e no grupo controle foram

comparadas através do teste de Fisher (as proporções foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$).

Para verificar o efeito da adição externa do nitrato de potássio em intestinos já acidificados ou alcalinizados previamente, foram feitas preparações de intestinos de insetos alimentados ou com SFI (pH é acidificado) ou com Soroalbumina (pH é alcalinizado) assim como as descritas no item 4.3. Após dissecação dos flebotomíneos, três microlitros de KNO_3 100mM em SFI eram gotejados diretamente em cima dos intestinos médios que se encontravam em pH 6,0 ou pH 7,4, e as mudanças de pH no interior do intestino foram avaliadas, em cada caso, pela mudança de cor do corante ingerido. No grupo controle, gotejava-se SFI sem o inibidor sobre os intestinos que se encontravam ácidos ou alcalinos. A proporção de pHs que se mantiveram no pH inicial ou que sofreram alteração após aplicação do KNO_3 (teste) foram comparadas com a proporção observada após aplicação de SFI (controle) através do teste de Fisher (as proporções foram consideradas diferentes quando $p < 0,05$).

4.6 Determinação da concentração dos íons Na^+ e K^+ no conteúdo alimentar do intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com sangue

A mesma tecnologia de construção de microeletrodos (Gibbon e Kropf, 1993) adaptada por Santos et al. (2008) para medir a concentração de íons H^+ no intestino de *L. longipalpis* (descrita a seguir) foi utilizada para medir as concentrações normais dos íons Na^+ e K^+ no intestino médio abdominal de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas com sangue.

4.6.1 Preparo dos Microeletrodos Na^+ e K^+ sensíveis

Capilares de vidro para micro-hematócrito (diâmetro interno de 1,0 mm) foram estirados em uma microforja (PP-83, Narishge®, Japan) de maneira a obter-se micropipetas com pontas

suficientemente finas para serem introduzidas no intestino médio dos flebotomíneos. As micropipetas tiveram as pontas polidas em microforja (Beaudouin[®], França), e foram utilizadas para confecção de dois tipos de microeletrodos: um microeletrodo de referência, e um microeletrodo condutor de íons. Os microeletrodos de referência receberam na ponta, 0,5µL de solução de agarose 0,2% em KCl 3,0M. Após a gelificação da agarose, estes microeletrodos foram preenchidos com KCl 3,0M. Os microeletrodos condutores de íons Na⁺ e K⁺ receberam na ponta, 0,3µL de ionóforo para Na⁺ (Sodium Ionophore II Cocktail A, Fluka 71178) e para K⁺ (Potassium Ionophore I Cocktail A, Fluka 60031), respectivamente. Os ionóforos eram dissolvidos em 0,7µL de PVC 0,075% em tetraidrofurano. Quando o solvente tetraidrofurano se evaporava, o PVC formava uma camada porosa e resistente que servia para manter o ionóforo na ponta da micropipeta. O tetraidrofurano era secado a vácuo durante sete dias no interior de um dessecador. Imediatamente antes de serem utilizados, os microeletrodos eram preenchidos com tampão MES 0,1M, pH ajustado em pH 4,3 com TRIS 0,5M.

Para cada experimento, um par de microeletrodos era encaixado em suportes ligados a fios de prata (cloretados com uma camada de cloreto de prata) soldados em fios condutores. Os dois microeletrodos eram montados em micromanipuladores de modo que podiam ser inseridos no tubo digestivo de fêmeas não dissecadas para medir a concentração de íons no lúmen intestinal. Os fios dos microeletrodos eram conectados a um voltímetro de alta impedância (pH Meter 26-Radiometer[®], Copenhagen) que mede diferença de potencial (voltagem). A montagem do aparato com os microeletrodos está representada na **figura 5**.

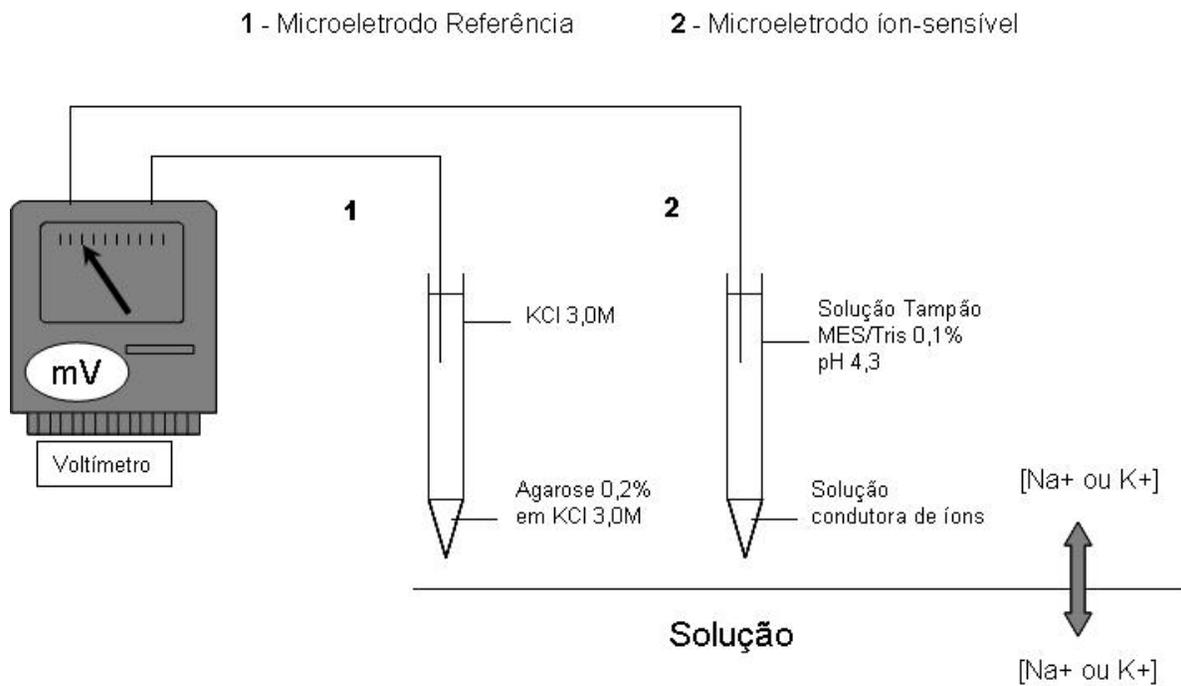


Figura 5 - Esquema do aparato para medida de concentrações de íons no intestino médio abdominal de *Lutzomyia longipalpis*

Quando os dois microeletrodos eram mergulhados simultaneamente em uma solução com uma determinada concentração dos íons Na^+ e K^+ , ocorria o transporte destes entre a solução, e o interior do microeletrodo condutor de íons, gerando uma diferença de potencial (ddP). Esta ddP podia ser medida em milivolts, e era proporcional à concentração dos íons na solução onde os eletrodos estavam mergulhados. Antes das medidas no lúmen intestinal, os microeletrodos eram calibrados em soluções-padrão com concentrações de Na^+ e K^+ conhecidas (em mM). Com os dados assim gerados, construía-se uma curva de calibração relacionando a concentração dos íons na solução-padrão (mM), com a ddP (mV) alcançada em cada medida. Quando o microeletrodo era mergulhado no tubo digestivo de uma fêmea (um meio de concentrações desconhecidas), a curva de calibração (milimolar x voltagem) podia ser usada para calcular a concentração dos íons Na^+ e K^+ neste local. Só foram consideradas válidas as medidas feitas com microeletrodos que mantinham a mesma calibração (com variação máxima de 5%) antes e depois de efetuadas as medidas.

4.6.2 Medida das concentrações dos íons Na^+ e K^+ no intestino médio de *L. longipalpis* alimentadas com sangue

Para as medidas em flebotomíneos durante a digestão do repasto sanguíneo, fêmeas de 4 dias de idade foram alimentadas com sangue de hamsters (*M. auratus*) anestesiados com Tiopental sódico (0,2ml/100g). Entre zero e 4h, e entre 24 e 50h após a ingestão do repasto sanguíneo, microeletrodos montados em micromanipuladores foram introduzidos diretamente no intestino médio abdominal das fêmeas ingurgitadas de acordo com Billker e colaboradores (2000) (**Fig. 6**).



1 - Gel suporte para o Flebotômico

Figura 6A - Montagem dos microeletrodos em micromanipuladores



1 - Microeletrodo de Referência
2 - Microeletrodo Íon-sensível

Figura 6B - Introdução dos microeletrodos no intestino médio abdominal de fêmea de *Lutzomyia longipalpis* ingurgitada

Como controle para as medidas dos íons no intestino médio abdominal, microeletrodos foram utilizados para medir as concentrações de Na^+ e K^+ do sangue exposto ao ambiente entre zero e 4h, e entre 24 e 50h após coleta. As concentrações de sódio e potássio no lúmen intestinal do flebotomíneo e no sangue exposto foram calculadas através da equação gerada pelas respectivas curvas de calibração dos microeletrodos, conforme descrito no item **4.6.1**.

As concentrações médias dos íons no sangue no interior dos intestinos ingurgitados foram comparadas com aquelas observadas no sangue exposto ao ambiente através do teste t de Student. Através deste teste, também foram comparadas as concentrações de Na^+ e K^+ no sangue em tempos diferentes após a ingestão pelo flebotomíneo ou após a coleta.

4.7 Medida do pH no intestino médio abdominal e no intestino médio torácico de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas com *Leishmania infantum* durante e após a digestão do repasto sanguíneo

4.7.1 Infecção de *Lutzomyia longipalpis* com *Leishmania*

Um cão naturalmente infectado (exames sorológico e parasitológico positivos), cedido pelo Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão das Neves, região metropolitana de Belo Horizonte- MG, foi o animal utilizado como fonte de infecção para os flebotomíneos. Este cão era do sexo feminino, sem raça definida, e teve o peso variando entre 16 e 18 Kg ao longo dos experimentos. O animal se mostrou clinicamente bem, apesar de terem sido observados alguns sinais clínicos externos típicos da leishmaniose canina, como alopecia, crescimento excessivo das unhas, e descamação da pele.

Logo após chegar ao canil do departamento de parasitologia (ICB-UFMG), o cão foi vermifugado, tratado com anti-parasitário externo, e observado durante quarenta dias. Após este período, foram realizados no cão, três testes (xenodiagnósticos) preliminares, para verificar sua

capacidade de infectar os flebotomíneos provenientes da criação mantida no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), Instituto de Ciências Biológicas - UFMG. Durante os xenodiagnósticos, foram examinados 105 flebotomíneos. 96% destes insetos se encontravam infectados, e 88% apresentaram mais de 100 promastigotas no intestino (Silva, S.M, 2009, comunicação pessoal). Desta forma, o cão foi selecionado como fonte de infecção das fêmeas de *L. longipalpis* para os experimentos.

Para a infecção, fêmeas de 2 a 4 dias de idade oriundas da colônia do LFIH, foram separadas em recipientes plásticos cobertos com uma tela fina, através da qual se alimentaram na orelha do cão. Antes da exposição para o repasto dos flebotomíneos, o cão foi anestesiado com uma combinação de Ketamina 22mg - Xilazina 1,1mg por quilograma do animal, e a parte interna de sua orelha foi previamente depilada e lavada com solução fisiológica (**Fig. 7**). O recipiente plástico contendo os flebotomíneos foi mantido pressionado contra a orelha do cão durante 35 minutos, tempo suficiente para os insetos se ingurgitarem de sangue (**Fig. 8**).

Logo após o repasto sanguíneo, os insetos foram realocados em gaiolas de náilon, e isolados do restante da colônia de flebotomíneos em uma caixa de isopor, onde se alimentaram de sacarose 30% até o uso nos experimentos de medida do pH intestinal.

Em exames preliminares realizados, foi verificada uma presença considerável de promastigotas no intestino dos flebotomíneos, somente 30h após o repasto sanguíneo infectante. Assim, as medidas do pH intestinal foram realizadas sempre entre 30 e 55h após o repasto, período suficiente para as formas promastigotas se reproduzirem, mas não suficiente para a eliminação dos restos de sangue.



Figura 7 - Anestesia e preparo do local para o repasto sanguíneo de *Lutzomyia longipalpis*



1 - Recipiente plástico contendo fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

Figura 8 - Repasto sanguíneo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* em orelha de cão

4.7.2 Medidas de pH no intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* infectadas com *Leishmania*

O pH no intestino médio abdominal (durante a digestão do sangue) em fêmeas infectadas foi medido através de microeletrodos, cuja confecção e montagem foram realizadas da mesma maneira descrita no item 4.6.1. No entanto, para as medidas de pH, o microeletrodo íon sensível foi preparado com um condutor H⁺ específico (FLUKA®), que era calibrado em soluções-tampão de pHs conhecidos (pHs entre 6,0 e 8,5). A inserção dos microeletrodos H⁺ sensíveis no intestino médio abdominal das fêmeas infectadas foi realizada exatamente como descrito no item **4.6.2 (Fig. 6)**.

O pH no lúmen intestinal dos flebotomíneos foi calculado através da equação gerada pela curva de calibração dos microeletrodos nas soluções de pH conhecidos.

Ao término da digestão do sangue, com a eliminação dos restos não digeridos, o volume interno do intestino diminui muito, o que torna difícil o uso de microeletrodos para a medida de pH. Nestas condições, a medida do pH no intestino médio abdominal foi feita entre 5 e 9 dias após o repasto infectante, utilizando-se o corante indicador de pH Azul de Bromotimol (pKa = 7,0). Este corante era dissolvido em solução de sacarose 30%, e oferecido às fêmeas embebido em algodão 40h após a infecção. Vinte e quatro horas após se alimentarem naturalmente com o corante, as fêmeas tiveram seus intestinos dissecados, e o pH foi medido comparando-se a cor adquirida pelo corante no interior do tubo digestivo com a cor de soluções-padrão do azul de bromotimol em pHs conhecidos (Gontijo et al., 1998; Santos et al., 2008).

Na porção torácica do intestino médio, o pH (durante ou após a digestão do repasto sanguíneo) foi medido sempre através da ingestão de corantes indicadores de pH, devido à dificuldade de introduzir-se microeletrodos nessa parte estreita do intestino (Santos et al., 2008).

Imediatamente após a medida do pH nos intestinos de fêmeas infectadas (durante e após a digestão do sangue) eram preparadas lâminas com o conteúdo intestinal. As lâminas eram examinadas “a fresco” sob microscópio óptico, e os dados referentes à medida de pH eram

considerados somente após a confirmação da presença da infecção por *Leishmania*. No grupo controle, microeletrodos foram utilizados para medir o pH no intestino médio abdominal de fêmeas alimentadas com sangue de hamsters não infectados por *Leishmania*. Os dados assim obtidos, foram acrescentados aos resultados observados por Santos e colaboradores (2008), que mediram o pH intestinal em fêmeas de *L. longipalpis* não infectadas, nas mesmas condições do presente trabalho. Os pHs medidos no intestino médio das fêmeas de *L. longipalpis* infectadas com *Leishmania* durante a digestão do sangue foram comparados com os valores de pH observados por Santos et al. (2008) em fêmeas não infectadas. Para a análise estatística, foi aplicado o teste t de Student.

4.8 Observação do tempo de eliminação dos restos de sangue não digeridos em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas com *Leishmania infantum* e em fêmeas não infectadas

Para verificar se a presença de *Leishmania* no intestino poderia atrasar a digestão do sangue ingerido pelos flebotomíneos, dois grupos de fêmeas de três dias de idade foram alimentados em cães, utilizando-se a mesma metodologia descrita no item 4.7.1. O primeiro grupo se alimentou no mesmo cão infectado utilizado para as medidas de pH intestinal (ver item 4.7.1). Simultaneamente, um segundo grupo de fêmeas foi alimentado num cão não infectado. Foi confirmado, visualmente, que todos os insetos se ingurgitaram completamente com o sangue dos cães. Esta observação já era esperada, uma vez que se trata de um grupo homogêneo de flebotomíneos (provenientes da colônia implantada a três anos no LFIH). Entre 73 e 76 horas após o repasto, as fêmeas dos dois grupos foram dissecadas, e foi observado em microscópio estereoscópico, se em seus intestinos ainda havia sangue, ou se os restos alimentares já haviam sido eliminados após o término da digestão. Imediatamente após a observação dos intestinos dissecados, os conteúdos intestinais eram levados ao microscópio óptico para verificar presença ou ausência de *Leishmania*. Através do teste de Fisher, as proporções de intestinos que ainda

apresentavam sangue entre 73 e 76 horas após o repasto foram comparadas entre o grupo de insetos infectados (teste) e o grupo de insetos não infectados (controle).

Os cães utilizados nos experimentos dos itens **4.7** e **4.8** foram cedidos por colaboradores participantes do projeto “Avaliação da eficácia de um protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao uso contínuo de alopurinol, em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*” aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (n^o 211/2007).

4.9 Análise estatística

Para a comparação entre a distribuição dos dados em diferentes intervalos de pHs, foi utilizado o teste de proporções de Fisher. O teste T de Student foi aplicado para a comparação direta entre as médias dos dados que apresentaram distribuição normal. Em ambos os testes, as diferenças foram consideradas significativas com o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Estímulos responsáveis pela alcalinização no intestino médio em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* não alimentadas com sangue

Para verificar se algum nutriente presente na dieta das fêmeas de *L. longipalpis* seria capaz de desativar a manutenção do pH 6,0 no intestino médio e disparar a alcalinização, foi testado se ocorria alguma alteração na manutenção do pH 6,0 em fêmeas alimentadas com diferentes substâncias encontradas no sangue ingerido (aminoácidos, peptídeos, proteínas, e soro).

Primeiramente, foi verificado se a presença, e conseqüente absorção de aminoácidos livres pelo intestino médio abdominal seria responsável pela mudança fisiológica provocada após a ingestão de sangue. Para tal, os insetos foram obrigados a ingerir Solução Fisiológica para Insetos (SFI) tamponada em pH 7,4 contendo ou não aminoácidos a 5 mM (0,08%). Esta é uma concentração próxima daquela normalmente encontrada no sangue de humanos, de acordo com vários autores (Adibi e Mercer, 1973; Baertl et al., 1974; Delaporte et al., 1978; Maclean et al., 1983). Os valores de pH observados foram divididos em dois intervalos de pHs distintos ($\text{pH} < 6,5$ e $\text{pH} \geq 6,5$) (**Quadro 1A**). pHs menores do que 6,5 corresponderam a uma acidificação eficiente do intestino, levando-se em consideração que, na ausência do repasto sanguíneo, o pH intestinal é mantido próximo de pH 6,0 (Santos et al., 2008). pHs maiores ou iguais a 6,5 indicavam que a substância testada foi capaz de interferir na acidificação do pH intestinal, mantendo-o acima do pH esperado para um inseto sem o repasto sanguíneo (Santos et al., 2008). Os flebotomíneos também foram alimentados com SFI não tamponada em pH 6,0 (contendo ou não aminoácidos a 5 mM), e os valores de pH medidos foram distribuídos entre os intervalos: $\text{pH} < 6,5$ e $\text{pH} \geq 6,5$ (**Quadro 1B**). Nestes experimentos, pHs $< 6,5$ indicavam que a manutenção do pH ácido não foi alterada, ao passo que pHs $\geq 6,5$ correspondiam a uma alcalinização efetiva do pH no intestino médio.

Em ambos os experimentos, as proporções de observações encontradas em cada intervalo de pH foram comparadas entre testes (com aminoácidos) e controles.

Quadro 1A - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de aminoácidos a 5,0 mM tamponado em pH 7,4

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|---------------------------|---|---------------------------|
| | SFI (controle) | SFI + aminoácidos (teste) | SFI (controle) | SFI + aminoácidos (teste) |
| < 6,5 | 10 | 7 | 10 | 10 |
| ≥ 6,5 | 0 | 4 | 0 | 1 |
| Amostra | n = 10 | n = 11 | n = 10 | n = 11 |
| Estatística | $p = 0,09$ (Fisher) | | $p = 1,00$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 1B - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de aminoácidos a 5,0 mM em pH 6,0 (sem tampão)

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|---------------------------|---|---------------------------|
| | SFI (controle) | SFI + aminoácidos (teste) | SFI (controle) | SFI + aminoácidos (teste) |
| < 6,5 | 32 | 14 | 33 | 11 |
| ≥ 6,5 | 7 | 0 | 3 | 1 |
| Amostra | n = 39 | n = 14 | n = 36 | n = 12 |
| Estatística | $p = 0,17$ (Fisher) | | $p = 1,00$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Nos insetos que ingeriram aminoácidos a 5 mM com o pH tamponado em pH 7,4, houve acidificação normal para pHs menores que pH 6,5 no intestino médio abdominal. Entretanto, houve uma tendência do pH se manter acima de pH 6,5 na porção torácica do intestino médio (**quadro 1A**). Os dados do **quadro 1B** mostraram que o pH das soluções ingeridas em pH 6,0 (sem tamponamento) foi eficientemente mantido abaixo de 6,5 tanto na porção torácica quanto na porção abdominal do intestino médio, mesmo na presença de aminoácidos a 5,0 mM. Isso indica

que nesta concentração, os aminoácidos não foram capazes de desativar o mecanismo que acidifica o pH intestinal.

Como uma concentração “fisiológica” de aminoácidos não foi suficiente para disparar a alcalinização do pH intestinal, uma solução não tamponada, com uma concentração de aminoácidos 35 vezes maior (172 mM) foi ingerida pelos flebotomíneos. Os intervalos de pHs observados no intestino médio dos insetos encontram-se divididos nas categorias pH < 6,5 e pH ≥ 6,5 (**Quadro 2**).

Quadro 2 - Intervalos de pHs observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de aminoácidos (172 mM) em pH 7,4 sem tamponamento

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|---------------------------|---|---------------------------|
| | SFI (controle) | SFI + aminoácidos (teste) | SFI (controle) | SFI + aminoácidos (teste) |
| < 6,5 | 32 | 1 | 33 | 0 |
| ≥ 6,5 | 7 | 9 | 3 | 10 |
| Amostra | n = 39 | n = 10 | n = 36 | n = 10 |
| Estatística | $p < 0,0001$ (Fisher) | | $p < 0,0001$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quando os insetos ingeriram SFI em pH 7,4 contendo uma quantidade 35 vezes maior de aminoácidos, o pH se manteve acima de 6,5 no intestino médio abdominal (pH = 7,5 em 100% dos casos) em proporção muito maior do que a observada em fêmeas que ingeriram apenas SFI. Resultados semelhantes foram observados no intestino médio torácico, no qual o pH permaneceu acima de 6,5 numa proporção significativamente maior na presença dos aminoácidos (**Quadro 2**). Em conjunto, os resultados dos **Quadros 1 e 2** mostraram que os aminoácidos, quando na concentração próxima àquela disponível no sangue ingerido pelo flebotomíneo, não são eficientes em estimular uma alcalinização efetiva do pH no intestino médio abdominal. Entretanto, quando uma quantidade cerca de 35 vezes maior de aminoácidos foi introduzida no

intestino do flebotômíneo, ocorreu um estímulo suficiente para desativar a manutenção do pH ácido, e ativar o mecanismo de alcalinização. É possível que neste caso, uma concentração muito elevada de aminoácidos acabe por ativar no flebotômíneo, um mecanismo de alcalinização dependente de transporte de cátions semelhante ao observado no intestino médio anterior de larvas de *Anopheles gambiae*. No caso do culicídeo, íons Na^+ e aminoácidos são cotransportados do lúmen para o interior das células intestinais; posteriormente, os íons sódio em excesso no interior da célula voltam para o lúmen, e em troca, dois íons H^+ são retirados deste local (antiporte $\text{Na}^+/\text{2H}^+$), provocando sua alcalinização (Okech et al., 2008).

Após determinar-se que aminoácidos em concentrações elevadas constituem um estímulo para alcalinização do pH intestinal, foi testado se uma mistura de aminoácidos livres e peptídeos (peptona em SFI) quando ingerida sem tamponamento em pH 7,4 ou pH 6,0 teria o mesmo efeito (**Quadro 3**).

Quadro 3A - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de peptona 2% em pH 7,4 sem tamponamento

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|-----------------------|---|-----------------------|
| | SFI (controle) | SFI + Peptona (teste) | SFI (controle) | SFI + Peptona (teste) |
| < 6,5 | 32 | 10 | 33 | 11 |
| ≥ 6,5 | 7 | 3 | 3 | 3 |
| Amostra | n = 39 | n = 13 | n = 33 | n = 11 |
| Estatística | $p = 0,7$ (Fisher) | | $p = 0,3$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 3B - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com solução de peptona 1% em pH 6,0 sem tamponamento

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|-----------------------|---|-----------------------|
| | SFI (controle) | SFI + Peptona (teste) | SFI (controle) | SFI + Peptona (teste) |
| < 6,5 | 32 | 18 | 33 | 16 |
| ≥ 6,5 | 7 | 2 | 3 | 2 |
| Amostra | n = 39 | n = 20 | n = 36 | n = 18 |
| Estatística | $p = 0,7$ (Fisher) | | $p = 1,000$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Nos experimentos em que as fêmeas ingeriram solução de peptona 2% em pH 7,4, foi acidificado para pHs abaixo de pH 6,5 no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal (**Quadro 3A**). Resultados semelhantes foram observados até mesmo quando a solução de peptona 2% foi tamponada em pH 7,4 (HEPES 30 mM) antes de ser ingerida (dados não mostrados). Quando os flebotomíneos ingeriram SFI em pH 6,0 contendo peptona a 1% (**Quadro 3B**), foi observado que o pH se manteve menor do que pH 6,5 mesmo na presença da peptona, indicando que a manutenção do pH ácido no intestino médio (porções torácica e abdominal) não sofreu interferência dos peptídeos nas concentrações estudadas. Em síntese, os resultados mostraram que uma mistura de peptídeos e aminoácidos parece não ser eficiente em superar o mecanismo de manutenção do pH 6,0 e disparar a alcalinização no intestino médio. Entretanto, deve-se levar em consideração que não foi possível testar a peptona em concentrações maiores do que 2%, devido à sua baixa solubilidade principalmente em pHs ácidos e na presença do corante azul de bromotimol. Assim, não se pode afirmar com certeza, que uma solução de peptona não é capaz de disparar a alcalinização do intestino médio. É possível que, semelhantemente ao que acontece com os aminoácidos, uma concentração maior de peptona seja requerida para ativar o mecanismo de aumento de pH.

Visto que aminoácidos são capazes de promover a alcalinização do intestino somente em concentrações muito elevadas, foi investigado se o soro humano total (rico em polipeptídeos) teria efeito no controle do pH intestinal. Assim, fêmeas ingeriram soro humano com pH ajustado em pH 7,4 ou pH 6,0. Os pHs observados após a ingestão do soro são mostrados nos **Quadros 4A e 4B**.

Quadro 4A - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com soro total em pH 7,4

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|--------------------|---|--------------------|
| | SFI (controle) | Soro total (teste) | SFI (controle) | Soro total (teste) |
| < 6,5 | 32 | 22 | 33 | 4 |
| ≥ 6,5 | 7 | 5 | 3 | 22 |
| Amostra | n = 39 | n = 27 | n = 36 | n = 26 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | | $p < 0,0001$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 4B - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos ou com soro total em pH 6,0

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|--------------------|---|--------------------|
| | SFI (controle) | Soro total (teste) | SFI (controle) | Soro total (teste) |
| < 6,5 | 32 | 19 | 33 | 4 |
| ≥ 6,5 | 7 | 2 | 3 | 17 |
| Amostra | n = 39 | n = 20 | n = 36 | n = 21 |
| Estatística | $p = 0,244$ (Fisher) | | $p < 0,0001$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

O soro humano total ingerido em pH 7,4, se manteve alcalino no intestino médio abdominal, e foi acidificado no intestino médio torácico (**Quadro 4A**), assim como observado por Santos et al., 2008 em fêmeas de *L. longipalpis* que se alimentaram de sangue. Quando ingerido em pH 6,0, o soro foi prontamente alcalinizado no intestino médio abdominal, mas se

manteve ácido no intestino médio torácico (**Quadro 4B**). Estes dados mostram que o soro total foi capaz de desligar a manutenção do pH 6,0 e disparar a alcalinização na porção abdominal do intestino médio. Para testar se a retirada de pequenas moléculas afetaria a capacidade do soro de aumentar o pH intestinal, fêmeas foram alimentadas com soro dialisado exaustivamente através de membrana de exclusão de 12 kDa. Os resultados mostraram que em geral, a retirada de moléculas menores do que 12 kDa não interfere expressivamente na capacidade de alcalinização do soro no intestino médio abdominal (dados não mostrados). Entretanto, houve um curioso aumento de pH do soro dialisado no intestino médio torácico (dados não mostrados), fato não verificado quando as fêmeas ingeriram soro total (**Quadro 4**).

Foi testado também, se a ingestão da principal proteína do soro, a soroalbumina (peso molecular = 66 kDa) seria eficiente em promover a alcalinização do intestino médio abdominal de *L. longipalpis* (**quadro 5**).

Quadro 5A - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com soroalbumina 5% em pH 7,4 ou salina fisiológica de insetos, ambas sem tamponamento

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|----------------------|---|----------------------|
| | SFI (controle) | Soroalbumina (teste) | SFI (controle) | Soroalbumina (teste) |
| < 6,5 | 32 | 9 | 33 | 0 |
| ≥ 6,5 | 7 | 1 | 3 | 10 |
| Amostra | n = 39 | n = 10 | n = 36 | n = 10 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | | $p < 0,0001$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 5B - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com soroalbumina 5% em pH 6,0 ou salina fisiológica de insetos, ambas sem tamponamento

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|----------------------|---|----------------------|
| | SFI (controle) | Soroalbumina (teste) | SFI (controle) | Soroalbumina (teste) |
| < 6,5 | 32 | 4 | 33 | 0 |
| ≥ 6,5 | 7 | 8 | 3 | 13 |
| Amostra | n = 39 | n = 12 | n = 36 | n = 13 |
| Estatística | $p = 0,003$ (Fisher) | | $p < 0,0001$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Os resultados mostraram que a soroalbumina foi bastante eficiente em desligar a acidificação (**quadro 5A**) e disparar a alcalinização (**quadro 5B**) do intestino médio abdominal, independentemente do pH inicial da solução ingerida. Na porção torácica do intestino médio, foi observada acidificação normal do pH inicial de 7,4 para pH < 6,5 após ingestão da soroalbumina (**quadro 5A**). Entretanto, quando a soroalbumina foi ingerida em pH 6,0, a porção torácica do intestino não foi capaz de manter o pH em 6,0, e este sofreu alcalinização significativa (**quadro 5B**), o que ainda é de difícil explicação. Estes resultados, em conjunto com aqueles obtidos em fêmeas que ingeriram soro dialisado (dados não mostrados), indicam que a manutenção de um pH adequado na porção torácica do intestino médio é mais instável do que na porção abdominal. Ou seja, o intestino médio torácico parece ser pouco eficiente em regular o pH quando o nutriente ingerido sofre determinadas alterações.

O fato da ingestão de proteínas íntegras (albumina e soro) ter provocado uma eficiente alcalinização no intestino médio abdominal, levantou a seguinte questão: É possível que outras proteínas tenham a capacidade de desativar a manutenção do pH 6,0 e disparar o aumento do pH intestinal? A lisozima é uma proteína de 14 kDa que digere carboidratos de alto peso molecular constituintes de bactérias, e não faz parte da dieta de um flebotômíneo. Desta forma, fêmeas de *L. longipalpis* foram forçadas a ingerir soluções de lisozima íntegra a 5%, com pHs ajustados para pH 7,4 ou pH 6,0. Os resultados obtidos são mostrados nos **quadros 6A e 6B**.

Quadro 6A - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com lisozima 5% ou salina fisiológica para insetos, ambas em pH 7,4 não tamponadas

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|------------------|---|------------------|
| | SFI (controle) | Lisozima (teste) | SFI (controle) | Lisozima (teste) |
| < 6,5 | 32 | 7 | 33 | 0 |
| ≥ 6,5 | 7 | 6 | 3 | 10 |
| Amostra | n = 39 | n=13 | n = 36 | n = 10 |
| Estatística | $p = 0,06$ (Fisher) | | $p < 0,0001$ (Fisher) | |

SFI:Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 6B - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com lisozima 5% ou salina fisiológica para insetos, ambas em pH 6,0 não tamponadas

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|------------------|---|------------------|
| | SFI (controle) | Lisozima (teste) | SFI (controle) | Lisozima (teste) |
| < 6,5 | 32 | 15 | 33 | 1 |
| ≥ 6,5 | 7 | 5 | 3 | 20 |
| Amostra | n =39 | n=20 | n=36 | n=21 |
| Estatística | $p = 0,52$ (Fisher) | | $p < 0,0001$ (Fisher) | |

SFI:Solução Fisiológica para Insetos

Os dados do **quadro 6** mostram que a ingestão de uma proteína “estranha” ao ambiente intestinal foi bastante eficiente em impedir a acidificação do pH de 7,4 para pH 6,0 (**quadro 6A**) bem como disparou a alcalinização de pH 6,0 para pH ≥ 6,5 na porção abdominal do intestino médio (**quadro 6B**). Quando a lisozima foi ingerida em pH 6,0, o intestino médio torácico foi capaz de manter o pH ácido (pH < 6,5) (**quadro 6B**). Entretanto, a proteína ingerida em pH 7,4 não foi acidificada de maneira eficiente na parte torácica do intestino, e o pH apresentou uma tendência a permanecer maior ou igual a 6,5. Este resultado, juntamente com os dados observados no **Quadro 5B** reforçam a idéia de que a regulação do pH (manutenção do pH 6,0) no

intestino médio torácico ocorre de maneira diferente do ajuste de pH (alcalinização do pH) observado no intestino médio abdominal.

A caseína é a principal proteína do leite, e como a lisozima, não faz parte da dieta normal dos flebotomíneos. Para testar o efeito desta proteína de 24 kDa na manutenção do pH intestinal, uma solução de caseína a 5% em pH 7,4 foi introduzida no tubo digestivo dos insetos. Os pHs observados no intestino médio dos flebotomíneos após a ingestão da solução encontram-se no **quadro 7**.

Quadro 7 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com caseína 5% em pH 7,4 ou salina fisiológica para insetos, ambas sem tamponamento

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|-----------------|---|-----------------|
| | SFI (controle) | Caseína (teste) | SFI (controle) | Caseína (teste) |
| < 6,5 | 32 | 12 | 33 | 9 |
| ≥ 6,5 | 7 | 2 | 3 | 5 |
| Amostra | n = 39 | n = 14 | n = 36 | n = 14 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | | $p = 0,03$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Os resultados do **quadro 7** mostraram que a caseína, uma proteína que normalmente não é ingerida pelos flebotomíneos, foi capaz de manter o pH $\geq 6,5$ na porção abdominal do intestino médio, mas em uma proporção significativamente menor quando comparada com a da lisozima, que se mostrou mais eficiente em manter o pH alcalino ($p = 0,002$; Fisher). Não foi possível testar o efeito da ingestão da caseína em pH 6,0, devido à insolubilidade desta proteína em pHs ácidos.

Para confirmar a eficiência do soro humano, da soroalbumina e da lisozima em alcalinizar o intestino médio abdominal, estas substâncias foram previamente tamponadas em pH 6,0 com MES 30mM, e introduzidas no tubo digestivo dos flebotomíneos. Nestes experimentos,

tanto a albumina quanto a lisozima mantiveram sua eficiente capacidade de provocar alcalinização do intestino médio abdominal, elevando o pH 6,0 neste local para valores de pHs maiores ou iguais a pH 7,0 em mais de 70% dos casos (dados não mostrados). O soro também manteve sua capacidade de disparar a alcalinização do pH no intestino médio abdominal quando foi tamponado em pH 6,0, mas não de maneira tão eficiente como observado para albumina e lisozima (dados não mostrados).

Para saber se a alcalinização provocada pela lisozima dependia da integridade da proteína, esta foi digerida com ácido fórmico, e a **Figura 9** mostra os pontos de clivagem esperados para o tipo de digestão realizada, de acordo com Li *et al.* (2001).

MRSLLILVLCFLPLAALGKVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNT
QATNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNC AKKI
VSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCR L

D = aminoácido clivado no grupamento carboxila,
MRSLLILVLCFLPLAAL = peptídeo sinal

Figura 9 - Seqüência de aminoácidos da lisozima com os pontos de clivagem esperados em uma digestão da proteína por ácido fórmico.

Após uma digestão eficiente da lisozima por ácido fórmico, espera-se um produto com sete tipos de peptídeos, dos quais o menor teria 10 aminoácidos, e o maior, 29. O gel mostrado na **Figura 10** confirmou que a metodologia utilizada por nós foi eficiente em digerir a lisozima através do ácido fórmico.

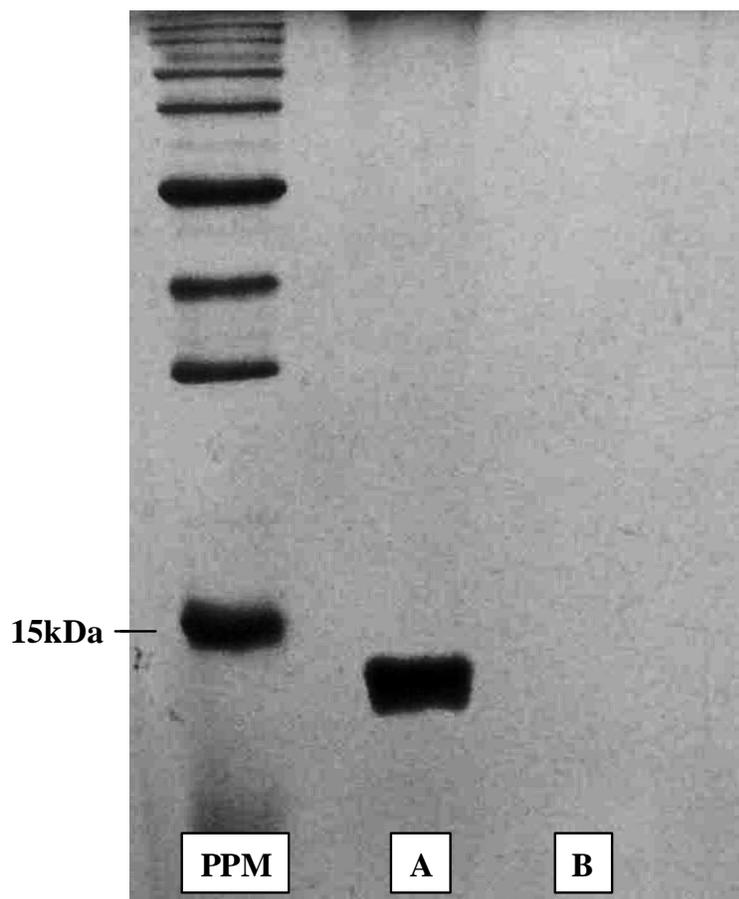


Figura 10 - Gel de poliacrilamida 15% corado com nitrato de prata. PPM = Padrão de peso molecular; A= lisozima íntegra; B= lisozima digerida

Uma vez confirmado que a lisozima foi digerida, preparou-se uma solução de SFI com o produto da digestão (concentração final = 2,5%) contendo tampão MES 30mM em pH 6,0. Esta solução foi introduzida no tubo digestivo dos flebotomíneos, e os insetos do grupo controle foram forçados a ingerir apenas SFI tamponada com MES 30mM em pH 6,0. Os resultados estão resumidos no **Quadro 8**.

Quadro 8 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com lisozima íntegra (5%) ou digerida (2,5%), ambas tamponadas com MES 30mM em pH 6,0

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|---------------------------|---|---------------------------|
| | Lisozima Íntegra (controle) | Lisozima Digerida (teste) | Lisozima Íntegra (controle) | Lisozima Digerida (teste) |
| < 6,5 | 17 | 11 | 3 | 12 |
| ≥ 6,5 | 3 | 6 | 14 | 3 |
| Amostra | n = 20 | n = 17 | n = 17 | n = 15 |
| Estatística | $p = 0,3$ (Teste de Fisher) | | $p = 0,001$ (Teste de Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

De acordo com o **Quadro 8** a lisozima na sua forma íntegra foi mais eficiente em alcalinizar o pH do intestino médio abdominal do que os peptídeos resultantes de sua digestão. Este resultado indica que o disparo de uma alcalinização eficiente nesta parte do intestino parece depender de peptídeos com um peso molecular mínimo. No entanto, deve-se enfatizar que uma concentração menor da lisozima digerida foi ingerida pelos flebotomíneos quando comparada com a ingestão da lisozima íntegra, pois a digestão da proteína a torna menos solúvel em SFI contendo o azul de bromotimol. Desta forma, novos testes deverão ser realizados para confirmar se a diferença do efeito no pH intestinal observada entre as formas íntegra e digerida da lisozima realmente ocorreram devido à digestão da proteína.

De acordo com os resultados, uma alcalinização efetiva do intestino médio abdominal foi possível quando soroalbumina ou lisozima em suas formas íntegras foram ingeridas por *L. longipalpis*. A ativação do processo de alcalinização talvez ocorra pela interação das proteínas, ou de motivos presentes nestas proteínas com o epitélio intestinal. Para testar a hipótese de que a interação só ocorreria se as proteínas estiverem em contato direto com o lúmen, soluções de soroalbumina e lisozima a 5% foram aplicadas sobre a parede externa de intestinos previamente dissecados de fêmeas alimentadas com corante indicador de pH em SFI. No grupo controle, apenas SFI sem nenhuma proteína foi aplicada sobre os intestinos. Foi considerado aumento de

pH, toda mudança de $\text{pH} \leq 6,0$ para $\text{pH} > 6,0$ observada no interior do intestino após a aplicação das proteínas (teste) ou da SFI (controle). Os resultados são mostrados nos **quadros 9 e 10**.

Quadro 9 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação externa de albumina 5% ou salina fisiológica de insetos em intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica de insetos

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Soroalbumina (teste) | Lisozima SFI (controle) | Aplicação de Soroalbumina (teste) |
| $\leq 6,0$ | 8 | 8 | 14 | 13 |
| $> 6,0$ | 4 | 3 | 1 | 0 |
| Amostra | n = 12 | n = 11 | n = 15 | n = 13 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | | $p = 1,000$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 10 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação externa de lisozima 5% ou salina fisiológica de insetos em intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica de insetos

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|-------------------------------|---|-------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Lisozima (teste) | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Lisozima (teste) |
| $\leq 6,0$ | 8 | 14 | 14 | 14 |
| $> 6,0$ | 4 | 0 | 1 | 0 |
| Amostra | n = 12 | n = 14 | n = 15 | n = 14 |
| Estatística | $p = 0,03$ (Fisher) | | $p = 1,000$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Como já demonstrado ao longo de todos os experimentos deste trabalho, insetos que ingerem SFI normalmente têm o pH ajustado para pH 6,0 no intestino médio. Assim, para verificar o efeito da aplicação de soroalbumina ou lisozima na manutenção do pH, só foram consideradas as observações nas quais o pH da SFI ingerida foi ajustado pelo próprio intestino para pH 6,0 antes da adição das proteínas. De acordo com os dados dos **Quadros 9 e 10**, nem a albumina, nem a lisozima em contato com a porção basal das células intestinais (lado em contato com a hemolinfa) foram capazes de provocar o aumento do pH no lúmen do intestino médio abdominal. Curiosamente, a adição de lisozima provocou uma estabilização do pH em $\text{pH} \leq 6,0$, diferente da adição de SFI, que provocou uma leve alcalinização da parte torácica do intestino (**quadro 10**). Experimentos mais detalhados devem ser realizados para confirmar este efeito da lisozima inicialmente observado na porção torácica do intestino. De maneira geral, os resultados são indícios de que o efeito da albumina e da lisozima na alcalinização do pH ocorre somente quando estas proteínas entram em contato direto com o lúmen intestinal.

Santos e colaboradores (2008) verificaram que a inibição da enzima anidrase carbônica (catalisadora da formação de íons HCO_3^- e H^+) dificulta a acidificação do pH em intestinos de fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue. No presente trabalho, foi observado que a ingestão de proteínas como a albumina e a lisozima é capaz de disparar a alcalinização do intestino médio abdominal. Para testar se este efeito alcalinizante provocado pelas proteínas estaria relacionado com a atividade da anidrase carbônica, fêmeas foram alimentadas com solução de lisozima tamponada em pH 6,0, contendo ou não a acetazolamida (inibidor da anidrase carbônica). Quando uma fêmea de *L. longipalpis* ingere lisozima tamponada em pH 6,0, este pH é eficientemente alcalinizado para pHs acima de pH 7,0 no intestino médio abdominal (ver **quadro 11**). Desta forma, aumentos de pHs que não ultrapassaram pH 7,0 foram considerados como alcalinização ineficiente, e para a análise deste grupo de resultados, os pHs observados foram divididos nas categorias: $\text{pH} \leq 7,0$ e $\text{pH} > 7,0$ (**quadro 11**).

Quadro 11 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução de lisozima 5% tamponada em pH 6,0 contendo ou não acetazolamida

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|----------------------------------|---|----------------------------------|
| | Lisozima (controle) | Lisozima + Acetazolamida (teste) | Lisozima (controle) | Lisozima + Acetazolamida (teste) |
| ≤ 7,0 | 20 | 16 | 6 | 12 |
| > 7,0 | 0 | 0 | 11 | 3 |
| Amostra | n = 20 | n = 16 | n = 17 | n = 15 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | | $p = 0,02$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Os resultados do **quadro 11** mostram que mesmo na presença da acetazolamida, o pH se mantém mais ácido no intestino médio torácico ($\text{pH} \leq 6,0$ em 80% dos casos). Contudo, no intestino médio abdominal, a inibição da anidrase carbônica diminuiu a eficiência da alcalinização do pH, que não ultrapassou pH 7,0, como seria esperado na presença de lisozima. Em conjunto, os resultados mostram que a atividade da anidrase carbônica catalisando a formação de ácido carbônico que se dissocia em íons HCO_3^- e H^+ é importante no aumento de pH no intestino médio abdominal no flebotomíneo. Neste caso os íons bicarbonato devem ser transportados para o lúmen do intestino, alcalinizando este local.

5.2 - Efeito do extrato intestinal e da serotonina no controle do pH do intestino médio abdominal de *Lutzomyia longipalpis*

Para verificar se substâncias secretadas pelas próprias células intestinais seriam um estímulo para a alcalinização, extratos de intestino em concentrações equivalentes ao produzido por 3 intestinos foram aplicados diretamente sobre intestinos cujos conteúdos se encontravam em pH 6,0. Como controle, foi aplicada SFI sem o extrato intestinal nos intestinos previamente

acidificados. Os pHs intestinais observados após as aplicações de SFI e de extrato estão resumidos no **Quadro 12**.

Quadro 12 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de extrato de intestino (3 intestinos/ μ L) ou salina fisiológica para insetos sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|---|---|---|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Extrato de intestino (teste) | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Extrato de intestino (teste) |
| $\leq 6,0$ | 10 | 6 | 17 | 9 |
| $> 6,0$ | 0 | 1 | 0 | 11 |
| Amostra | n = 10 | n = 7 | n = 17 | n = 20 |
| Estatística | $p = 0,412$ (Fisher) | | $p = 0,0002$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Os resultados do **quadro 12** mostram que a adição de extrato de intestino não implicou em alcalinização significativa de intestinos médios torácicos que se encontravam inicialmente em pH 6,0, quando comparamos testes e controles. Porém, foi observada uma alcalinização para pHs acima de 6,0 nos intestinos médios abdominais que receberam a adição do extrato de intestinos. Estes resultados indicam que o extrato de intestino contém substâncias produzidas e liberadas por células distribuídas ao longo do epitélio intestinal, e tais substâncias participam da alcalinização do lúmen do intestino médio abdominal.

Levando-se em conta a possível liberação de serotonina na hemolinfa dos insetos após a alimentação (Orchard, 2006), seu provável efeito na fisiologia do intestino médio de *L. longipalpis* também foi avaliado. Para tanto, esse hormônio foi aplicado em preparações de intestinos de flebotomíneos que ingeriram soroalbumina (intestinos alcalinos) e em intestinos de insetos que ingeriram SFI (intestinos ácidos) (**Quadros 13 e 14**). Para as análises dos resultados em insetos que ingeriram soroalbumina, foi levado em consideração que intestinos médios

abdominais com pH ~ 7,4, sofreram tanto alcalinização quanto acidificação após a aplicação da serotonina. Desta forma, foi realizada uma análise com categorias de pHs diferentes para cada situação, através do teste de Fisher (**Quadros 14 A e 14 B**).

Quadro 13 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de Serotonina a 100µM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|---------------------------------|---|---------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Serotonina (teste) | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Serotonina (teste) |
| ≤ 6,0 | 8 | 3 | 14 | 11 |
| > 6,0 | 4 | 4 | 1 | 2 |
| Amostra | n = 12 | n = 7 | n = 15 | n = 13 |
| Estatística | $p = 0,377$ (Fisher) | | $p = 0,583$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 14 - Intervalos de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de Serotonina a 100µM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com soroalbumina 5%

A - Avaliação dos intestinos que sofreram acidificação do pH inicial após adição de serotonina

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|---|---------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Serotonina (teste) |
| pH < 7,4 | 2 | 2 |
| 7,4 ≤ pH ≤ 7,5 | 13 | 11 |
| Amostra | n = 15 | n = 13 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | |

B - Avaliação dos intestinos que sofreram alcalinização do pH inicial após adição de serotonina

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|-------------------------------|---|---------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Serotonina (teste) |
| $7,4 \leq \text{pH} \leq 7,5$ | 15 | 11 |
| $\text{pH} > 7,5$ | 0 | 3 |
| Amostra | n = 15 | n = 14 |
| Estatística | $p = 0,09$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quando serotonina 100 μ M foi aplicada em intestinos ácidos (pH 6,0), estes se mantiveram com pHs próximos de 6,0 tanto na porção torácica, quanto na porção abdominal (**Quadro 13**). Nos casos em que os flebotômicos ingeriram soroalbumina, e que se encontravam inicialmente com os intestinos médios abdominais alcalinos (pH 7,4), a aplicação da serotonina não provocou acidificação. Entretanto, houve uma tendência de alcalinização do pH intestinal após a aplicação da serotonina, indicando que este hormônio provavelmente tem alguma participação na alcalinização do intestino médio abdominal repleto de proteína (**Quadro 14 B**).

5.3 Concentrações intracelulares de Ca^{2+} e AMPc e regulação do pH intestinal de *Lutzomyia longipalpis* sem repasto sanguíneo

A concentração de cálcio intracelular nos organismos influencia várias vias de sinalização, inclusive a ativação da adenilato ciclase, enzima responsável pela formação de AMPc a partir de ATP (MacNeil et al., 1985). O AMPc por sua vez, dentre outras funções, atua como estimulador da atividade das H^+ ATPases, as principais bombadoras de prótons entre os meios intra e extracelulares de vários organismos, inclusive de insetos (Wieczorek, et al., 2009). Tendo em vista a importância de AMPc e cálcio intracelulares na fisiologia dos insetos, foi investigado se o aumento ou a diminuição destes segundo-mensageiros no interior das células intestinais de *L. longipalpis* teria algum efeito na regulação do pH do intestino médio deste inseto. Para tanto, substâncias capazes de aumentar ou diminuir as concentrações intracelulares de AMPc ou cálcio

foram aplicadas em intestinos dissecados, previamente alcalinizados ou acidificados através da ingestão de SFI ou soroalbumina, respectivamente. Nos grupos controle para esses experimentos, os intestinos ácidos ou alcalinos sempre recebiam aplicação somente de SFI sem nenhuma das substâncias. As alterações de pH observadas foram anotadas e avaliadas da mesma forma descrita para a avaliação dos experimentos com a serotonina.

O Forskolín é um fármaco que atua estimulando a atividade da adenilato ciclase, enzima responsável pela formação de AMPc no meio intracelular. O efeito deste estimulante da formação de AMPc na manutenção do pH intestinal dos flebotomíneos foi testado, e os resultados encontram-se nos **quadros 15 e 16**.

Quadro 15 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de Forskolín a 100µM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|--------------------------------|---|--------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Forskolín (teste) | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Forskolín (teste) |
| ≤ 6,0 | 8 | 11 | 14 | 10 |
| > 6,0 | 4 | 1 | 1 | 4 |
| Amostra | n = 12 | n = 12 | n = 15 | n = 14 |
| Estatística | $p = 0,317$ (Fisher) | | $p = 0,169$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 16 - Intervalos de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de Forskolin a 100 μ M ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com soroalbumina 5%

A - Avaliação dos intestinos que sofreram acidificação do pH inicial após adição de Forskolin

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|--------------------------|---|--------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Forskolin (teste) |
| pH < 7,4 | 2 | 1 |
| 7,4 \leq pH \leq 7,5 | 13 | 12 |
| Amostra | n = 15 | n = 13 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | |

B - Avaliação dos intestinos que sofreram alcalinização do pH inicial após adição de Forskolin

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|--------------------------|---|--------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de Forskolin (teste) |
| 7,4 \leq pH \leq 7,5 | 15 | 12 |
| >7,5 | 0 | 1 |
| Amostra | n = 15 | n = 13 |
| Estatística | $p = 0,46$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

De acordo com os resultados, um aumento da formação de AMPc intracelular através da adição do forskolin não foi suficiente para estimular a alcalinização nos intestinos médios torácicos e abdominais que se encontravam em pH 6,0 (**Quadro 15**). O forskolin não foi capaz de alcalinizar ou acidificar o pH \sim 7,4 na porção abdominal do intestino médio dos insetos alimentados com soroalbumina (**Quadro 16**).

Como o aumento da formação de AMPc através da ativação da adenilato ciclase não provocou alteração significativa do pH intestinal, foi testado se um aumento mais drástico da concentração de AMPc seria capaz de alcalinizar ou acidificar o pH intestinal. Para isso, adicionou-se SFI contendo AMPc a 10mM em intestinos previamente alcalinizados ou acidificados (**Quadros 17 e 18**).

Quadro 17 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de AMPc 10mM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|---------------------------|---|---------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de AMPc (teste) | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de AMPc (teste) |
| ≤ 6,0 | 8 | 12 | 14 | 19 |
| > 6,0 | 4 | 3 | 1 | 3 |
| Amostra | n = 12 | n = 15 | n = 15 | n = 21 |
| Estatística | p = 0,66 (Fisher) | | p = 0,63 (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 18 - Intervalos de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de AMPc 10mM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com soroalbumina 5%

A - Avaliação dos intestinos que sofreram acidificação do pH inicial após adição de AMPc

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|---|---------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de AMPc (teste) |
| pH < 7,4 | 2 | 2 |
| 7,4 ≤ pH ≤ 7,5 | 13 | 13 |
| Amostra | n = 15 | n = 15 |
| Estatística | p = 1,000 (Fisher) | |

B - Avaliação dos intestinos que sofreram alcalinização do pH inicial após adição de AMPc

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|---|---------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de AMPc (teste) |
| 7,4 ≤ pH ≤ 7,5 | 15 | 15 |
| >7,5 | 0 | 0 |
| Amostra | n = 15 | n = 15 |
| Estatística | p = 1,000 (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Os resultados mostraram que nem mesmo um aumento abrupto da concentração de AMPc nas células intestinais foi capaz de provocar aumento no pH 6,0 no intestino médio torácico ou

abdominal dos flebotomíneos alimentados com SFI (**Quadro 17**). Também não foi observada alteração do pH alcalino na parte abdominal do intestino médio após adição do AMPc (**Quadro 18**). Como o aumento direto ou indireto do AMPc não provocou alteração no controle do pH no intestino médio, foi testado se a aplicação de 2'-5' dideoxiadenosina, um inibidor da formação de AMPc no meio intracelular, alteraria a manutenção do pH intestinal (**Quadros 19 e 20**).

Quadro 19 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de dideoxiadenosina 1,0 mM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de dideoxiadenosina (teste) | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de dideoxiadenosina (teste) |
| ≤ 6,0 | 8 | 15 | 14 | 28 |
| > 6,0 | 4 | 3 | 1 | 5 |
| Amostra | n = 12 | n = 18 | n = 15 | n = 33 |
| Estatística | $p = 0,39$ (Fisher) | | $p = 0,65$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 20 - Intervalos de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de dideoxiadenosina 1,0 mM ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com soroalbumina 5%

A - Avaliação dos intestinos que sofreram acidificação do pH inicial após adição de dideoxiadenosina

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|---|---------------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de dideoxiadenosina (teste) |
| pH < 7,4 | 2 | 4 |
| 7,4 ≤ pH ≤ 7,5 | 13 | 12 |
| Amostra | n = 15 | n = 16 |
| Estatística | $p = 0,65$ (Fisher) | |

B - Avaliação dos intestinos que sofreram alcalinização do pH inicial após adição de dideoxiadenosina

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|-------------------------------|---|---------------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de dideoxiadenosina (teste) |
| $7,4 \leq \text{pH} \leq 7,5$ | 15 | 11 |
| $>7,5$ | 0 | 3 |
| Amostra | n = 15 | n = 14 |
| Estatística | $p = 0,09$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quando a dideoxiadenosina foi aplicada em intestinos com pH inicial ácido, não houve alcalinização nem na porção torácica, nem na porção abdominal do intestino médio (**Quadro 19**). O inibidor da formação do AMPc nas células intestinais também não provocou acidificação do intestino médio abdominal (**Quadro 20A**), mas houve uma leve tendência de alcalinização do pH $\sim 7,4$ nesta porção do intestino médio após a adição do inibidor (**Quadro 20B**). Este resultado indica que, de alguma forma, o AMPc pode ter participação no controle do pH do intestino médio abdominal quando este está repleto de proteínas.

De acordo com os resultados obtidos, a diminuição ou o aumento das concentrações de AMPc nas células intestinais teve pouco ou nenhum efeito direto no controle do pH no intestino médio. Deste modo, decidiu-se por testar se um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} através da adição de calcimicina provocaria alteração do pH em intestinos ácidos ou alcalinos (**Quadros 21 e 22**).

Quadro 21 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação de calcimicina 4,0 μM dissolvida em SFI ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|----------------------------------|---|----------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de calcimicina (teste) | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de calcimicina (teste) |
| $\leq 6,0$ | 8 | 14 | 14 | 19 |
| $> 6,0$ | 4 | 4 | 1 | 2 |
| Amostra | n = 12 | n = 18 | n = 15 | n = 21 |
| Estatística | $P = 0,678$ (Fisher) | | $P = 1,000$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 22 - Intervalos de pH observados no intestino médio abdominal após aplicação de calcimicina 4,0 μM dissolvida em SFI ou salina fisiológica para insetos, sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com soroalbumina 5%

A - Avaliação dos intestinos que sofreram acidificação do pH inicial após adição de calcimicina

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|-------------------------------|---|----------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de calcimicina (teste) |
| $\text{pH} < 7,4$ | 2 | 1 |
| $7,4 \leq \text{pH} \leq 7,5$ | 13 | 13 |
| Amostra | n = 15 | n = 14 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | |

B - Avaliação dos intestinos que sofreram alcalinização do pH inicial após adição de calcimicina

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|-------------------------------|---|----------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de calcimicina (teste) |
| $7,4 \leq \text{pH} \leq 7,5$ | 15 | 14 |
| $> 7,5$ | 0 | 0 |
| Amostra | n = 15 | n = 14 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

A adição da calcimicina não provocou alcalinização do pH nem na porção torácica nem na porção abdominal nos intestinos que se encontravam ácidos (**Quadro 21**). A presença do

ionóforo para cálcio também não provocou diminuição ou aumento do pH ~ 7,4 na porção abdominal dos intestinos médios de fêmeas que se alimentaram com soroalbumina (**Quadro 22**). Estes resultados indicam que um aumento de cálcio no interior das células intestinais não parece afetar diretamente a manutenção do pH no lúmen do intestino médio do flebotomíneo.

5.4 Efeito de íons nitrato (que atuam como inibidores da H⁺ ATPase) no controle do pH intestinal em *Lutzomyia longipalpis* não alimentados com sangue

Para testar a hipótese do envolvimento direto de H⁺ V-ATPases no controle do pH intestinal de *L. longipalpis*, foi testado se a presença de íons nitrato, inibidores destas bombas de prótons, diminuiriam a eficiência do intestino médio em manter o pH ácido ou alcalino. Soluções de nitrato de potássio em SFI foram ingeridas com pH tamponado em pH 7,5 ou pH 5,0 (**quadros 23 e 24**) ou aplicadas diretamente em intestinos dissecados que se encontravam ácidos (pH 6,0) (**quadro 25**) ou alcalinos (pH~7,4). Neste último caso, foram feitas duas avaliações estatísticas diferentes, levando-se em consideração que o pH 7,4 dos intestinos abdominais poderia sofrer tanto alcalinização quanto acidificação após a aplicação do nitrato de potássio (**quadro 26**).

Quadro 23 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos contendo ou não, o nitrato de potássio (KNO₃) 100mM tamponado com HEPES 160mM em pH 7,5

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|--|---|--|
| | SFI + HEPES (controle) | SFI + HEPES + KNO ₃ (teste) | SFI + HEPES (controle) | SFI + HEPES + KNO ₃ (teste) |
| ≤ 6,0 | 31 | 18 | 25 | 19 |
| > 6,0 | 7 | 6 | 12 | 5 |
| Amostra | n=38 | n=24 | n=37 | n=24 |
| Estatística | $p = 0,541$ (Fisher) | | $p = 0,391$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 24 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos contendo ou não nitrato de potássio (KNO₃) 100mM tamponada com MES 160mM em pH 5,0

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| | SFI + MES (controle) | SFI + MES + KNO ₃ (teste) | SFI + MES (controle) | SFI + MES + KNO ₃ (teste) |
| ≤ 6,0 | 13 | 9 | 6 | 3 |
| > 6,0 | 0 | 1 | 7 | 7 |
| Amostra | n = 13 | n = 10 | n = 13 | n = 10 |
| Estatística | $p = 0,435$ (Fisher) | | $p = 0,67$ (Fisher) | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quando uma solução qualquer (sem proteínas) é ingerida em pH 7,5 pelo flebotômico, seu pH sempre é ajustado para $pH \leq 6,0$ no intestino médio abdominal, mesmo que a solução esteja fortemente tamponada (Santos et al., 2008). Os resultados do **Quadro 23** mostraram que, quando *L. longipalpis* ingeriu uma solução tamponada em pH 7,5 contendo o nitrato de potássio, houve uma leve tendência do pH em não ser totalmente acidificado para $pH \leq 6,0$ no intestino médio abdominal. Entretanto, os flebotômicos do grupo controle, inesperadamente, também não foram capazes de acidificar normalmente o pH na porção abdominal do intestino. Resultados semelhantes foram observados na porção torácica do intestino médio do flebotômico, onde o pH

também não foi normalmente acidificado para $\text{pH} \leq 6,0$, independente da presença de íons nitrato (**quadro 23**). Desta forma, não foi possível observar isoladamente, o efeito da inibição da H^+ VATPase na manutenção do $\text{pH} 6,0$. Um aumento no “n” amostral, e a utilização de inibidores de H^+ VATPases mais eficientes e específicos (como a bafilomicina) provavelmente demonstrarão a participação destas bombas de prótons no mecanismo de acidificação do intestino médio abdominal do flebotomíneo. Quando os íons nitrato ingeridos em $\text{pH} 5,0$ entraram em contato com o lúmen do intestino médio abdominal, o pH que normalmente seria ajustado até alcançar $\text{pH} 6,0$, foi alcalinizado para pH s acima deste valor em 70% das observações (**quadro 24**). Entretanto, os insetos do grupo controle também não foram capazes de ajustar o pH para $\text{pH} \leq 6,0$, à semelhança do que ocorreu com os insetos que ingeriram HEPES em $\text{pH} 7,5$ (**quadro 23**).

Os resultados mostrados nos **quadros 23 e 24** realmente não eram esperados, uma vez que Santos e colaboradores (2008) observaram uma eficiente capacidade de manutenção do $\text{pH} 6,0$ em fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue, mesmo quando desafiadas com soluções tamponadas. Novos experimentos deverão ser realizados para esclarecer melhor os resultados aqui apresentados.

Quadro 25 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação direta de SFI contendo ou não nitrato de potássio (KNO_3) 100mM sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com Soroalbumina

A - Avaliação dos intestinos que sofreram acidificação do pH inicial após adição de KNO_3

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|-------------------------------|---|-------------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de KNO_3 (teste) |
| $\text{pH} < 7,4$ | 2 | 2 |
| $7,4 \leq \text{pH} \leq 7,5$ | 13 | 12 |
| Amostra | n = 15 | n = 14 |
| Estatística | $p = 1,000$ (Fisher) | |

B - Avaliação dos intestinos que sofreram alcalinização do pH inicial após adição de KNO₃

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|---|---------------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de KNO ₃ (teste) |
| 7,4 ≤ pH ≤ 7,5 | 15 | 13 |
| >7,5 | 0 | 1 |
| Amostra | n = 15 | 14 |
| Estatística | p = 0,483 | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

Quadro 26 - Intervalos de pH observados no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal após aplicação direta de SFI contendo ou não nitrato de potássio (KNO₃) 100mM sobre intestinos dissecados de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com solução fisiológica para insetos

| Intervalos de pH | Número de Intestinos Médios Torácicos observados | | Número de Intestinos Médios Abdominais observados | |
|------------------|--|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de KNO ₃ (teste) | Aplicação de SFI (controle) | Aplicação de KNO ₃ (teste) |
| ≤ 6,0 | 8 | 9 | 14 | 9 |
| > 6,0 | 4 | 3 | 1 | 5 |
| Amostra | n = 12 | n = 12 | n = 15 | n = 14 |
| Estatística | p = 1,000 (Fisher) | | p = 0,08 | |

SFI: Solução Fisiológica para Insetos

A adição *a posteriori* de KNO₃ em intestinos que já se encontravam alcalinizados, não provocou alteração significativa do pH nem na porção torácica nem na porção abdominal do intestino (**quadro 25**). Neste caso, provavelmente o mecanismo de manutenção do pH 6,0 já havia sido previamente desligado pela ingestão da soroalbumina, não sendo portanto, afetado pela adição do inibidor de H⁺ VATPases. Os dados do **quadro 26** mostram, entretanto, que os intestinos médios abdominais que se encontravam em pH 6,0 apresentaram uma tendência a sofrer alcalinização do pH com a adição do inibidor da H⁺ VATPase. Este resultado é um indício de que a bomba de prótons está envolvida na regulação do pH intestinal de *L. longipalpis*, sendo o seu funcionamento quando o pH no intestino médio abdominal deve ser mantido em pH 6,0.

5.5 Concentrações normais dos íons K^+ e Na^+ no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com sangue de hamster (*Mesocricetus auratus*)

Além do íon H^+ , o transporte de cátions tais como o Na^+ e o K^+ poderiam, de alguma forma, participar dos mecanismos fisiológicos de regulação do pH intestinal de *L. longipalpis*. Assim, é relevante se conhecer a concentração normal desses íons no interior do intestino médio, nas diferentes condições fisiológicas de modo a usar estas informações no futuro para a criação de modelos capazes de descrever o funcionamento do intestino. Desta forma, um microeletrodo íon-específico foi utilizado para medir a concentração de K^+ no sangue ingerido por fêmeas de flebotomíneos em dois períodos: entre zero e 4h, e entre 24 e 50h após o repasto sanguíneo. Para conhecermos as concentrações no sangue fora do intestino do inseto, foram medidas também, as concentrações de K^+ no sangue humano exposto ao ambiente (não ingerido) entre zero e 4h, e entre 24 e 50h após este ter sido coletado. As concentrações de K^+ no sangue exposto ao ambiente e no sangue ingerido pelo flebotomíneo estão resumidas no **quadro 27**.

Quadro 27 - Concentrações de potássio (K^+) no sangue exposto ao meio ambiente e após ser ingerido por fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

| Tempo após coleta ou ingestão do sangue | $[K^+]$ no sangue exposto (em mM) | $[K^+]$ no sangue no intestino (em mM) | Comparação entre o sangue exposto e o sangue no interior do intestino (t Student) |
|--|-----------------------------------|--|---|
| 0 - 4h | $5,5 \pm 3,6$ (n=3) | $44,6 \pm 26,6$ (n=3) | $p = 0,065$ |
| 24h - 50h | $7,9 \pm 4,8$ (n=5) | $164,3 \pm 41,9$ (n=4) | $p < 0,0001$ |
| Comparação entre 0 - 5h e 26 - 30h após coleta ou ingestão (t Student) | $p = 0,47$ | $p = 0,008$ | |

Os resultados do **Quadro 27** mostram que 24h horas após a ingestão, a concentração de potássio do sangue no interior do intestino é significativamente maior do que no sangue exposto ao meio ambiente. Segundo as medidas realizadas, o sangue exposto ao meio ambiente apresenta concentrações de potássio próximas àquelas observadas normalmente no sangue dos mamíferos (~5,0mM) (Lewis, 1996). Esta concentração não se altera significativamente, se mantendo próxima a 8,0mM mesmo decorridas 24h após a coleta do sangue. Entretanto, no interior do intestino, o potássio aumenta de 44,6 mM para 164,3 mM 24h após ingestão do sangue. O aumento de potássio observado exclusivamente no sangue ingerido pelo inseto tem uma origem muito provável: no interior do intestino, a digestão do sangue que se inicia com o rompimento das hemácias faz com que o potássio existente em alta concentração no interior das células sanguíneas seja liberado no lúmen intestinal, aumentando sua concentração neste local.

Também foram realizadas medidas da concentração do íon sódio (Na^+) tanto no sangue exposto ao meio ambiente, quanto no sangue ingerido por fêmeas de flebotomíneos, em períodos que variaram de 0 a 5h ou 26 a 30h após coleta ou ingestão do sangue. Os resultados estão resumidos no **Quadro 28**.

Quadro 28 - Concentrações de sódio (Na^+) no sangue exposto ao meio ambiente e no sangue após ser ingerido por fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*

| Tempo após coleta ou ingestão do sangue | $[\text{Na}^+]$ no sangue exposto (em mM) | $[\text{Na}^+]$ no sangue no intestino (em mM) | Comparação entre o sangue exposto e no interior do intestino (t Student) |
|--|---|--|--|
| 0 - 5h | $142,6 \pm 7,2$ (n=4) | $170,2 \pm 51,3$ (n=5) | $p = 0,328$ |
| 26 - 30h | $133,5 \pm 4,8$ (n=3) | $101,7 \pm 9,3$ (n=5) | $p = 0,002$ |
| Comparação entre 0 - 5h e 26 - 30h após coleta ou ingestão (t Student) | $p = 0,12$ | $p = 0,02$ | |

Os resultados do **quadro 28** mostram que as concentrações de sódio medidas no sangue humano exposto ao meio ambiente e no sangue ingerido pelo inseto até 5h após coleta e ingestão,

respectivamente, são semelhantes às aquelas normalmente encontradas no sangue de mamíferos (130 a 145mM) (Lewis, 1996). Entretanto, no interior do intestino a concentração de sódio do sangue em digestão diminuiu significativamente (de $133,5 \pm 4,8$ para $101,7 \pm 9,3$ mM), indicando um provável transporte de íons Na^+ do sangue ingerido para o interior das células intestinais. É provável que no intestino médio do flebotomíneo, parte do sódio captado pela célula intestinal volte para o lúmen sendo trocado por H^+ (antiporte H^+ / Na^+) o que poderia levar a alcalinização observada ao longo da digestão do repasto sanguíneo. Uma boa parte do sódio pode também ser excretada na urina pelos túbulos de Malpighi.

5.6 - pH intestinal e tempo de digestão do sangue em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* naturalmente infectadas em cães com leishmaniose

Foram realizados exames do conteúdo intestinal de 42 flebotomíneos que se alimentaram em cães infectados com *Leishmania*. Entre 20 e 24h após repasto, foi observada a presença de formas promastigotas do protozoário no intestino médio de 30% (n = 10) das fêmeas. No conteúdo intestinal das fêmeas examinadas entre 30 e 76h após o repasto, foi possível observar formas promastigotas em 91% dos intestinos (n = 32). Desta forma, decidiu-se por realizar as medidas de pH intestinal entre 30 e 52 horas após o repasto infectante. O pH intestinal de sete insetos infectados (dos 42 espécimes examinados) foi medido com o uso de microeletrodos H^+ sensíveis. Utilizando esta mesma metodologia, foram realizadas medidas do pH intestinal em flebotomíneos não infectados, alimentados com o sangue de hamsters. Estas medidas de pH realizadas no presente trabalho, em conjunto com as medidas realizadas por Santos e colaboradores (2008) nas mesmas condições, são mostradas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - pH no intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas e não infectadas por *Leishmania*

| pHs medidos no intestino médio abdominal 30 a 52h após repasto | | |
|---|------------------------------|--------------------------|
| | Flebotomíneos não infectados | Flebotomíneos infectados |
| Média \pm Desvio Padrão | 7,51 \pm 0,21 (n=7) | 6,99 \pm 0,16 (n=7) |
| Estatística (t Student) | $p = 0,0002$ | |

A **tabela 1** mostra que com a presença de *Leishmania*, o pH no intestino médio abdominal de *L. longipalpis* entre 30 e 52h após o repasto sanguíneo se mostra significativamente menor (pH \sim 7,0) do que em fêmeas não infectadas (pH \sim 7,5) (Santos et al., 2008). É possível que tal acidificação observada no intestino dos flebotomíneos infectados esteja relacionada à metabolização de carboidratos, e conseqüente produção de metabólitos ácidos pelo protozoário em fase de multiplicação, fato observado anteriormente por Darling e colaboradores (1987) em meio de cultura.

Dentre os 42 flebotomíneos que se alimentaram em um cão infectado com *Leishmania*, 21 ingeriram o corante azul de bromotimol, e o pH no intestino médio destes insetos foi medido após a eliminação dos restos de sangue (**Quadro 29**)

Quadro 29 - pH no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após a digestão do sangue, 6 dias após a infecção por *Leishmania*

| Intervalos de pH | Número de observações em cada porção do tubo digestivo | | |
|------------------|--|---------------------------|-------------|
| | Intestino médio torácico | Intestino médio abdominal | Divertículo |
| pH \leq 6,0 | 20 | 20 | 4 |
| pH $>$ 6,0 | 1 | 0 | 12 |
| Total (n) | 21 | 20 | 16 |

Os resultados do **Quadro 29** mostram que tanto no intestino médio torácico, quanto no intestino médio abdominal das fêmeas infectadas, foi encontrado um pH \leq 6,0 após a eliminação

dos restos não digeridos do sangue. Isso indica que o mecanismo de acidificação, diferentemente da manutenção do pH alcalino (**Tabela 1**), não foi afetado pela presença de *Leishmania* no intestino médio. Entretanto, o corante utilizado para essas medidas não permite afirmar se o pH foi ajustado para pH 6,0 precisamente, ou se alcançou pHs menores do que pH 6,0. Medidas de pH em *L. longipalpis* infectadas utilizando o corante púrpura de bromocresol ($pK_a=6,3$) poderão informar se a presença do protozoário no intestino médio é capaz de promover uma acidificação extra, além daquela observada normalmente em flebotomíneos não infectados. O **Quadro 29** mostra ainda que, no divertículo dos insetos infectados, o pH se mantém maior do que 6,0 (próximo ao pH inicial da solução ingerida) na grande maioria dos casos. Este resultado era esperado mesmo para fêmeas infectadas, uma vez que os protozoários não têm acesso a esta porção do tubo digestivo, inviabilizando mudanças perceptíveis de pH no divertículo. Além disso, Santos e colaboradores (2008) já observaram que em fêmeas de *L. longipalpis* não infectadas, não parece haver nenhum mecanismo ativo capaz de ajustar o pH no divertículo esofágico.

Para verificar se haveria alteração do tempo de digestão entre flebotomíneos infectados e não infectados com *Leishmania*, um grupo de insetos fez o repasto sanguíneo em um cão não infectado, e outro grupo ingeriu sangue de um cão livre de infecção. Setenta e três horas após o repasto, os flebotomíneos dos dois grupos tiveram seus intestinos dissecados, e foi observado se ainda havia restos de sangue não digerido em seus intestinos (**Quadro 30**).

Quadro 30 - Eliminação dos restos de sangue do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas e não infectadas por *Leishmania*

| Restos alimentares presentes | Número de intestinos Observados entre 73 e 76h após repasto sanguíneo | |
|------------------------------|---|------------|
| | Não infectados | Infectados |
| Sim | 4 | 13 |
| Não | 14 | 7 |
| Total (n) | 18 | 20 |
| Estatística (Fisher) | $p = 0,01$ | |

O **Quadro 30** mostra que entre os insetos infectados, uma proporção significativamente maior de intestinos ainda apresentava sangue em digestão 73h após o repasto sanguíneo, quando comparada com a proporção observada no grupo dos flebotomíneos não infectados. Este resultado pode ser um indício de que a presença de *Leishmania* ocasiona um atraso na digestão do sangue. Possivelmente, a acidificação observada no intestino médio abdominal dos insetos infectados (**Tabela 1**) é um dos fatores responsáveis pela demora na digestão do repasto sanguíneo, uma vez que um pH mais ácido diminui a eficiência das enzimas proteolíticas dos flebotomíneos, que atuam melhor em pHs acima de pH 7,0 (Dillon e Lane, 1993a).

6 DISCUSSÃO

Larvas de flebotomíneos, mosquitos, e de outros dípteros ingerem alimento continuamente, e este é digerido e absorvido ao longo do intestino médio. Nestes casos, não há a necessidade de mudanças fisiológicas no tubo digestivo, exceto durante a muda, período no qual a larva pára de se alimentar (Lehane et al., 1995). Entretanto, os dípteros hematófagos adultos devem sofrer drásticas mudanças fisiológicas quando se alimentam do sangue do hospedeiro. Fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas somente com açúcares mantêm um pH próximo de 6,0 no intestino médio, pH adequado para a digestão dos carboidratos. No entanto, ocorre alcalinização do pH para pH 8,15 na porção abdominal do intestino médio, após o flebotomíneo ingerir o sangue do hospedeiro (Santos et al., 2008). Acredita-se que este aumento de pH somente seja viabilizado, após a desativação do eficiente mecanismo de manutenção do pH 6,0. A desativação da manutenção do pH 6,0 deve estar aliada à presença de um estímulo capaz de disparar a alcalinização do pH no intestino médio abdominal após a ingestão do repasto sanguíneo.

O método para investigação do controle do pH intestinal desenvolvido no presente trabalho é simples, reprodutível, e pode ser utilizado para estudar outros parâmetros fisiológicos, como a influência de diferentes estímulos sobre a atividade enzimática no tubo digestivo do inseto. A **Tabela 2** sumariza as principais substâncias testadas como possíveis estímulos para a alcalinização do intestino médio abdominal.

Tabela 2 - pH do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* após ingestão de diferentes substâncias

| Substância Ingerida | pH antes da ingestão | Intervalo de pH observado com maior frequência após a ingestão | | | |
|---|----------------------|--|-------|---------------------------|-------|
| | | Intestino Médio Torácico | | Intestino Médio Abdominal | |
| | | < 6,5 | ≥ 6,5 | < 6,5 | ≥ 6,5 |
| Solução Fisiológica para Insetos (SFI) sem tamponamento (CONTROLE) | ~7,0 | X | | X | |
| Solução Fisiológica para Insetos (SFI) + tampão MES 30mM (CONTROLE) | 6,0 | X | | X | |
| Solução Fisiológica para Insetos (SFI) + tampão HEPES 30mM (CONTROLE) | 7,4 | X | | X | |
| Aminoácidos a 5,0 mM em SFI sem tamponamento | 6,0 | X | | X | |
| Aminoácidos a 5,0 mM em SFI + tampão HEPES 30 mM | 6,0 | X | | X | |
| Aminoácidos a 5,0 mM em SFI + tampão HEPES 30mM | 7,4 | X | | X | |
| Aminoácidos a 172 mM em SFI sem tamponamento | 7,4 | | X* | | X* |
| Peptona a 1% em SFI sem tamponamento | 6,0 | X | | X | |
| Peptona a 2% em SFI sem tamponamento | 7,4 | X | | X | |
| Soro total | 6,0 | X* | | | X* |
| Soro total | 7,4 | X* | | | X* |
| Soro total + tampão MES 30 mM | 6,0 | | X* | | X |
| Soro dialisado em SFI | 6,0 | X* | | | X |
| Soro dialisado em SFI | 7,4 | X | | | X |
| Soroalbumina 5% em SFI sem tamponamento | 6,0 | | X* | | X* |
| Soroalbumina 5% + tampão MES 30 mM | 6,0 | | X* | | X* |
| Soroalbumina 5% em SFI sem tamponamento | 7,4 | X | | | X* |
| Lisoziima íntegra 5% sem tamponamento | 6,0 | X | | | X* |
| Lisoziima íntegra 5% em SFI + tampão MES 30 mM | 6,0 | X | | | X* |
| Lisoziima íntegra 5% sem tamponamento | 7,4 | X | | | X* |
| Lisoziima digerida 2,5% em SFI + Tampão | 6,0 | X | | | X* |
| Caseína 5% em SFI | 7,4 | X | | X* | |

* Diferença significativa entre as frequências de pH em cada intervalo (< 6,5 ou ≥ 6,5) quando comparado ao seu respectivo controle

De acordo com Adibi e Mercer (1973), Baertl et al. (1974), Delaporte et al. (1978) e Maclean et al. (1983), as concentrações de aminoácidos livres no plasma humano são 3.2, 9.1, 2.5 e 2.5 mM (média = 4.3 mM). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os aminoácidos, nas concentrações normalmente encontradas no plasma, não foram capazes de disparar a alcalinização no intestino médio abdominal (**Tabela 2**). A concentração de 172 mM que foi capaz de aumentar o pH intestinal (**Tabela 2**) só estaria disponível para o inseto muitas horas após o início da digestão do repasto. Portanto, é razoável especular-se que altas concentrações de aminoácidos podem estar envolvidas na manutenção do pH alcalino, mas somente após um disparo prévio da alcalinização. As proteínas, ao contrário dos aminoácidos, foram perfeitamente capazes de disparar o aumento de pH intestinal, mesmo em concentrações relativamente baixas (**Tabela 2**). Isto indica que a presença de proteínas, por si só, constitui um estímulo primário para a alcalinização do intestino médio abdominal. Durante a investigação do efeito alcalinizante da soroalbumina e da lisozima, estas proteínas foram ingeridas em pH 6,0 tamponado com MES (**Tabela 2**). Os resultados obtidos nessa investigação mostraram que não só ocorreu a desativação da manutenção do pH 6,0 pelas proteínas, mas, ao mesmo tempo, um mecanismo de alcalinização prontamente entrou em funcionamento. Este mecanismo, vislumbrado anteriormente no trabalho de Santos et al. (2008), foi suficiente o bastante para superar o tamponamento da solução ingerida, e alcalinizar o pH para $\text{pH} \geq 6,5$. Quando os flebotomíneos ingeriram soluções de albumina e lisozima em pH 6,0, houve alcalinização do intestino médio abdominal para $\text{pH} \geq 7,0$ em 80 % das observações (dados não mostrados). Portanto, em uma situação natural, a volatilização do CO_2 (ver introdução) e o mecanismo de alcalinização dependente de proteínas descrito no presente trabalho devem funcionar em conjunto, ocasionando o aumento do pH para 8,15 observado em *L. longipalpis* após a ingestão do sangue (Santos et al., 2008).

De uma maneira geral, somente a porção abdominal do intestino médio sofreu alcalinização frente à ingestão das proteínas, o que já era esperado de acordo com as observações

de Santos e colaboradores (2008). Entretanto, nos experimentos em que os insetos ingeriram soroalbumina (tamponada ou não), soro total tamponado, e aminoácidos em concentração elevada (**Tabela 2**), ocorreu alcalinização do intestino médio torácico, quando se esperava que esta parte do intestino mantivesse constantemente o pH próximo de 6,0. Tal resultado leva a crer que o mecanismo de manutenção do pH 6,0 no intestino médio torácico ocorre independentemente do disparo da alcalinização no intestino médio abdominal, visto que um mesmo estímulo capaz de provocar a alcalinização esperada para a porção abdominal, interfere na manutenção do pH ácido na porção torácica do intestino médio. Essa tendência observada em alguns dos experimentos realizados no presente trabalho, provavelmente reflete diferenças fisiológicas e morfológicas entre as duas porções do intestino médio de *L. longipalpis*, as quais são responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes diferentes (carboidratos e proteínas).

Inicialmente, era esperado que somente proteínas presentes no sangue disparassem a alcalinização do intestino médio. Entretanto, o aumento de pH observado com a ingestão de lisozima e caseína mostrou que o mecanismo de alcalinização pode ser disparado inespecificamente pela presença de diferentes proteínas no lúmen intestinal. Um padrão similar de reconhecimento de proteínas foi observado por Blakemore e colaboradores (1995) em preparações de intestino da mosca hematófaga *Stomoxys calcitrans*. No caso da mosca, demonstrou-se *in vitro*, que vários tipos de proteínas estimularam a secreção da enzima tripsina, ao passo que aminoácidos, pequenos peptídeos, ou poli-L-aminoácidos não apresentaram tal efeito. O contato entre determinados padrões íntegros das proteínas e as células da parede intestinal parece ser necessário para induzir uma resposta efetiva, uma vez que proteínas solúveis estimularam a produção de enzimas digestivas, mas proteínas insolúveis (desnaturadas) não apresentaram este efeito em *Aedes* (Lehane et al., 1995). Não se sabe se o processo de alcalinização e a indução de enzimas digestivas são controlados por um mesmo mecanismo, mas estes são eventos que ocorrem concomitantemente no intestino médio de *L. longipalpis*.

No presente trabalho, praticamente descarta-se a hipótese do choque osmótico ser o estímulo indutor da alcalinização do intestino médio abdominal, uma vez que as mesmas proteínas que foram capazes de estimular a alcalinização quando ingeridas, não apresentaram tal efeito quando aplicadas externamente em intestinos dissecados. Curiosamente, a aplicação externa da lisozima em intestinos ácidos parece ter contribuído para que o pH se mantivesse próximo a pH 6,0 na parte torácica do intestino (**Quadro 10**). Outros experimentos devem ser realizados para confirmar se a adição de proteínas via hemolinfa poderia participar do controle do pH no intestino médio torácico.

O fato do contato das proteínas com a membrana basal de intestinos dissecados não ter estimulado a alcalinização do lúmen intestinal (**Quadros 9 e 10**) indica que a interação entre as proteínas e o intestino deve se dar na porção apical das células (voltada para o lúmen intestinal), sendo portanto estimulada, somente quando as proteínas são ingeridas pelo flebotomíneo. Esta hipótese também está de acordo com o fato de que no inseto vivo, as proteínas da hemolinfa estão em constante contato com a membrana basal do intestino, e isso não leva a uma alcalinização permanente do lúmen intestinal. É importante enfatizar que os intestinos utilizados nestes experimentos, mesmo dissecados, não permitiam a entrada de proteínas no lúmen, porque tanto o esfíncter anal, quanto a válvula do estomodeu permanecem fechados durante os testes.

Diante dos resultados, é pouco provável que a dilatação do intestino seja um estímulo importante para a alcalinização do pH, uma vez que, mesmo a ingestão de grandes volumes de soluções não implica necessariamente em distensão do intestino. Este fenômeno ocorre, provavelmente, porque os enterócitos do flebotomíneo devem absorver rapidamente parte da água presente nas soluções ingeridas, não permitindo o acúmulo de grandes volumes no intestino médio.

Em larvas de *Manduca sexta*, Clark e colaboradores (1998) propuseram que fatores secretados pela membrana basal do epitélio intestinal são estritamente necessários para uma alcalinização efetiva, uma vez que na ausência do material secretado, não se observa o aumento

de pH esperado para o intestino médio. Aparentemente, uma resposta hormonal mais complexa ocorre no intestino médio de larvas de *Rhynchophorus ferrugineus*. Neste coleóptero, intestinos contendo soluções tamponadas em pHs diferentes dos normalmente observados tiveram seus pHs reajustados para os valores normais, quando em contato com um extrato de epitélio intestinal (Sunitha et al., 1999). Em intestinos médios de *L. longipalpis*, a adição de extrato de epitélio intestinal provocou uma leve alcalinização do pH inicialmente ácido (**Quadro 12**), corroborando os resultados observados no intestino do coleóptero. Duas hipóteses poderiam explicar o fato do efeito do extrato intestinal no flebotomíneo ter sido menos acentuado do que no coleóptero (Sunitha et al., 1999): primeiramente, é possível que o método de obtenção do extrato aqui utilizado não tenha sido eficiente, ou que o grande volume de SFI onde se encontrava o extrato tenha provocado a sua diluição. Uma segunda hipótese seria a de que, no inseto *in vivo*, os peptídeos produzidos pelas células intestinais tenham um efeito complementar ao efeito da ingestão de proteínas, sendo este último, um efector direto do processo de alcalinização do intestino médio abdominal. Neste caso, as proteínas também deveriam interagir diretamente com os enterócitos.

Dentre todos os testes realizados aplicando-se serotonina diretamente em intestinos dissecados, foi observada uma tendência a alcalinização somente na parte abdominal de intestinos médios que já se encontravam em pH 7,4 (**Quadro 14 B**). Esta alcalinização “extra” do intestino médio abdominal difere bastante do efeito de acidificação que a serotonina tem na saliva de *Calliphora vicina* (Schewe et al., 2008). Entretanto, deve-se enfatizar que no caso da mosca, trata-se do lúmen da glândula salivar, local que deve ser acidificado durante a ingestão do alimento. Ao contrário, o intestino médio abdominal do flebotomíneo necessita ser alcalinizado após a ingestão de proteínas. Embora a adição de serotonina não tenha provocado uma alteração acentuada no pH intestinal de *L. longipalpis*, é possível que este hormônio seja responsável pelo aumento do potencial de membrana, que já foi observado no intestino de larvas de *Aedes* (Onken et al., 2009). No flebotomíneo, a ação da serotonina no potencial de membrana deve contribuir

para a manutenção geral das funções fisiológicas. Esta possibilidade pode ser investigada futuramente através da medida do potencial de membrana em intestinos tratados experimentalmente de diferentes maneiras.

Levando-se em consideração os resultados aqui obtidos com os peptídeos ativos e proteínas, e a presença de células endócrinas ao longo do epitélio intestinal do flebotomíneo (Leite e Evangelista, 2001), o presente trabalho sugere a seguinte explicação para o processo de alcalinização ativado após a ingestão de proteínas: As proteínas interagiriam com a membrana apical das células endócrinas, que por sua vez, estão em contato direto com a lâmina basal do intestino. Estas células, estimuladas pela interação com as proteínas ingeridas, liberariam peptídeos para a hemolinfa, e da hemolinfa, estes peptídeos poderiam agir na parte basal dos enterócitos, que seriam ativados para alcalinizar o lúmen intestinal.

Conforme esperado, os resultados mostrados no **Quadro 11** indicam que a enzima anidrase carbônica está envolvida no processo de alcalinização do intestino médio de *L. longipalpis*. Em 2008, Santos e colaboradores já haviam encontrado transcritos para esta enzima no intestino médio do flebotomíneo. Provavelmente, os íons bicarbonato gerados pela ação da anidrase carbônica no citoplasma dos enterócitos são trocados por íons cloreto presentes no lúmen, através de um sistema de antiporte. Antes da ingestão das proteínas, os íons bicarbonato devem permanecer no interior das células intestinais, e o pH se mantém ácido no lúmen. Com a ingestão das proteínas o sistema de transporte do bicarbonato para o lúmen deve ser ativado, ocasionando, portanto, a alcalinização deste local. De acordo com a maioria dos resultados obtidos em *L. longipalpis*, a alcalinização parece ser uma característica exclusiva do intestino médio abdominal. Estes resultados corroboram os achados de del Pilar Corena e colaboradores (2005), que demonstraram uma localização preferencial da anidrase carbônica no intestino médio abdominal de mosquitos adultos. Através do uso de inibidores específicos, estes autores também observaram a participação da anidrase carbônica na alcalinização do intestino do mosquito.

Embora os intestinos médios abdominais de flebotomíneos e mosquitos sejam fisiologicamente semelhantes (ambos se alcalinizam após a ingestão de proteínas), os autores que estudaram o intestino do mosquito presumiram que no caso do culicídeo, o intestino se mantém alcalino o tempo todo. Esta observação é contrária ao que foi observado no flebotomíneo, onde o intestino é rigorosamente mantido ácido na ausência das proteínas. Considerando que nos experimentos de del Pilar Corena e colaboradores (2005), os insetos não ingeriram soluções isentas de proteínas, é provável que eles tenham ativado, não propositalmente, um mecanismo de alcalinização semelhante ao descrito no presente trabalho.

As H^+ V-ATPases são transportadoras de prótons encontradas em quase todas as membranas celulares eucarióticas (Beyenbach e Wieczorek, 2006), e sua atividade possibilita vários processos fisiológicos, inclusive uma intensa alcalinização do pH no tubo digestivo de artrópodes (Wieczorek et al., 2000). A aplicação de um inibidor do funcionamento das H^+ V-ATPases em intestinos dissecados apresentou uma tendência a impedir a manutenção do pH 6,0 no intestino médio abdominal (**Quadro 26**). A inibição das bombas de prótons em *L. longipalpis* talvez não tenha sido mais efetiva porque estas devem ocorrer, majoritariamente, na parte apical das células intestinais, e não na parte basal, onde o inibidor foi aplicado. Esta hipótese é bastante razoável, uma vez que as H^+ ATPases no intestino médio de adultos de *A. aegypti* estão localizadas na membrana apical dos enterócitos (Patrick et al., 2006). Esta porção do intestino do mosquito, assim como no flebotomíneo (Santos et al., 2008), apresenta pH próximo a pH 6,0. De uma maneira geral, os resultados observados em *L. longipalpis* estão de acordo com estudos realizados em glândula salivar de *Calliphora vicina*, onde a atividade de H^+ ATPases está diretamente relacionada com a acidificação do lúmen da glândula (Schewe et al., 2008).

O AMPc é um dos fatores necessários para a ativação das H^+ V-ATPases de glândulas salivares de mosca (Zimmermann et al., 2003; Dames et al., 2006, Schewe et al., 2008). No presente trabalho, o aumento da concentração de AMPc não provocou alteração significativa do pH intestinal, estando este inicialmente ácido ou alcalino (**Quadros 15 a 19**). Entretanto, a

inibição da formação de AMPc apresentou uma tendência a provocar uma alcalinização além da normalmente observada em intestinos de fêmeas alimentadas com soroalbumina (**Quadro 20 B**). Provavelmente, se as substâncias que aumentam ou diminuem a concentração de AMPc nas células intestinais forem testadas via ingestão (e não pela aplicação externa), será possível avaliar a real participação deste segundo mensageiro no controle do pH intestinal em *L. longipalpis*.

As concentrações dos íons sódio e potássio foram medidas no conteúdo intestinal de fêmeas de flebotomíneos em dois períodos após a ingestão do repasto sanguíneo. De acordo com os resultados do **Quadro 27**, a concentração do íon potássio aumentou significativamente, depois de decorridas 24h de digestão do sangue no intestino. Portanto, neste período, há uma grande disponibilidade de potássio livre no intestino médio abdominal, o qual o flebotomíneo poderia utilizar em algum sistema de transporte envolvido na manutenção do pH alcalino no lúmen intestinal. Em contrapartida, as concentrações do sódio diminuiriam significativamente 24h após a ingestão do sangue pelo flebotomíneo (**Quadro 28**). Este resultado permite especular-se que tenha ocorrido a retirada de íons sódio do conteúdo intestinal, possivelmente através de cotransporte com os aminoácidos presentes no lúmen durante a digestão das proteínas do sangue. O transporte de Na^+ entre o lúmen e a célula intestinal parece estar envolvido também na regulação do pH na parte posterior do intestino médio de larvas de *A. gambiae*. No caso do culicídeo, prótons são retirados do lúmen, em troca com íons Na^+ (antiporte $2\text{H}^+/\text{Na}^+$). O sódio inicialmente transportado para o lúmen retornaria às células intestinais, levando consigo os aminoácidos ali presentes, o que possibilita sua absorção (Okech et al., 2008).

Levando-se em consideração os principais resultados observados até o presente momento, foi proposto um modelo que explica, parcialmente, como o pH seria regulado no intestino médio abdominal de *L. longipalpis* em situações fisiológicas distintas: antes e após a ingestão do repasto sanguíneo. O esquema da **Figura 11** mostra o modelo proposto.

Ação hormonal no controle do pH no intestino médio de *L. longipalpis*

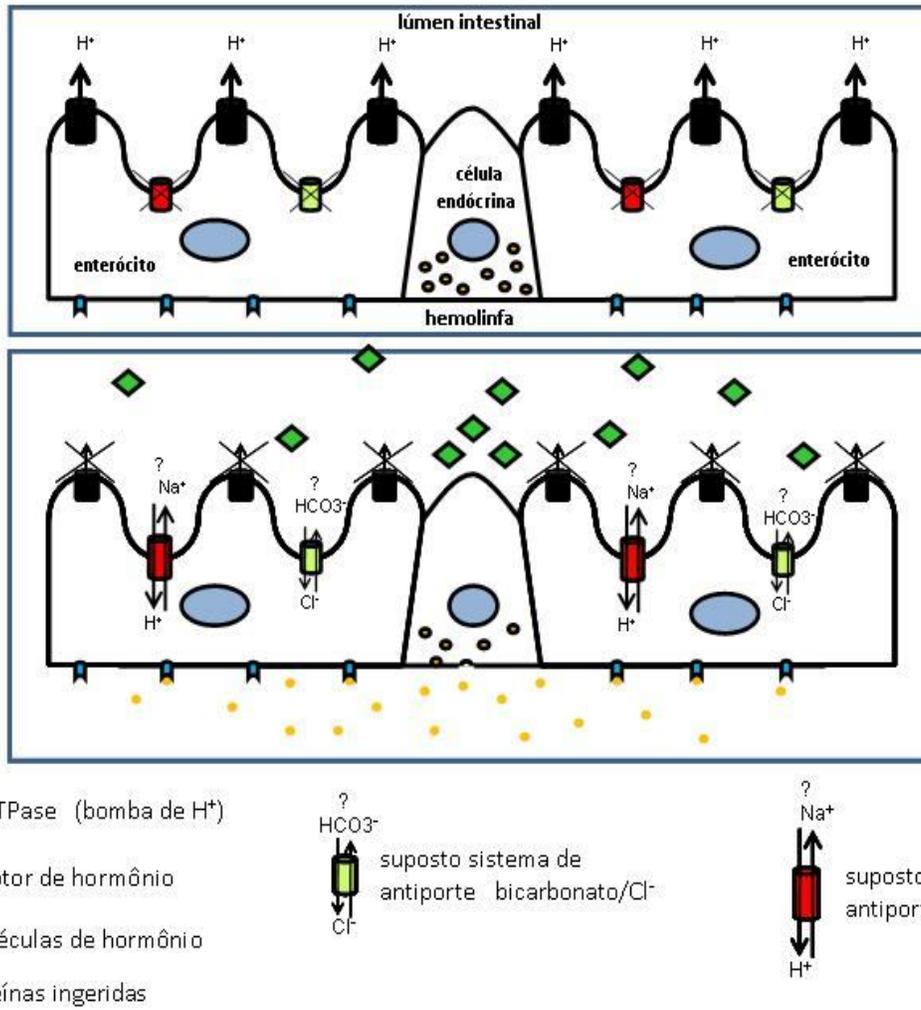


Figura 11 – Esquema do modelo proposto para explicar a regulação do pH no intestino médio abdominal de *Lutzomyia longipalpis*

De acordo com o modelo da **Figura 11**, antes do repasto sanguíneo as H^+ V-ATPases são ativadas mediante um aumento de pH, e consomem ATP para reajustar e manter o pH do lúmen intestinal (pH 6). Nesta situação, os outros possíveis sistemas de transporte de sódio ou bicarbonato estariam desligados. Com a chegada do repasto sanguíneo ao lúmen, as proteínas ingeridas interagiriam com as células endócrinas, estimulando estas a secretarem peptídeos na hemolinfa. Estes peptídeos se ligariam aos receptores basais dos enterócitos adjacentes, e estes então ativariam seus sistemas transportadores, podendo tanto retirar prótons, quanto enviar bicarbonato para o lúmen intestinal, promovendo assim a alcalinização deste local.

O modelo de controle do pH intestinal aqui exposto, não leva em consideração uma possível infecção do flebotomíneo por *Leishmania*. Assim, no presente trabalho, foi iniciado um estudo do pH intestinal em *L. longipalpis* naturalmente infectado com *L. infantum*. As medidas de pH realizadas no intestino médio abdominal mostraram que, entre 30 e 52h após o repasto sanguíneo, o pH se apresenta neutro (pH ~ 7,0) em flebotomíneos infectados com *Leishmania*, e alcalino (pH ~ 7,5) em flebotomíneos livres da infecção (**Tabela 1**). Este resultado corrobora os dados observados em meio de cultivo de *Leishmania*, onde o intenso metabolismo do protozoário promove a liberação de grandes quantidades de catabólitos, que podem acidificar o meio (Darling et al., 1987). Uma acidificação precoce do conteúdo intestinal do flebotomíneo pode estar relacionada ao atraso na eliminação dos restos da digestão em insetos infectados (**Quadro 30**). Observando a atividade de proteases intestinais ao longo da digestão de sangue, Dillon e Lane (1993b) inferiram que ocorre um atraso na digestão enzimática do sangue em fêmeas de *Phlebotomus papatasi* infectadas com *Leishmania major*. De maneira geral, o atraso na digestão do repasto sanguíneo observado em *Lutzomyia* e em *Phlebotomus* poderia ser explicado pelo fato de que a acidificação ocasionada pelos metabólitos do protozoário diminui a eficiência da atividade da tripsina e de outras enzimas digestivas. As medidas de pH realizadas no intestino médio dos flebotomíneos 5 dias após a ingestão do sangue infectado com *Leishmania*, mostraram que o pH é normalmente acidificado para $pH \leq 6,0$ após a eliminação dos restos não digeridos do

sangue (**Quadro 29**). Este dado indica que o mecanismo de acidificação do pH não parece ser afetado pela presença do protozoário, apesar da infecção ter afetado a manutenção do pH alcalino durante a digestão do repasto (**Tabela 1**).

Os resultados concernentes à infecção aqui apresentados são preliminares, e um estudo mais detalhado deverá ser conduzido, para explicar como a presença de *Leishmania* no tubo digestivo pode afetar as funções fisiológicas do intestino de um flebotomíneo infectado.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A soroalbumina presente no sangue dos mamíferos, bem como outras proteínas que normalmente não são ingeridas por *L. longipalpis* foram capazes de desativar o mecanismo que mantém o pH 6,0, e ativaram a alcalinização do pH na porção abdominal do intestino médio.

Não foi possível avaliar o efeito de proteínas parcialmente digeridas na regulação do pH, mas foi observado que a ingestão de aminoácidos livres em concentrações muito superiores às aquelas encontradas no plasma dos vertebrados estimula a alcalinização do pH no intestino médio de *L. longipalpis*.

Substâncias secretadas pelas células intestinais têm participação no processo de alcalinização do intestino médio abdominal. Futuramente, extratos preparados com intestino deverão ser submetidos à cromatografia líquida em fase reversa para purificação das possíveis frações responsáveis pelo efeito no pH intestinal de *L. longipalpis*.

A Serotonina, bem como o AMPc e Cálcio intracelulares parecem não participar diretamente na regulação (acidificação ou alcalinização) do pH no intestino médio de *L. longipalpis*. Ainda assim, pretende-se medir a diferença de potencial entre o lúmen e o citoplasma das células intestinais em condições distintas: nestes experimentos, serotonina deverá ser adicionada ao sistema, para avaliar se ela participa na manutenção da diferença de potencial entre o interior dos enterócitos e o lúmen intestinal.

A atividade de bombas de prótons (H^+ V-ATPases) e da enzima anidrase carbônica estão diretamente envolvidas no controle do pH, uma vez que a inibição destas dificultou o ajuste e/ou a manutenção do pH no intestino médio abdominal de *L. longipalpis*. Futuramente, inibidores de sistemas transportadores de ânions, inibidores do sistema de antiporte H^+/K^+ , e inibidores do transporte de aminoácidos deverão ser testados em diferentes situações fisiológicas, para avaliar se estes sistemas transportadores fazem parte do mecanismo de controle de pH no intestino médio do flebotomíneo.

As concentrações dos íons sódio e potássio no conteúdo do intestino médio abdominal de *L. longipalpis* variam significativamente ao longo da digestão do repasto sanguíneo, indicando que estes íons devem ser transportados entre o lúmen do intestino, e o citoplasma dos enterócitos, podendo, portanto, participar na regulação do pH intestinal do flebotomíneo. Futuramente, as concentrações de Na⁺ e K⁺ devem ser medidas em insetos em diferentes situações fisiológicas, para avaliar se a variação das concentrações destes íons tem relação direta com a variação do pH intestinal. As concentrações do íon cloreto (Cl⁻) também deverão ser medidas durante os experimentos futuros.

A presença da infecção por *Leishmania* no intestino médio abdominal de *Lutzomyia longipalpis* implicou em uma acidificação precoce do pH durante a digestão do sangue, o que pode explicar, em parte, o atraso na eliminação dos restos não digeridos de sangue observado em flebotomíneos infectados. Entretanto, após a digestão do sangue, e eliminação do bolo fecal, a infecção por *Leishmania* não impediu que o pH no intestino médio fosse acidificado para pH 6,0.

Em conclusão, o presente trabalho permitiu determinar alguns dos fatores nutricionais e celulares que participam diretamente do mecanismo de controle do intestino médio abdominal de *Lutzomyia longipalpis*. Os resultados permitiram também, a montagem de um modelo que explica, pelo menos parcialmente, como o intestino do flebotomíneo ajusta o pH luminal frente às variações do seu *status* nutricional.

8 REFERÊNCIAS

ADIBI, S. A.; MERCER, D. W. 1973. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *J. Clin. Invest.* v. 52, p. 1586-1594.

ALEXANDER, B.; USMA, M. C. 1994. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Ann Trop Med Parasitol.* v. 88, n.5, p. 543-549.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. 2004. Canine Leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* v. 57, p.1-88.

ANDRADE-COELHO, C. A.; SANTOS-MALLET, J.; SOUZA, N. A.; LINS, U.; MEIRELLES, M. N. L.; RANGEL, E. F. 2001. Ultrastructural Features of the Midgut Epithelium of Females *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 96, n. 8, p. 1141-1151.

ASHFORD, R. W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281.

BAERTL, J. M.; PLACKO, R. P.; GRAHAM, G. G. 1974. Serum proteins and plasma free amino acids in severe malnutrition. *AM. J. Clin. Nutr.* v.27, p.733-742.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L., BOURDEAU, P.; FERRER L. 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* v. 24, p. 324-330.

BATES, P. A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* v. 37, n. 10, p.1097-1106.

BATES, P. A.; ROGERS. M. E. 2004. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. med.* n. 4, p. 601-609.

BATES, P. A.; TETLEY, L. 1993. *Leishmania mexicana*: Induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acid pH. *Exp. Parasitol.* n. 76, p. 412-423.

BERENBAUM, M. 1980. Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera. *Am. Nat.* n.115, p. 138-1146.

BERRIDGE, M. J. 1977. Cyclic AMP, calcium and fluid secretion. In: B. L. Gupta, R. B. Moreton, J. L. Oschman e B. W. (eds), *Wall Transport of ions and water*. Academic Press, London / New York, p. 225-238.

- BERRIDGE, M. J.; LINDLEY, B.D.; PRINCE, W. T. 1976. Studies on the mechanism of fluid secretion by isolated salivary glands of *Calliphora*. *J. Exp. Biol.* v. 64, n. 2, p. 311-322.
- BEYENBACH, K. W.; WIECZOREK, H. 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Bio.* n. 209, p. 577-589.
- BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Billingsley, P. F.; Lehane, M. J. (eds.), *Biology of the insect midgut*. Chapman & Hall, London, p. 3-30.
- BILLKER, O.; MILLER, A. J.; SINDEN, R. E. 2000. Determination of mosquito bloodmeal pH *in situ* by ion-selective microelectrode measurement: implications for de regulation of malarial gametogenesis. *Parasitol.* n.120, p. 547-551.
- BOROVSKY, D.; SCHLEIN, Y. 1987. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med. Vet. Entomol.* v. 1, n. 3, p. 235-242.
- BOUDKO, D. Y.; MOROZ, L. L.; HARVEY, W. R.; LINSER, P. J. 2001b. Alkalinization by chloride / bicarbonate pathway in larval mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 98, n. 26, p. 15354-15359.
- BOUDKO, D. Y.; MOROZ, L. L.; LINSER, P. J.; TRIMARCHI, J. R.; SMITH, P. J.; HARVEY, W. R. 2001a. In situ analysis of pH gradients in mosquito larvae using non-invasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes. *J. Exp. Biol.* v. 204, n. 4, p. 691-699.
- BRANDON, M. C.; PENNINGTON, J. E.; ISOE, J.; ZAMORA, J.; SCHILLINGER, A. S.; MIESFELD, R. L. 2008. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v. 38, p. 916-22.
- CAVALCANTE, R. R.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. 2003. Anti-complement activity in saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitol.* n. 127, p. 87-93.
- CHAGAS, E. 1936. Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil. *Bras-Méd.* n. 50, p. 221-222.
- CHANLOTIS, B. N. 1974. Sugar-feeding behaviour of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J. Med. Entomol.* n. 11, p. 73-79.
- CHAPMAN, R. F. 1998. Alimentary canal, digestion and absorption. In: R. F. Chapman (ed.). *The Insects: Structure and function*. 4th ed., Cambridge University Press, p. 38-68.
- CHARLAB, R.; RIBEIRO, J.M. 1993. Cytostatic effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenates on *Leishmania* parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 48, n. 6, p. 831-838.

CHARLAB, R.; TESH, R.B.; ROWTON, E.D.; RIBEIRO, J.M. 1995. *Leishmania amazonensis*: sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp. Parasitol.* v. 80, n. 2, p. 167-175.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. 1937. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota Prévia. *Hospital (Rio de Janeiro)*, n. 1, p. 3-9.

CUNNINGHAM, M. L.; TITUS, R. G.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. 2001. Regulation of Differentiation to the infective Stage of the Protozoan Parasite *Leishmania major* by Tetrahydrobiopterin. *Science.* v. 292, p. 285-287.

DADD, R. H. 1975. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. *J. Insect Physiol.* v. 21, n.11, p.1847-1853.

DAMES, P.; ZIMMERMANN, B.; SCHMIDT, R.; REIN, J.; VOSS, M.; SCHEWE, B.; WALZ, B.; BAUMANN, O. 2006. cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H⁺-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* v. 103, n.10, p. 3926-3931.

DARLING T. N.; DAVIS, D. G.; LONDON, R. E.; BLUM, J. J. 1987. Products of *Leishmania braziliensis* glucose catabolism: release of D-lactate and, under anaerobic conditions, glycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.84 (20), p.7129-7133.

DEANE, L. M.; DEANE, M.P. 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 4, p.198-212.

DEANE, L. M.; GRIMALDI, G. 1985. Leishmaniasis in Brazil. In: K.P. Chang, R.S. Bray (eds), *Leishmaniasis*. Elsevier, Amsterdam, p. 247-281.

DELAPORTE, C.; JEAN, G.; BROYER, M. 1978. Free plasma and muscle amino acids in uremic children. *Am. J. Clin. Nutr.* v. 31, p.1647-1651.

DEL PILAR CORENA, M.; VANEKERIS, L.; SALAZAR, M. I.; BOWERS, D.; FIEDLER, M. M.; SILVERMAN, D.; TU, C.; LINSER, P. J. 2005. Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. *J. Exp. Biol.* v. 208, p. 3263-3273.

DESJEUX, P. 2004 Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* n.27, v.5, p. 305-318.

DILLON, R. J.; LANE, R. P. 1993a. Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med. Vet. Entomol.* v. 7, n. 3, p. 225-232.

DILLON, R. J., LANE, R. P. 1993b. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitol. Res.* v.179, n. 492-496.

FAZITO DO VALE, V.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. 2007. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Insect. Physiol.*v.53, n.11, p.1151-1159.

FERRO, C.; PARDO, R.; TORRES, M.; MORRISON, A. C. 1997. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J. Med. Entomol.* n. 34, p. 719-728.

GEMETCHU, T. 1974. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera:Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* n. 68, p. 111-124.

GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C; CAMPOS, M. A. 2004. Role of Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol. Review*, v. 201, p. 9-24.

GENARO, O.; DA COSTA, C. A.; WILLIAMS, P.; SILVA, J. E.; ROCHA, N. M.; LIMA, S. L.; MAYRINK, W. 1990. Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 23, n.2, p.121.

GIANNINI, M. S. 1974. Effects of promastigotes growth phase, frequency of subculture and host age on promastigote-initiated infections in *Leishmania donovani* in the gold hamster. *J. Protoz.* n. 21, p. 521-527.

GIBBON, B. C.; KROPF, D. L. 1993. Intracellular pH and its regulation in *Pelvetia zygotes*.*Dev. Biol.* n. 57, p. 259-268.

GONTIJO, N. F., ALMEIDA-SILVA, S., COSTA, F. F., MARES-GUIA, M. L., WILLIAMS, P. e MELO, M. N. 1998. *Lutzomyia longipalpis*: pH in the Gut, Digestive Glycosidases, and Some Speculations upon *Leishmania* Development. *Exp. Parasitol.* n. 90, p. 221-219.

GOSSAGE, M. S.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sandflies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* v. 33, p. 1027-1034.

HANDMAN, E. 2000 Cell biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.* v.44, p. 1-39.

HANDMAN, E., BULLEN, D. V. 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* v. 18, n. 8, p. 332-334.

HARRISON, J. F.; PHILLIPS, J. E. 1992. Recovery from Acute Haemolymph Acidosis in Unfed Locust II. Role of Ammonium and Titratable Acid Excretion. *J. Exp. Biol.* v. 165, p. 97-110.

HARSHINI, S.; NACHMAN, R. J.; SREEKUMAR, S. 2002. In vitro release of digestive enzymes by FMRF amide related neuropeptides and analogues in the lepidopteran insect *Opisina arenosella* (Walk.). *Peptides.* v. 23, n. 10, p.1759-1763.

HARVEY, W. R. (2009) Voltage coupling of primary H⁺ V-ATPases to secondary Na⁺- or K⁺-dependent transporters. *J. Exp. Biol.* v. 212, p. 1620-1629.

HERTIG, M.; MCCONNEL, E. 1963. Experimental infection of Panamanian *Phlebotomus sandflies* with *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* v.14, p. 92-106.

HERWALDT, B. L. 1999. *Leishmaniasis. Lancet.* v. 354, n. 9185, p. 1191-1199.

JEFFERIES, D.; LIVESEY, J. L.; MOLYNEUX, D. H. 1986. Fluid mechanics of bloodmeal uptake by *Leishmania*-infected sandflies. *Acta Trop.* v.43, n.1, p. 43-53.

JOBLING, B. 1987. Anatomical drawings of biting flies. British Museum (Natural History). p. 17-46.

KAMHAWI, S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* v. 22, n. 9, p. 439-445.

KAMHAWI S.; RAMALHO-ORTIGAO, M.; PHAM, V. M.; KUMAR, S.; LAWYER, P. G.; TURCO, S. J.; BARILLAS-MURY, C.; SACKS, D. L.; VALENZUELA, J. G. 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell.* v. 119, p. 329-341.

KAUFMANN, L.; SCHURMANN, F.; YIALLOUROS, M.; HARREWIJN, P.; KAYSER, H. 2004. The serotonergic system is involved in feeding inhibition by pymetrozine. Comparative studies on the locust (*Locusta migratoria*) and on an aphid (*Myzus persicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* v. 138, p. 469 - 483.

KILLICK-KENDRICK, R. 1979. The biology of *Leishmania* in phlebotomine sand flies. In: Lumsden, W. H. R.; Evans, D. A. (eds). *Biology of kinetoplastida, vol. II.* Acad. Press, London / New York, p. 395-460.

KILLICK-KENDRICK, R. 1990. The life cycle of *Leishmania* in the sand fly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* n. 65 (Suppl 1) p. 37-42.

KILLICK-KENDRICK, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* n. 17, p. 279-289.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. 1974 *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* v. 187, n. 1089, p. 409-419.

KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. 1991. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* n. 66 (Suppl 1), p.71-74.

LAINSON, R. 1988. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* v. 321, n. 1207, p. 389-404.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 100, n. 8, p. 811-827.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* v.199, p. 309–320.

LAINSON, R.; READY, P.D.; SHAW, J.J. 1979. *Leishmania* in phlebotomid sand flies. VII. On the taxonomy status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian ‘uta’, as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* v. 206, n. 1164, p. 307-318.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. 1987. Infective stages of *Leishmania* in sandfly vector and some observations of the mechanism of transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* n. 82, p. 421-424.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. 1977. Experimental transmission of *Leishmania chagasi* causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature.* n. 266, p. 628-630.

LANG, T.; WARBURG, A.; SACKS, D. L.; CROFT, S. L.; LANE, R. P.; BLACKWELL, J. M. 1991. Transmission and scanning EM-immunogold labeling of *Leishmania major* lipophosphoglycan in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Eur. J. Cell Biol.* v. 55, n. 2, p. 362-372.

LEITE, A. C.; EVANGELISTA, L. G. 2001. Ultrastructure of endocrine cells from the abdominal midgut epithelium of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* v. 38, n. 5, p. 749-752.

LENT, C. M.; DICKINSON, N. H. 1988. The neurobiology of feeding in leeches. *Sci. Am.* v. 256, p. 98-103.

LEWIS, J. H. 1996. Laboratory methods and test parameters. In: LEWIS, J.H (ed.) Comparative hemostasis in vertebrates. Plenum Press- New York and London. p.17-25.

- LI, A.; SOWDER, R. C.; HENDERSON, L. E.; MOORE, S. P.; GARFINKEL, D. J.; FISHER, R. J. 2001. Chemical Cleavage at Aspartyl Residues for Protein Identification. *Anal. Chem.* v. 73, p. 5395-5402
- LONG, T. F.; MURDOCK, L. L. 1983. Stimulation of blowfly feeding behaviour by octopaminergic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v. 80, p. 4159-4163.
- MACLEAN, W. C. JR.; GRAHAM, G. G.; PLACKO, R. P.; LOPEZ DE ROMAÑA, G. 1983. Plasma free amino acids in children consuming lupin protein with and without methionine supplementation. *J. Nutr.* v.113, p.779-785.
- MAHMOOD, F.; BOROVSKY, D. 1992. Biosynthesis of trypsinlike and chymotrypsinlike enzymes in immature *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* v. 29, n. 3, p. 489-495.
- MAHOMOOD, F.; BOROVSKY, D. 1993. Biosynthesis of serine proteases in *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, n. 30, p. 683-688.
- MACNEIL, S.; LAKEY, T; TOMLINSON, S. 1985. Calmodulin regulation of adenylate cyclase activity. *Cell calcium*, v.6, p. 213-226.
- MCCONVILLE, M. J.; TURCO, S. J.; FERGUSON, M. A.; SACKS, D. L. 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J.* v.11, n.10, p. 3593-3600.
- MELO, M. N. 1982. Cultivo de *Leishmania* em meio definido. Estudos de suas exigências nutricionais. Tese de Doutorado, Departamento de Parasitologia - ICB - UFMG.
- MÉNDEZ, S.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J.; DE LA FUENTE, C.; CUQUERELLA, M.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; ALUNDA, J. M. 1999. Partial anaerobiosis induces infectivity of *Leishmania infantum* promastigotes. *Parasitol. Res*, v. 85, p. 507-509.
- MODI, G. B.; TESH, R. B. 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* n. 20, p. 568-569.
- MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters, W. (ed). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, p. 121-176.
- MOLYNEUX, D. H.; MOORE, J.; MAROLI, M. 1991. Sugars in sand flies. *Parasitol.* v. 33 (Suppl.1), p. 431-436.

NÄSSEL, D. R. 1988. Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. *Progr. Neurobiol.* v. 30, p. 1-85.

OKECH, B. A.; BOUDKO, D. Y.; LINSER, P. J.; HARVEY, W. R. 2008. Cationic pathway of pH regulation in larvae of *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* v. 211, p. 957-968.

ONKEN, H.; MOFFETT, D. F. (2009) Revisiting the cellular mechanisms of strong luminal alkalization in the anterior midgut of larval mosquitoes. *J. Exp. Biol.* v. 212, p. 373-377.

ONKEN, H., PATEL, M., JAVORONCOV, M., IZEIROVSKI, S., MOFFETT, S. B., MOFFETT, D. F. (2009) Strong alkalization in the anterior midgut of larval yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*): involvement of luminal Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Exp. Zoology.* v. 311, p. 155-161.

ORCHARD, I. 2006 Serotonin: a coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* v. 144(3), p. 316-324.

PATRICK, M. L.; AIMANOVA, K.; SANDERS, H. R.; GILL, S. S. 2006. P-Type Na⁺/K⁺-ATPase and V-Type H⁺-ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes Aegypti*. *J. Exp. Biol.* v. 209, p. 4638-4651.

PIMENTA, P. F.; MODI, G. B.; PEREIRA, S. T.; SHAHABUDDIN, M.; SACKS, D. L. 1997. A novel role of the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitol.* v. 115, p. 359-369.

PIMENTA, P. F.; SARAIVA, E. M.; ROWTON, E.; MODI, G. B.; GARRAWAY, L. A.; BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J.; SACKS, D. L. 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 91, n. 19, p. 9155-9159.

PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J.; MCCONVILLE, M. J.; LAWYER, P. G.; PERKINS, P. V.; SACKS, D. L. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science.* v. 256, n. 5065, p. 1812-1815.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.; DYE, C. 1997. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitol.*, v. 15, p. 143-156.

RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; KAMHAWI, S.; JOSHI, M. B.; REYNOSO, D.; LAWYER, P. G.; DWYER, D. M. SACKS, D. L.; VALENZUELA, J. G. 2005. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect. Mol. Biol.* v. 14, n. 6, p. 703-712.

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

RHEAULT, M. R.; OKECH, B. A.; KEEN, S. B. W.; MILLER, M. M.; MELESHKEVITCH, E. A.; LINSER, P. J.; BOUDKO, D. Y.; HARVEY, W. R. (2007) Molecular cloning, phylogeny and localization of AgNHA1: the first Na⁺/H⁺ antiporter (NHA) from a metazoan, *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.*; v. 210, p. 3848-3861.

RANGEL, E. F.; SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F.; ANDRADE, C. A. 1986. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz and Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), under experimental conditions. Feeding aspects of larvae and adults. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* n. 81, p.431-438.

REIN, J.; ZIMMERMANN, B.; HILLE, C.; LANG, I. WALZ, B.; BAUMANN, O. 2006 Fluorescence measurements of serotonin-induced V-ATPase-dependent pH changes at the luminal surface in salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J. Exp. Biol.* v. 209 (Pt 9), p. 1716-1724.

RIBEIRO, J. M. 1987a. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu. Ver. Entomol.* n. 32, p. 463-478.

RIBEIRO, J. M. 1987b. Vector salivation and parasite transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* n. 82 (Suppl 3), p. 1-3.

RIBEIRO, J. M.; VACHEREAU, A.; MODI, G. B.; TESH, R. B. 1989. A novel vasodilatatory peptide from salivary glands of sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science.* n. 243, p. 212-214.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology.* n. 124 (Pt 5), p. 495-507.

ROGERS, M.; KROPF, P.; CHOI, B.; DILLON, R.; PODINOVSKAIA, M.; BATES, P.; MÜLLER, I. 2009. Proteophosphoglycans Regurgitated by *Leishmania*-Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. *PLoS Pathog.* v. 5, n. 8.

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A.; BATES, P. A. 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature.* v. 450, p. 463-467.

ROMERO, M. F.; HENRY, D.; NELSON, S.; HARTE P. J.; DILLON, A. K.; SCIORTINO, C. M. 2000. Cloning and Characterization of a Na⁺ - driven Anion Exchanger (NDAE1). *J. Biol. Chem.* v. 275, (Is 32), p. 24552-24559.

RUDIN, W.; HECKER, H. 1982. Functional morphology of the midgut of a sandfly as compared to other hematophagous nematocera. *Tiss. Cell.* v. 14, n. 4, p. 751-758.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. 1985. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 34, n.3, p. 456-459.

SACKS, D. L.; PIMENTA, P. F. ; MCCONVILLE, M. J.; SCHNEIDER, P.; TURCO, S. J. 1995. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* v. 181, n. 2, p. 685-697.

SACKS, D. L.; MODI, G.; ROWTON, E.; SPATH G.; EPSTEIN, L.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S.M. 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 97, n. 1, p.406-411.

SACKS, D.L. 2001. *Leishmania* -Sandfly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol.* v. 3, n. 4, p. 189-196.

SAMIE, M.; WALLBANKS, K.R.; MOORE, J.S.; MOLYNEUX, D.H. 1990. Glycosidase activity in Sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 96 B, p. 577-579.

SANTOS, V. C.; ARAUJO, R. N; MACHADO, L. A.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. 2008. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J. Exp. Biol.* v. 211(Pt 17). p. 2792-2798.

SARAIVA, E. M. B.; PIMENTA, P. F. P.; BRODIN, T. N.; ROWTON, E.; MODI ,G. B.; SACKS , D. L. 1995. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, v. 111, p. 275-287.

SCHEWE, B.; SCHMÄLZLIN, E.; WALZ, B. 2008. Intracellular pH homeostasis and serotonin-induced pH changes in *Calliphora* salivary glands: the contribution of V-ATPase and carbonic anhydrase. *J. Exp. Biol.* v. 211(Pt 5), p. 805-815.

SCHLEIN, Y. 1986. Sandfly diet and *Leishmania*. *Parasitol. Today.* v. 2, n. 6, p. 175-177.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON R. L.; MESSER, G. 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 89, n. 20, p. 9944-9948.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L. ; SHLOMAI, J. 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc. Biol. Sci.* v. 245, n. 1313, p. 121-126.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L. 1998. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitol.* v. 117, n. 5, p. 467-473.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L. 1994. Haemoglobin inhibits the development of infective promastigotes and chitinase secretion in *Leishmania major* cultures. *Parasitol.* v. 109, p. 23-28.

SCHLEIN, Y.; ROMANO, H. 1986. *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae). *Exp. Parasitol.* v. 62, n. 3, p. 376-380.

SCHLEIN, Y.; WARBURG, A. 1986. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J. Med. Entomol.*, v.23, p.11-15.

SECUNDINO, N. F.; EGER-MANGRICH, I. BRAGA, E. M.; SANTORO, M. M.; PIMENTA, P. F. 2005. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J. Med. Entomol.* v. 42, p. 928-938.

SECUNDINO, N.; KIMBLIN, N.; PETERS, N. C.; LAWYER, P.; CAPUL, A. A.; BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J.; SACKS, D. 2010. Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cell Microbiol.*, v. 12, p. 906-918.

SHAKARIAN, A. M.; DWYER, D. M. 2000. Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp. Parasitol.* v. 94, n. 4, p. 238-242.

SHAW, J. J. 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; v. 89, p. 471-478.

SHAW, J. J. 2007. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 102, n. 5, p.541-547.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. 2004. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.* v. 10, p. 307-315.

SOARES, R. P.; MACEDO, M. E.; ROPERT, C.; GONTIJO, N. F.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T.; PIMENTA, P. F., TURCO, S. J. 2002. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol.* v. 121, n. 2, p. 213-224.

STIERHOF, Y. D.; BATES, P. A.; JACOBSON, R. L.; ROGERS, M. E.; SCHLEIN, Y.; HANDMAN, E.; ILG, T. 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur. J. Cell Biol.* v. 78, n. 10, p. 675-689.

SUNITHA, V. B.; REENA, T.; HARSHINI, S.; SREEKUMAR, S. 1999. Is gut pH regulated by midgut endocrine system in larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Fab.? *Indian J. Exp. Biol.* v. 37, p. 476-480.

TANG, Y.; WARD, R. D. 1998. Sugar feeding and fluid destination control in the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Med. Vet. Entomol.* v. 12, n. 1, p. 13-19.

WALTERS, L. L. 1993. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly host. *J. Euk. Microbiol.* v. 40, p. 196-206.

WALTERS, L. L.; IRONS, K. P.; GUZMAN, H.; TESH, R. B. 1993. Formation and Composition of the Peritrophic Membrane in the Sand Fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* v. 30, n. 1, p. 179-198.

WALTERS, L. L.; IRONS, K. P.; GUZMAN, H.; TESH, R. B. 1995. Peritrophic Envelopes of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* v. 32, n. 5, p. 711-725.

WALTERS, L. L.; MODI, G. B.; CHAPLIN, G. L.; TESH, R. B. 1989. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 41, n. 3, p. 295-317.

WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. 1986. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 35, p. 926-930.

WARD, R.D. 1990. Some aspects of the biology of phlebotomine sand fly vectors. In: Harris, K.F. (ed.). *Adv. Dis. Vector Res.* New York: Springer-Verlag, p. 91-126.

WERNECK, G. L.; COSTA, C. H.; WALKER, A. M. DAVID, J. R.; WAND, M.; MAGUIRE, J. H. 2006. Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol. Infect.* v.135, p. 195-201.

WIECZOREK, H., BEYENBACH, K. W., HUSS, M.; VITAVSKA, O. 2009. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. *J. Exp. Biology.* v.212, p.1611-1619.

WIECZOREK, H.; GRUBER, G.; HARVEY, W. R.; HUSS, M.; MERZENDORFER, H.; ZEISKE, W. 2000. Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺ V-ATPase. *J. Exp. Bio.* v. 203, n. 1, p. 127-135.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. 1994. Guide to the identification in geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* n. 54, p.871.- 881.

ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. 1998. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitol.* n. 116, p. 305-309.

ZIMMERMANN, B.; DAMES, P.; WALZ, B.; BAUMANN, O. 2003. Distribution and serotonin-induced activation of vacuolar-type H⁺-ATPase in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J. Exp. Biol.* v. 206 (Pt 11), p. 1867-1876.