

VLADIMIR FAZITO DO VALE

ESTUDO SOBRE A ANATOMIA, pH E DIGESTÃO DE PROTEÍNAS NO INTESTINO
DE LARVAS DE *Lutzomyia longipalpis*
(DIPTERA: PSYCHODIDAE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2008

VLADIMIR FAZITO DO VALE

ESTUDO SOBRE A ANATOMIA, pH E DIGESTÃO DE PROTEÍNAS NO INTESTINO
DE LARVAS DE *Lutzomyia longipalpis*
(DIPTERA: PSYCHODIDAE)

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-graduação em Parasitologia da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo ICB/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, pelo apoio e dedicação e por serem meu exemplo de pessoas boas.

Às minhas irmãs, Ana e Sara, pelo carinho e por sempre estarem ao meu lado, me aconselhando nos momentos de dúvidas.

Agradeço minha família, especialmente meus padrinhos e avós.

À Gina, pelo companheirismo, amor e por me fazer muito feliz.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos: Adriana, André, Andreza, Bruno, Ceres, César, Fernanda, Iâncor, Jéssica, Lucas, Natasha, Rafaela, Ricardo, Vânia e Veruska. Essas pessoas fazem com que o ambiente do laboratório se torne muito agradável.

Aos antigos colegas do LFIH: Artur e Felipe.

Agradeço especialmente meus amigos Henrique e Warrison que iniciaram este projeto juntamente comigo.

Aos amigos da Parasitologia, principalmente os colegas dos créditos: Ana Terezinha, Érika, Erlisson, Fátima, Ju, Lara, Leo, Lílian, Natasha e Norine, que fizeram com que os seis meses de disciplinas passassem mais rápido.

Ao Professor Nelder Gontijo, meu orientador, pelos ensinamentos e por me incentivar a buscar minhas próprias perguntas.

Ao Professor Marcos Horácio Pereira, pelos comentários e críticas e ainda por manter o bom humor no laboratório.

Aos amigos da Biologia e à moçada da Nata, pela amizade e pelos bons momentos.

À secretária do Programa de Pós-graduação do Departamento de Parasitologia, Sumara, por ser um grande apoio para todos os alunos.

Aos professores do Departamento de Parasitologia, pelos conhecimentos repassados e pela paciência em ensinar.

Ao Programa de Pós-graduação em parasitologia, na pessoa do Prof. Pedro Marcos Linardi, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Esta Dissertação contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq).

Aos meus pais

Insetos cegam meu sol.
Há um azul em abuso de beleza.
Lagarto curimpã se agarrou no meu remo.
Os bichos tremem na popa.
Aqui até cobra eremisa, usa touca, urina na fralda.
Na frente do perigo bugio bebe gemada.
Periquitos conversam baixo.

.....
Sou puxado por ventos e palavras.
(Palestrar com formigas é lindeiro de insânia?)

ÍNDICE

1	Introdução	Página 01
1.2	Aspectos gerais da biologia de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	02
1.3	Trato digestivo dos insetos	06
1.4	pH no intestino dos insetos	09
1.5	Digestão de proteínas em insetos	10
2	Justificativa	17
3	Objetivos	18
3.1	Objetivo Geral	18
3.1.	Objetivos Específicos	18
4	Materiais e Métodos	19
4.1	Insetos	19
4.2	Obtenção do intestino e descrição anatômica do tubo digestivo	19
4.3	Determinação do pH em cada região do tubo digestivo	20
4.4	Ensaio enzimáticos	21
4.4.1	Soluções tampão utilizadas	21
4.4.2	Endoproteases digestivas	21
4.4.2.1	Determinação do pH ótimo das endoproteases totais	21
4.4.2.2	Determinação das classes de endoproteases presentes	22
4.4.2.3	Determinação da localização das endoproteases totais ao longo do intestino	22

4.4.2.4	Confirmação da presença de enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina e definição do pH ótimo de atuação dessas enzimas	23
4.4.2.5	Determinação do número de endoproteases e do seu peso molecular aparente	23
4.4.3	Exoproteases digestivas	24
4.4.3.1	Verificação da presença de aminopeptidases	24
4.4.3.2	Definição do pH ótimo para a atividade de aminopeptidases	25
4.4.3.3	Determinação da localização das aminopeptidases ao longo do intestino	25
4.4.4	Caracterização das enzimas como solúveis ou ligadas às membranas do epitélio intestinal	26
4.4.4.1	Caracterização das endoproteases como solúveis ou ligadas às membranas do epitélio intestinal	26
4.4.4.2	Caracterização das exoproteases como solúveis ou ligadas às membranas do epitélio intestinal	26
5	Resultados	28
5.1	Anatomia macroscópica do intestino de larvas de <i>L. longipalpis</i>	28
5.2	pH no interior do intestino de larvas de <i>L. longipalpis</i>	29
5.3	pH ótimo das endoproteases totais	31
5.4	Atividade endoproteolítica na presença e ausência de inibidores específicos para cada classe de endoproteases	32
5.5	Localização das proteases totais ao longo do intestino	33
5.6	Presença de enzimas semelhantes à tripsina e à quimotripsina e pH ótimo dessas enzimas	34
5.7	Atividade proteolítica em gel de poliacrilamida	36
5.8	Presença de aminopeptidases no intestino de larvas de <i>L. longipalpis</i>	37
5.9	pH ótimo de atuação das aminopeptidases	37

5.10	Localização das aminopeptidases ao longo do intestino	40
5.11	Distribuição da atividade tripsinolítica entre o conteúdo e o epitélio intestinal	40
5.12	Distribuição da atividade de aminopeptidases entre o conteúdo e o epitélio intestinal	41
6	Discussão	43
7	Conclusões	55
8	Referências Bibliográficas	56
9	Anexo	70

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Fotografia de uma larva de quarto estágio de <i>L. longipalpis</i>	04
Figura 2	Fotografias de flebotomíneos do gênero <i>Lutzomyia</i> : fêmea e macho	05
Figura 3	Esquema do tubo digestivo de um inseto	06
Figura 4	Desenho esquemático mostrando a atuação de endoproteases e exoproteases	12
Figura 5	Fotografia e desenho esquemático do intestino de larvas L4 de <i>L. longipalpis</i>	29
Figura 6	Larvas L4 de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com corantes vitais indicadores de pH	30
Figura 7	pH encontrado em cada uma das regiões do intestino médio de larvas L4 de <i>L. longipalpis</i>	31
Figura 8	Curva de pH versus atividade para endoproteases totais presentes no intestino de larvas de <i>L. longipalpis</i>	31
Figura 9	Atividade proteolítica total na presença e na ausência de inibidores específicos para cada classe de proteases em pH 8	32
Figura 10	Atividade proteolítica total na presença e na ausência de inibidores específicos para cada classe de proteases em pH 11	33
Figura 11	Atividade de endoproteases totais ao longo do intestino e em diferentes valores de pH	34
Figura 12	Curva de pH versus atividade para tripsinas intestinais de larvas de <i>L. longipalpis</i>	35
Figura 13	Curva de pH versus atividade para quimotripsinas intestinais de larvas de <i>L. longipalpis</i>	35
Figura 14	Separação das endoproteases intestinais de larvas de <i>L. longipalpis</i> por SDS-PAGE contendo gelatina	36
Figura 15	Curva de pH versus atividade para aminopeptidases usando os substratos Lisina pNA, Alanina pNA, Leucina pNA e Metionina pNA	39

Figura 16	Distribuição da atividade de aminopeptidases ao longo do intestino médio de larvas de <i>L. longipalpis</i>	40
Figura 17	Mecanismo de contracorrente	45
Figura 18	Esquema da circulação endo-ectoperitrófica	49

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1	Atividade de aminopeptidases intestinais em larvas de <i>L. longipalpis</i> usando vários substratos sintéticos em pH 7, pH 8,5 e pH 11	38
Tabela 2	Distribuição da atividade tripsinolítica entre o conteúdo e a parede intestinal de larvas de <i>L. longipalpis</i>	41
Tabela 3	Caracterização das aminopeptidases intestinais de larvas de <i>L. longipalpis</i> como solúveis ou ligadas às membranas do epitélio intestinal	42

LISTA DE ABREVIATURAS

[1,3-³H] DIP: [1,3-³H] diisopropilfluorofosfato

3,4 DCI: 3,4 dicloroisocoumarino

Alanina-pNA: alanina-p-nitroanilida

Arginina-pNA: arginina-p-nitroanilida

DMSO: dimetilsulfóxido

E64: trans epoxisuccinil-L-leucilamido 4-guanidino butano

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

Fenilalanina-pNA: fenilalanina-p-nitroanilida

Glicina-pNA: glicina-p-nitroanilida

HEPES: ácido etanosulfônico – 4 – (2 – hidroxietil) – 1 – piperazina

L-BApNA: *N*- α -benzoil-L-Arginil-*p*-nitroanilida

Leucina-pNA: leucina-p-nitroanilida

Lisina-pNA: lisina-p-nitroanilida

MES: ácido 4-morfolinoetanosulfônico

Metionina-pNA: metionina-p-nitroanilida

N-CBZ-L-PpNA: *N*-CBZ-L-Fenilalanil-*p*-nitroanilida

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

SBTI: inibidor de tripsina da soja

SDS: dodecil sulfato de sódio

TCA: ácido tricloroacético

TLCK: *N*- α -tosil-L-lisina clorometil cetona

TPCK: *N*- α -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano

Valina-pNA: valina-p-nitroanilida

RESUMO

O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor de *Leishmania infantum*, o agente etiológico da Leishmaniose Visceral Americana. Apesar da importância desta espécie em saúde pública, não existem na literatura descrições sobre a anatomia interna do tubo digestivo e pouco se sabe sobre os processos digestivos em larvas de flebotomíneos. Sendo assim, este trabalho teve o objetivo de descrever a anatomia do tubo digestivo, determinar o pH na luz intestinal e ainda investigar a digestão de proteínas em larvas de *Lutzomyia longipalpis*. O intestino médio constitui a maior parte do tubo digestivo e os cecos gástricos estão ausentes. Com o uso de corantes vitais indicadores de pH, foi observado um gradiente de pH, variando de ≥ 9 no interior do intestino médio anterior a 6,5-7 no interior do intestino médio posterior. As endoproteases são secretadas no intestino médio anterior e são capazes de digerir azocaseína em diversos valores de pH, especialmente no pH 11. O uso de vários inibidores mostrou que as endoproteases digestivas são enzimas semelhantes à tripsina e à quimotripsina. Esse resultado foi confirmado com o uso dos substratos L-BApNA e N-CBZ-L-PpNA, específicos para tripsinas e quimotripsinas, respectivamente. Foram observadas 11 bandas (102 a 33 kDa) de atividade de endoproteases no gel de poliacrilamida contendo gelatina como substrato. As tripsinas encontradas no trato digestivo de larvas de *L. longipalpis* estão solúveis na luz intestinal. Aminopeptidases também foram estudadas com o uso de substratos sintéticos. Essas enzimas estão localizadas na porção posterior do intestino médio, ligadas ao epitélio e com pH ótimo entre 6,5 e 8. Estes resultados estão de acordo com a proposta de que as proteínas são digeridas até pequenos peptídeos dentro do espaço endoperitrófico no intestino médio anterior e estes peptídeos são digeridos em aminoácidos no espaço ectoperitrófico no intestino médio posterior.

1 - INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são insetos dípteros da subordem Nematocera, pertencem à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae. São importantes em saúde pública por transmitirem a bactéria *Bartonella bacilliformis* (agente causador da bartonelose) e inúmeros arbovírus. Porém, esta subfamília apresenta maior interesse médico pois possui dois gêneros capazes de transmitir os agentes etiológicos das leishmanioses: *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* no novo mundo (Young e Duncan, 1994).

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por aproximadamente 30 espécies de protozoários da família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. Devido à diversidade de agentes etiológicos, diferenças próprias dos hospedeiros e aspectos epidemiológicos as leishmanioses apresentam formas clínicas distintas: cutânea, cutânea-mucosa e visceral (Lynne et al., 1997). Estima-se que a prevalência das leishmanioses esteja próxima de 12 milhões de casos no mundo, sendo que 350 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a doença, principalmente em países em desenvolvimento. A grande maioria dos casos de leishmaniose visceral (90%) ocorre no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão. Já a leishmaniose cutâneo-mucosa ocorre principalmente no Brasil, Bolívia e Peru, que, juntos somam 90% dos casos desta forma da doença. Quanto à leishmaniose cutânea 90% dos casos registrados ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (OMS, 2007).

A leishmaniose visceral é a mais devastadora das leishmanioses e pode levar o paciente ao óbito, se este não for tratado. Esta forma da doença tem incidência estimada em 500 mil casos e ocorrem 59 mil mortes a cada ano no mundo (OMS, 2007; Desjeux, 2004). Inicialmente, três espécies de *Leishmania* eram consideradas responsáveis pela leishmaniose visceral no mundo: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (responsável pela leishmaniose visceral no Novo Mundo), *Leishmania (Leishmania) donovani* (responsável pela leishmaniose visceral principalmente na Índia, Bangladesh e Nepal) e *Leishmania (Leishmania) infantum* (responsável pela leishmaniose visceral principalmente no sul da Europa e no norte África). Hoje se sabe que *Leishmania (Leishmania) infantum* é sinonímia para *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Maurício et al., 2000). Portanto, a leishmaniose visceral americana (LVA ou calazar) é causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* e no Brasil é considerada endêmica. Inicialmente, a ocorrência do calazar era limitada a ambientes rurais e pequenas localidades urbanas.

Hoje, essa doença encontra-se em franca expansão para grandes centros. Casos de LVA podem ser encontrados em 19 estados da federação, em quatro das cinco regiões do país. A maior incidência encontra-se no Nordeste com aproximadamente 70% do total de casos, seguido pela região Sudeste, a região Norte, e, finalmente a região Centro-Oeste. Em média, 3.500 novos casos são registrados por ano e as taxas de letalidade podem alcançar 10% dependendo da localidade (Ministério da Saúde, 2007).

A LVA é uma zoonose que tem como reservatório primário a raposa (*Cerdocyon thous*), porém o cão doméstico (*Canis familiaris*) é incriminado como o principal reservatório de *Leishmania infantum* no Brasil (Lainson e Rangel, 2005). Isso ocorre pois o cão possui alta susceptibilidade à infecção, parasitismo cutâneo elevado e ainda grande proximidade com o homem (Ashford et al., 1998).

A transmissão de LVA no Brasil é feita principalmente pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, porém, hoje se sabe que em algumas áreas da Colômbia e Brasil *Lutzomyia evansi* e *Lutzomyia cruzi* são considerados vetores secundários do calazar (Shaw, 1999)

1.2 – Aspectos gerais da biologia de *Lutzomyia longipalpis*

L. longipalpis é uma espécie de grande distribuição geográfica e pode ser encontrada nas Américas, do México até a Argentina (Young e Duncan, 1994; Williams, 1999). Como todos os flebotomíneos, *L. longipalpis* é primordialmente uma espécie silvestre e ainda pode ser capturada em florestas primárias afastadas de habitações humanas. Porém, nenhuma outra espécie se adaptou tão bem aos ambientes domésticos e peridomésticos (Shaw, 1999; Lainson e Rangel, 2005).

Pequenas variações morfológicas observadas entre *L. longipalpis* machos de diferentes populações levaram pesquisadores a se questionar se esta seria mesmo uma única espécie (Mangabeira, 1969). Após vários estudos morfológicos, biológicos e moleculares, *L. longipalpis* é considerada hoje um complexo de espécies (Lane et al., 1985; Ward et al., 1988; Lanzaro et al., 1993; Mutebi et al., 2002). A existência de um complexo de espécies pode nos ajudar a entender a variação de aspectos clínicos da LVA na América Latina. Se considerarmos que a saliva dos flebotomíneos é capaz de elevar a infecciosidade de *Leishmania sp.* (Warburg e Schlein, 1986), podemos pensar que a diferença na composição da saliva de *L. longipalpis* provenientes de populações

geograficamente separadas pode modular diferentemente a patologia da doença (Warburg et al., 1994).

Assim como todos os flebotomíneos, *L. longipalpis* é um inseto holometábolo que passa pelo estágio de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Killick-Kendrick, 1999). O tempo de desenvolvimento em laboratório, do ovo até a fase adulta, geralmente varia de 28 até 36 dias, dependendo da fonte de alimentação (Rangel et al., 1986).

Ao contrário dos mosquitos (Diptera – Culicidae), cujas formas imaturas se desenvolvem na água, as formas imaturas dos flebotomíneos são exclusivamente terrestres. Na natureza, as fêmeas dos flebotomíneos não depositam os ovos indiscriminadamente pelo ambiente. Ao invés disso, elas reconhecem locais apropriados para a postura e futuro desenvolvimento das larvas. É sabido que as fêmeas grávidas são atraídas para os locais de oviposição por atrativos presentes em ovos depositados por outras fêmeas. Além disso, elas são atraídas por compostos emitidos por fezes de coelho e galinha (Killick-Kendrick, 1999; Feliciangeli, 2004). Geralmente os ovos são postos em locais tais como: fendas em rochas, tocas de animais, próximos às raízes de árvores, nos troncos ocos e no solo de florestas ou outros locais onde existam folhas ou outros materiais de origem vegetal em decomposição (Forattini, 1973; Ferro et al., 1997). A grande diversidade de criadouros assim como o pouco conhecimento sobre as características detalhadas destes locais impede que haja um método de controle efetivo tendo como alvo as formas imaturas de flebotomíneos.

A eclosão dos ovos ocorre depois de 6-9 dias (Rangel et al., 1986) dando origem a uma larva pequena, de forma cilíndrica e com a cabeça bastante conspícua, como é comum aos Nematocera. O corpo das larvas de quarto estágio de *L. longipalpis* é dividido em cabeça, três segmentos torácicos e nove segmentos abdominais. Exceto pela cabeça e pelo último segmento abdominal, o tegumento da larva é coberto por pequenos tubérculos, que podem ou não conter espinhos. Setas em formato de escova, distribuídas em pares, predominam na superfície da larva, mas setas nuas também podem ser encontradas. As peças bucais são do tipo mastigadoras e oponíveis, sendo que a larva possui peças bucais fortes para auxiliar na alimentação. A antena é pequena e com segmento distal em formato ovóide. O último segmento das larvas L4 exhibe dois lobos caudais, cada um contendo duas grandes setas (Leite e Williams, 1996). A **figura 1** mostra a fotografia de uma larva de quarto estágio de *L. longipalpis*.



Figura 1: Fotografia de uma larva de quarto estágio de *L. longipalpis*.

Embora essas larvas necessitem de umidade, locais encharcados não são adequados ao seu desenvolvimento. O solo rico em material de origem vegetal em decomposição ou de fezes curtidas de animais, presente nos criadouros, é o alimento que sustenta o desenvolvimento das larvas (Addis, 1945; Hamson, 1961; Forattini, 1973; Killick-Kendrick, 1978). Em laboratório, as larvas de *L. longipalpis* mostraram bom desenvolvimento quando alimentadas com uma grande variedade de alimentos, até mesmo dietas pobres em nutrientes (Wermelinger e Zanuncio, 2001). Antes de se transformarem em pupa, as larvas param de se alimentar, excretam todo o conteúdo intestinal e procuram um local mais seco para se fixarem e empuparem (Young e Duncan, 1994).

Os flebotomíneos adultos são insetos pequenos com comprimento do corpo não passando de 3 milímetros. São densamente cobertos por cerdas e quando pousam, mantêm as asas semi-abertas acima do abdômen (Killick-Kendrick, 1999) (**figura 2**). Tanto os machos como as fêmeas necessitam de se alimentar de substâncias açucaradas tais como seiva de plantas, néctar de flores e secreções de insetos como fonte de energia (Schlein e Warburg, 1986; Alexander e Usma, 1994; Cameron et al., 1995). A hematofagia é exercida apenas pelas fêmeas e esse tipo de dieta propicia nutrientes para o desenvolvimento do ovário e a produção de ovos (Young e Duncan, 1994). As peças bucais dos flebotomíneos são curtas e rígidas, por isso não se alimentam de sangue diretamente nos vasos sanguíneos. Assim, para obterem alimento as fêmeas dilaceram a pele do hospedeiro formando uma poça subcutânea de sangue e restos de tecido que

então são ingeridos. Esse processo é chamado de telmatofagia e contribui para a transmissão das leishmanioses, uma vez que o parasito é encontrado principalmente na pele do hospedeiro vertebrado (Bates, 2007).

Ao se alimentarem de sangue, as fêmeas de *L. longipalpis* injetam saliva no corpo de seus hospedeiros. Assim como em outros artrópodes hematófagos, a saliva dos flebotomíneos possui moléculas importantes no processo de hematofagia e que, conseqüentemente, podem facilitar a implantação da infecção por *Leishmania* sp. (Ribeiro, 1987a e 1987b). Entre as atividades já descritas para a saliva de *Lutzomyia longipalpis* podemos citar a atividade vasodilatadora (Lerner et al., 1991), atividade anti-agregação plaquetária (Ribeiro et al., 1986) e inibição do sistema do complemento humano (Cavalcante, 2003).



Figura 2: Fotografias de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*: fêmea (em cima) e macho (em baixo).

1.3 – Trato digestivo dos insetos

O canal alimentar dos insetos em geral é dividido em três regiões principais: intestino anterior, de origem ectodérmica; intestino médio, de origem mesodérmica e intestino posterior, de origem também ectodérmica. O epitélio destas três regiões consiste em apenas uma camada de células que se apóia sobre uma lâmina basal. Uma vez que o intestino anterior e o intestino posterior têm origem ectodérmica, as células secretam cutícula que é contínua àquela encontrada do lado de fora do corpo (Chapman, 1998). A **figura 3** mostra um esquema geral do tubo digestivo de um inseto.

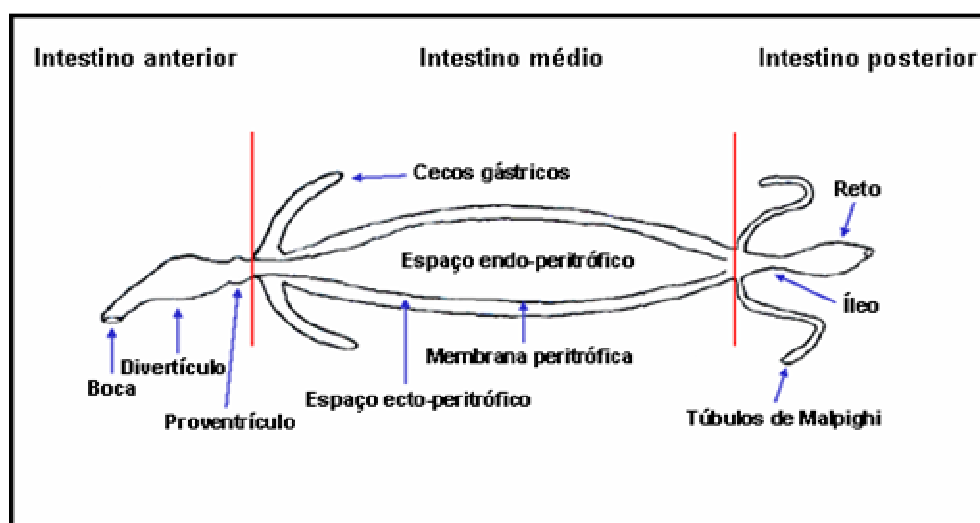


Figura 3: Esquema do tubo digestivo de um inseto. Adaptado de Terra e Ferreira, 1994.

As células do intestino anterior possuem forma achatada e não estão envolvidas na secreção ou absorção (Chapman, 1998). O intestino anterior consiste de boca, cavidade oral (onde as glândulas salivares desembocam, se presentes), faringe, esôfago, divertículo e proventrículo. A faringe dos insetos está relacionada com a ingestão de alimentos e possui, normalmente, musculatura bem desenvolvida. O esôfago geralmente possui forma tubular, e serve como uma conexão entre a faringe e o divertículo (Terra e Ferreira, 1994; Chapman, 1998).

O divertículo é um órgão de armazenamento e a cutícula que o envolve o torna impermeável a moléculas hidrofílicas (Chapman, 1998). Em adultos de *Lutzomyia longipalpis* o divertículo forma um saco volumoso responsável pelo armazenamento inicial de líquidos açucarados. Esse alimento passa lentamente do divertículo para o

intestino médio, onde ocorre a digestão e absorção dos açúcares (Tang e Ward, 1998; Gontijo et al., 1998). O proventrículo é um órgão de trituração em algumas espécies e na maioria dos insetos atua como uma válvula de entrada do alimento no intestino médio (Terra e Ferreira, 1994).

O intestino médio está envolvido na produção e secreção de enzimas e ainda na absorção de nutrientes (Chapman, 1998), consiste em um tubo simples que, dependendo da espécie, pode ou não conter ramificações geralmente na sua parte anterior. Essas ramificações são sacos cegos denominados cecos gástricos. Na maioria dos insetos, o lúmen do intestino médio é forrado por uma estrutura (membrana peritrófica) que separa o conteúdo intestinal em dois compartimentos: o espaço endoperitrófico (dentro da membrana peritrófica) e o espaço ectoperitrófico (fora da membrana peritrófica) (Terra e Ferreira, 1994).

O epitélio do intestino médio é composto por vários tipos celulares e predominam neste epitélio as células colunares, responsáveis pelas funções do intestino médio. Esta célula possui microvilosidades na membrana apical e está envolvida na absorção e secreção de água, produção e secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (Terra e Ferreira, 1994). Células relativamente indiferenciadas podem ser encontradas sozinhas ou em grupos na base do epitélio. Essas células são chamadas de regenerativas e substituem as células colunares quando essas morrem (Bilingsley e Lehane, 1996). Células endócrinas estão provavelmente envolvidas na regulação da produção de enzimas digestivas e possuem formas variadas como piramidal, oval ou fusiforme. Espalhadas entre as células colunares podem ser encontradas, em algumas espécies de insetos, células calciformes, responsáveis pelo transporte ativo de íons entre a hemolinfa, o citoplasma e o lúmen intestinal. (Terra e Ferreira, 1994; Bilingsley e Lehane, 1996; Chapman, 1998).

O intestino posterior é usualmente dividido em piloro, íleo e reto. A região do piloro, que separa o intestino médio do intestino posterior, é o local onde os Túbulos de Malpighi (órgão de secreção) se inserem. Na maioria dos insetos, o íleo é um tubo estreito que liga o piloro ao reto e é composto por um único tipo celular. Na extremidade final do íleo, o intestino se expande formando o reto. Como a cutícula do intestino posterior é muito fina, esta região se difere do intestino anterior por ser permeável à água e alguns íons (Chapman, 1998; Terra e Ferreira, 1994).

A membrana peritrófica é uma membrana acelular e semipermeável e está presente no intestino médio da maioria dos insetos em pelo menos uma das fases do

ciclo de vida. Dois tipos de membrana peritrófica foram descritos com base no local de síntese (Peters, 1992). A membrana peritrófica do tipo 1 é sintetizada pelo epitélio de todo intestino médio abdominal e forma uma estrutura em forma de saco que envolve o alimento ingerido. Esse tipo de membrana peritrófica é formado em resposta ao estiramento do intestino provocado pela ingestão de alimento. A membrana peritrófica do tipo 2 é uma estrutura em forma de tubo, aberta nas extremidades que percorre todo o intestino médio. Ela é sintetizada continuamente por um pequeno grupo de células presentes no início do intestino médio (Tellan, 1996). A membrana peritrófica do tipo 1 é encontrada em baratas (Dictyoptera), grilos (Orthoptera) besouros (Coleoptera), abelhas, vespas e formigas (Hymenoptera), mariposas e borboletas (Lepidoptera) e em mosquitos hematófagos adultos (Diptera). Já a membrana peritrófica do tipo 2 ocorre em larvas e adultos (exceto os hematófagos) de dípteros e em alguns lepidópteros adultos (Terra e Ferreira 2005).

Vários estudos têm sido feitos para caracterizar a importância fisiológica da membrana peritrófica nos insetos. As principais funções descritas até o momento são: 1) proteção contra partículas do alimento que possam danificar o epitélio intestinal (Sudha e Muthu, 1988); 2) proteção contra organismos patogênicos (Miller e Lehane, 1993); 3) no caso de hematófagos, proteção do intestino contra agentes nocivos produzidos pela digestão da hemoglobina (Pascoa et al., 2002); 4) compartimentalização da digestão agindo como uma barreira permeável a algumas enzimas digestivas (Terra, 1990).

A estrutura da membrana peritrófica é normalmente caracterizada pela presença de quitina e, adicionalmente proteínas e proteoglicanos, que juntas formariam uma malha resistente e elástica (Tellan, 1996; Lehane, 1997). Porém, a presença da quitina como principal constituinte das membranas peritróficas vem sendo questionada. O uso de quitinases pode alterar a integridade estrutural da membrana peritrófica do tipo 1 de alguns insetos (Kramer e Muthukrishnan, 1997; Pimenta et al., 1997), o que é uma boa evidência para alta concentração de quitina nesse tipo de membrana. Por outro lado, Tellam e Eisemann (2000) concluíram que a quitina é o componente menos abundante na membrana peritrófica do tipo 2 de larvas de *Lucilia cuprina*. Entre outros resultados, as membranas peritróficas de *L. cuprina* incubadas com quitinase não apresentaram diferenças estruturais se comparadas com o grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados em larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*, sugerindo que o papel da quitina na estrutura da membrana peritrófica do tipo 2 deve ser reavaliado (Edwards e Jacobs-Lorena, 2000). Em *Lutzomyia longipalpis* adultos, a síntese da

membrana peritrófica começa uma hora após a ingestão do sangue e depois de 24 horas já é possível se ver uma fina e bem formada membrana separando completamente o sangue das células intestinais. Essa membrana peritrófica é um envelope formado por duas camadas: uma camada fibrilar que se volta para as células intestinais e outra camada granular em contato com o alimento. Neste estudo também foi comprovada a presença de quitina e proteínas na membrana peritrófica de fêmeas de *L. longipalpis* (Secundino et al., 2005).

1.4 - pH no intestino de insetos

A concentração de íons H^+ no conteúdo intestinal é uma das propriedades mais importantes que afetam a digestão. Sendo assim, inúmeras medidas de pH já foram feitas para as principais ordens de insetos. Em Orthoptera (adulto), Dictyoptera (adulto) e na maioria das famílias de Coleoptera (larva e adulto) a porção anterior do intestino médio é ácida, enquanto a parte posterior é neutra ou levemente alcalina. Hemiptera (adulto) e Hymenoptera (larva) possuem conteúdo intestinal de caráter ácido e os valores de pH diminuem à medida que se aproxima da região posterior. Os insetos da ordem Lepidoptera (larva) possuem conteúdo intestinal com pH bastante alcalino. As larvas de dípteros da subordem Brachycera (larva) têm como característica um intestino médio com a parte anterior e posterior de pH neutro e a parte mediana exibindo um pH muito ácido. As larvas das famílias da Subordem Nematocera possuem um intestino médio anterior muito alcalino e um intestino médio posterior menos alcalino chegando a valores próximos da neutralidade (Terra e Ferreira, 1994).

Relacionando a filogenia dos insetos e os valores de pH intestinal conhecidos para larvas de algumas espécies, Clarck (1999) inferiu que o ancestral comum das ordens Diptera, Lepidoptera e Trichoptera possuía larva com intestino alcalino. Subsequentemente, a linhagem que deu origem aos dípteros da subordem Brachycera teria perdido este padrão de alcalinização. A mudança de um ambiente tão alcalino para um ambiente ácido, encontrado no intestino médio de larvas de moscas, seria uma adaptação para a saprofagia exercida por esses insetos. O baixo pH assim como a atividade de lisozima intestinal seriam responsáveis por matar as bactérias e liberar os nutrientes desses microorganismos (Clark, 1999; Espinoza-Fuentes e Terra, 1987).

De um modo geral, as larvas detritívoras dos dípteros Nematocera possuem o intestino médio alcalino (Undeen, 1979; Sharma et al., 1984; Terra, et al. 1979). O

lúmen do intestino médio em larvas de mosquito possui um dos mais altos pHs encontrados em sistemas biológicos. Larvas de *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* alimentadas com corantes vitais indicadores de pH mostraram que os cecos gástricos possuem pH 8, o intestino médio posterior pH 7 e a porção anterior do intestino médio pode chegar ao pH 10,5 (Dadd, 1975).

Um modelo detalhado que explica os mecanismos de alcalinização no intestino médio dessas larvas ainda não foi proposto, porém algumas moléculas têm sido responsabilizadas por este fenômeno. Em larvas de mosquitos, a manutenção do alto pH intestinal foi atribuída à presença de bombas de prótons (H^+ V-ATPase) localizadas no epitélio intestinal (Filippova et al., 1998; Zhuang et al., 1999) e altas concentrações de íons bicarbonato/carbonato no lúmen do intestino médio anterior (Boudko et al., 2001) devido a presença da enzima anidrase carbônica nas células do intestino (Corena et al., 2004).

1.5 – Digestão de proteínas em insetos

A assimilação dos nutrientes por insetos e outros organismos ocorre após o processamento dos alimentos por enzimas digestivas. As enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas são chamadas de peptidases ou proteases e podem ser classificadas de acordo com a natureza química do sítio catalítico ou pela reação catalisada (Barrett, 1994).

De acordo com a natureza química do sítio catalítico, as peptidases podem ser divididas em serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartil-proteases ou metalo-proteases. Serino-proteases são enzimas amplamente distribuídas pela natureza e dependem de um resíduo de serina no sítio catalítico. Tripsinas são serino-proteases que clivam proteínas preferencialmente na porção carboxílica de aminoácidos básicos como arginina e lisina e são caracterizadas pela tríade catalítica histidina, ácido aspártico e serina. Em insetos, o peso molecular das tripsinas costuma variar entre 20 kDa e 35 kDa e o pH ótimo de atuação é sempre alcalino (Lopes et al., 2006; Terra e Ferreira, 1994). As quimotripsinas são serino-proteases que preferencialmente atuam na porção carboxílica de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina e triptofano. A tríade catalítica das quimotripsinas também é composta por histidina, ácido aspártico e serina. O peso molecular das quimotripsinas em insetos é normalmente 20-30 kDa e essas

enzimas atuam bem em uma faixa de pH que varia de pH 8 a pH 10 (Terra e Ferreira, 1994).

Cisteíno-proteases são proteases que têm como característica possuir um resíduo de cisteína no centro ativo da enzima. A catálise é facilitada pelos resíduos adjacentes de histidina e ácido aspártico. Cisteíno-proteases são comuns no intestino médio dos hemípteros e alguns coleópteros, seu peso molecular é normalmente de 25-45 kDa e o pH ótimo de atuação é entre pH 5 e pH 6 (Terra e Ferreira, 1994). Em larvas de *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera) uma cisteíno-protease parece ter papel fundamental na digestão de proteínas (Wieman e Nielsen, 1988).

Aspartil-proteases são enzimas que possuem no centro ativo dois resíduos de ácido aspártico. Essas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, sendo que as pepsinas, catepsinas D e reninas fazem parte deste grupo. São enzimas de ambientes ácidos e foram encontradas em insetos pela primeira vez por Greenberg e Paretsky (1955), que observaram uma forte atividade proteolítica no pH 2,5-3 em *Musca domestica*. Posteriormente, Blanco-Labra et al. (1996) purificaram e caracterizaram uma catepsina D em larvas de *Tribolium castaneum*. O peso molecular dessas enzimas em insetos varia de 60 kDa à 90 kDa (Terra e Ferreira, 1994).

Finalmente, as enzimas proteolíticas que necessitam de um íon metálico em seu sítio catalítico são chamadas de metalo-proteases. Nos animais essas enzimas costumam apresentar em seu sítio catalítico um íon de zinco, além de resíduos de glicina e tirosina. As carboxipeptidases A e B e algumas collagenases são consideradas metalo-proteases (Terra e Ferreira, 1994). Ward (1975) observou que uma metalo-protease é a principal enzima responsável pela digestão de queratina em larvas de *Tineola bisselliella* (Lepidoptera). Curiosamente, uma metalo-protease ligada à membrana do epitélio intestinal foi descrita como receptor da toxina de *Bacillus thuringiensis* em várias larvas de lepidópteros (Oppert et al., 1997).

De acordo com a reação catalisada, as proteases podem ser divididas em dois grupos, compreendendo as exopeptidases e as endopeptidases. Endopeptidases clivam as proteínas no meio da cadeia polipeptídica, enquanto as exopeptidases atuam somente próximo ao final da cadeia. Exopeptidases que agem na extremidade N-terminal são chamadas de aminopeptidases e aquelas que agem na extremidade C-terminal são chamadas de carboxipeptidases. As dipeptidases são exopeptidases que hidrolisam apenas dipeptídeos, liberando assim dois aminoácidos (Barrett, 1994). A **figura 4** mostra um esquema da classificação de proteases de acordo com a reação catalisada.

As aminopeptidases intestinais de insetos são metalo-enzimas e dependem de íons como Zn^{+2} e Mn^{+2} . Possuem pH ótimo entre pH 7 e pH 9 e alto peso molecular (90 – 130 kDa). Em insetos, as aminopeptidases conhecidas possuem pouca especificidade, indicando que essas enzimas são aminopeptidases N (Terra e Ferreira, 2005). Carboxipeptidases podem ser serino, cisteíno ou metalo-enzimas. Em insetos, essas enzimas são, geralmente, dependentes de íons metálicos e o peso molecular varia de 20 kDa até 50 kDa. Possuem pH ótimo entre pH 7,5 e 9, normalmente hidrolisam todos os aminoácidos C terminais, exceto arginina, lisina e prolina e são então classificadas como carboxipeptidases A (Terra e Ferreira 1994; Terra e Ferreira, 2005). Dipeptidases compreendem as peptidases menos conhecidas em insetos e parecem possuir alto peso molecular e pH ótimo próximo de pH 8 (Terra e Ferreira, 1994).

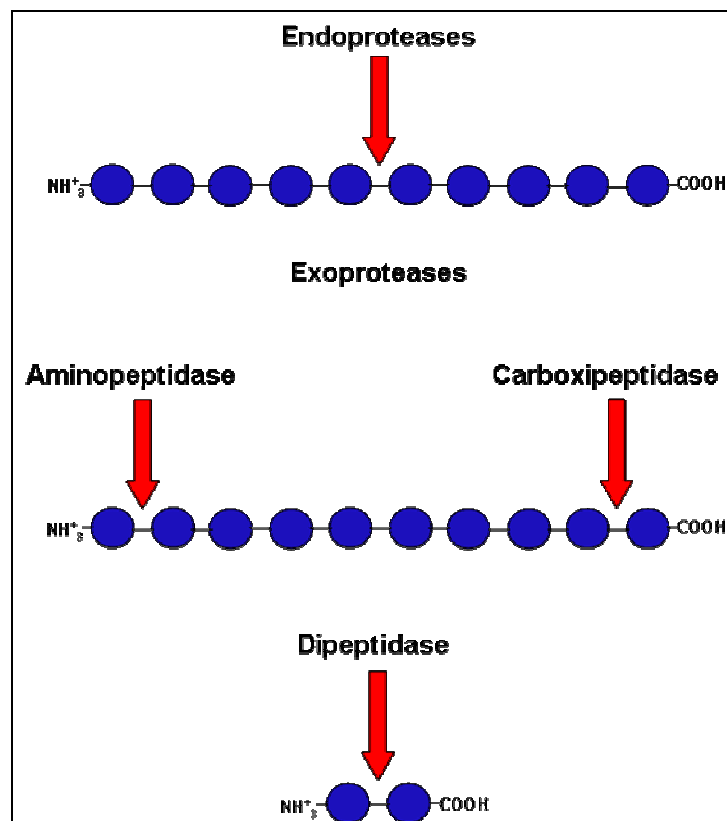


Figura 4: Desenho esquemático mostrando a atuação de endoproteases e exoproteases. Adaptado de Barrett, 1994.

Para digerir as proteínas ingeridas pelos insetos, as endoproteases devem se difundir pela membrana peritrófica e alcançar o interior do espaço endoperitrófico. Na medida em que as proteínas da dieta vão diminuindo de tamanho pela ação proteolítica, os peptídeos gerados e as próprias endoproteases podem se difundir de volta para o espaço ectoperitrófico passando pelos poros da membrana peritrófica. No espaço ectoperitrófico, esses peptídeos gerados são processados por exopeptidases (aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidases) presentes geralmente na parede do intestino médio. Os aminoácidos formados são então absorvidos pelas células do epitélio intestinal. A existência de um fluxo no espaço ectoperitrófico com sentido contrário ao fluxo alimentar serviria para reciclar as enzimas digestivas solúveis (como as endoproteases), já que essas enzimas seriam carregadas no sentido do intestino médio anterior e poderiam entrar novamente no espaço endoperitrófico, ao invés de serem descartadas junto com as fezes (Terra, 1990).

A maioria das enzimas proteolíticas de larvas de lepidópteros foi caracterizada como serino-proteases extracelulares com pH ótimo elevado, o que se encaixa com as condições alcalinas do intestino médio destes insetos. Johnston et al. (1995), usando substratos específicos e inibidores de proteases, concluíram que em larvas de *Heliothis virescens*, a lagarta do tabaco, as tripsinas e quimotripsinas são as proteases responsáveis por quase toda a digestão de proteínas. Neste lepidóptero, ambas as enzimas apresentam atividade máxima em pH 10-11. Em outra lagarta de importância econômica, *Anticarsia gemmatalis*, enzimas semelhantes à tripsina foram parcialmente purificadas. Três tripsinas de alto peso molecular foram encontradas e o pH ótimo foi pH 8,5 (Oliveira et al., 2005).

As proteases de larvas do besouro *Melolontha melolontha* foram identificadas e caracterizadas com o uso de várias técnicas como ensaios fotométricos/fluorimétricos e Western blots. Neste estudo os autores encontraram três tripsinas e três elastases como principais proteases. Foram encontradas ainda duas metalo-proteases e aminopeptidases solúveis e de membranas (Wagner et al., 2002).

Em moscas do gênero *Chrysomya*, a caracterização das serino-proteases foi feita bioquimicamente e molecularmente. Uma cromatografia de afinidade e posteriormente uma cromatografia de troca iônica foram capazes de revelar quatro picos de atividade de tripsinas e três picos de atividade de quimotripsinas. Molecularmente, a análise do cDNA das serino-proteases identificou 22 seqüências diferentes, sendo duas famílias de tripsinas e quatro famílias de quimotripsinas (Muharsini et al., 2001). A mosca *Oestrus*

ovis, causadora de miíase nasal em ovinos e caprinos, mostrou secretar serino-proteases no intestino. Um gel de poliacrilamida contendo gelatina como substrato revelou 6 bandas de atividade proteolítica (pesos moleculares de 20 a 100 kDa). As serino-proteases secretadas por esta larva foram capazes de degradar mucina e soroalbumina, proteínas presentes no ambiente inflamado devido à infestação. Surpreendentemente, essas enzimas foram capazes também de degradar IgG (muitas vezes resistentes a degradação proteolítica), o que poderia ser um mecanismo de escape contra o sistema imune do hospedeiro (Tabouret et al., 2003). Larvas e adultos do díptero *Ceratitis capitata* mostram um sistema proteolítico complexo, com uma pequena contribuição de enzimas do tipo aspartil-proteases e cisteíno-proteases. Porém a digestão das proteínas é conduzida principalmente pelas serino-proteases. Nas larvas, as tripsinas e quimotripsinas estão presentes, enquanto nos adultos apenas as quimotripsinas fazem parte do processo digestivo (Silva et al., 2006).

Yang e Davies (1971) mostraram as diferenças da atividade de tripsinas e quimotripsinas durante o desenvolvimento de *Aedes aegypti*. Durante a fase larval, ambas as enzimas são altamente ativas no intestino médio. Esta atividade cai drasticamente, até quase não ser mais detectável na fase de pupa. Após a emergência dos adultos e da ingestão de sangue pelas fêmeas, as duas enzimas diferem em seus padrões de atividade. A atividade da tripsina aumenta gradualmente até 24 horas depois do repasto sanguíneo, enquanto a quimotripsina mantém uma atividade praticamente nula. Resultados semelhantes foram encontrados por Briegel e Lea (1975), demonstrando que em mosquitos adultos a tripsina é responsável por 75% da digestão de proteínas e a quimotripsina está presente em níveis baixos. Neste estudo os autores ainda mostram que a tripsina desses insetos não é ativada por íons Ca^{+2} , como é comum nos mamíferos. A atividade de serino-proteases em larvas de mosquitos é sempre maior no conteúdo intestinal do que na parede intestinal. Isso mostra que grande parte dessas enzimas está solúvel na luz do trato digestivo e não ligadas às membranas das células que compõe o epitélio intestinal (Ho et al., 1992; Yang e Davies, 1970). Nas larvas dos mosquitos *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* e *Anopheles stephensi*, a atividade proteolítica total tem caráter alcalino, com pH ótimo entre pH 10 e pH 12 (Dadd, 1975). Em um estudo mais recente, Caroci et al. (2003) mostraram que a atividade de tripsina em fêmeas de *Anopheles darlingi*, *Anopheles aquasalis* e *Anopheles albitalis* aumenta drasticamente durante as 24 horas iniciais após a ingestão de sangue e aproximadamente depois de 48 horas a digestão está completa. Neste trabalho, as tripsinas foram

purificadas e o peso molecular de todas as enzimas ficou em torno de 35 kDa. A análise de seqüências da porção amino terminal dos peptídeos mostrou a ocorrência de duas tripsinas distintas em cada um dos mosquitos estudados. Essas seqüências ainda foram similares às seqüências de tripsinas de outros insetos hematófagos como *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* e *Ctenocephalides felis*.

Em flebotomíneos, a digestão de proteínas foi estudada principalmente em adultos, devido à relação entre as enzimas digestivas e as leishmanias que colonizam o trato digestivo. Enzimas proteolíticas parecem influenciar no estabelecimento de parasitos no intestino médio desses insetos. *Leishmania donovani* normalmente não sobrevive no intestino de *Phlebotomus papatasi*. Quando este inseto é infectado com *L. donovani* a atividade proteolítica aumenta 33%. Entretanto, quando esta espécie de flebotomíneo é infectada com *Leishmania major*, seu parasito natural, a atividade proteolítica diminui 28% (Schlein e Romano, 1986). Em outro estudo, Borovsky e Schlein (1987) provocaram a sobrevivência e multiplicação de *Leishmania donovani* no intestino de *Phlebotomus papatasi* quando esses insetos foram tratados com o inibidor de tripsina da soja (SBTI), um potente inibidor de tripsina. Assim, a atividade da tripsina parece afetar o desenvolvimento de *Leishmania donovani* em *Phlebotomus papatasi*. Em contrapartida, a modulação desta atividade por *Leishmania major* faz com que essa espécie sobreviva no inseto. Pimenta et al. (1997) mostraram que a mortalidade de *Leishmania major* causada pela ausência de membrana peritrófica em *Phlebotomus papatasi* podia ser revertida com o uso do SBTI, sugerindo a importância das enzimas proteolíticas na infecção de flebotomíneos por *Leishmania* sp.

A atividade proteolítica máxima em *Phlebotomus papatasi* ocorre após 30 horas do repasto sanguíneo, sendo que a tripsina é responsável por mais de 98% dessa atividade (Dillon e Lane, 1993; Borovsky e Schlein, 1987). Apesar da aparente ausência da atividade de quimotripsina, Ramalho-Ortigão et al. (2003) descreveram, analisando uma biblioteca de cDNA, quatro tripsinas e duas quimotripsinas no intestino médio de *Phlebotomus papatasi*. Dillon e Lane (1993) mostraram que em fêmeas de *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus langeroni* 93% da atividade tripsinolítica foi encontrada no conteúdo intestinal. Em contraste, a atividade de aminopeptidases se concentrou na parede intestinal, sugerindo que essas enzimas estão ligadas às membranas epiteliais. O pH ótimo de ação foi pH 8 para as aminopeptidases e pH 9 para as endoproteases. Resultados semelhantes foram observados em *Lutzomyia longipalpis*, onde a tripsina possui atividade máxima em ambientes alcalinos (Gontijo et al., 1998). Em fêmeas de

Lutzomyia anthophora a presença de serino-proteases também foi analisada (Mahmood e Borovsky, 1993), sendo que a atividade das quimotripsinas parece ser maior que a das tripsinas.

No único trabalho que trata da fisiologia digestiva em larvas de flebotomíneos, Mahmood e Borovsky (1992) descrevem a presença de serino-proteases em larvas e pupas de *Lutzomyia anthophora*. Utilizando uma técnica onde o sítio ativo das enzimas foi marcado radioisotopicamente com [1,3-³H] diisopropilfluorofosfato ([1,3-³H] DIP) na ausência e na presença de um inibidor de quimotripsina, os autores descobriram que nas larvas a quantidade de quimotripsina é aproximadamente três vezes maior que a de tripsina, porém as atividades dessas enzimas não foram ensaiadas. A eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou 12 bandas de serino-proteases sendo que metade delas corresponde a quimotripsinas. Infelizmente os autores não calcularam o peso molecular destas enzimas.

2 – JUSTIFICATIVA

O epitélio intestinal é a maior interface entre um inseto e o meio ambiente. Sendo assim, é razoável se pensar que a interferência no processo digestivo dos insetos deve culminar em comprometimento da sua sobrevivência. Hoje, a procura por novos métodos de controle, que agem através do intestino, vem crescendo e estratégias baseadas em biomoléculas (inibidores de enzimas, lectinas, quitinases, etc.) já estão sendo testadas. Porém, antes de pensarmos em métodos de controle temos que ter, primeiramente, um conhecimento sólido sobre a fisiologia do inseto a ser combatido. Assim, os estudos sobre morfologia e processos digestivos se tornam essenciais. Considerando a importância dos flebotomíneos e a quase total ausência de estudos fisiológicos envolvendo larvas, nos propusemos a pesquisar o canal digestivo e a digestão em larvas de *L. longipalpis*.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi estudar a morfologia do tubo digestivo, o pH intestinal e a fisiologia da digestão de proteínas em larvas de *L. longipalpis*.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Descrever a anatomia macroscópica do tubo digestivo de larvas de *L. longipalpis*.

2 – Medir o pH em cada uma das regiões do tubo digestivo.

3 – Determinar o pH ótimo de atuação das endoproteases totais, a localização dessas enzimas e ainda definir quais classes de endoproteases totais estão presentes no intestino de larvas de *L. longipalpis*.

4 – Demonstrar a presença de enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina e medir o pH ótimo dessas enzimas.

5 – Determinar o número e peso molecular aparente das endoproteases solúveis presentes no tubo digestivo.

6 – Demonstrar a presença de aminopeptidases no intestino de larvas *L. longipalpis*, definir o pH ótimo de atuação para essas enzimas e determinar a sua localização ao longo do intestino.

7 – Determinar se as enzimas semelhantes à tripsina e se as aminopeptidases estão ligadas às microvilosidades das células intestinais ou se são enzimas solúveis.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Insetos

Os experimentos foram realizados utilizando-se larvas L4 de *L. longipalpis* com idade aproximada de 30 dias após a eclosão dos ovos. Os insetos utilizados eram provenientes de uma colônia fechada mantida no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esta colônia foi estabelecida a partir de espécimes coletados na cidade de Teresina, Estado do Piauí, área endêmica de leishmaniose visceral americana.

No insetário, os flebotomíneos são criados de acordo com a metodologia descrita por Modi e Tesh (1983). Os adultos são mantidos em gaiolas de náilon envoltas por um saco plástico contendo um pedaço de algodão embebido em água. Bolinhas de algodão mergulhadas em uma solução 30% de sacarose são oferecidas aos insetos como fonte de carboidratos. O repasto sanguíneo é efetuado pelas fêmeas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) previamente anestesiados com 0,3 mL de Thiopental®. Após 3 dias do repasto, os adultos são transferidos para potes plásticos com gesso no fundo onde ocorre a postura dos ovos. As larvas são mantidas nestes mesmos recipientes e recebem como alimento uma ração preparada com a mistura de terra, fezes de coelho e ração de animais. A temperatura de manutenção da colônia é de 25°C e a umidade relativa do ar é mantida em aproximadamente 70%.

4.2 – Obtenção do intestino e descrição anatômica do tubo digestivo

Utilizando um microscópio estereoscópico Olympus SZ4045 e estiletos entomológicos, as larvas L4 foram dissecadas em solução salina 0,9%. Após a retirada da cabeça e do último seguimento do corpo da larva, o intestino era empurrado para fora da cutícula. Restos de corpo gorduroso que, eventualmente, se prendiam ao intestino eram cuidadosamente separados e na maioria dos experimentos os Túbulos de Malpighi eram retirados. O intestino era então transferido para uma outra gota de solução salina para que fossem lavadas as macromoléculas provenientes da hemolinfa. Após este

procedimento, os intestinos eram depositados em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo solução salina de volume conhecido, em banho de gelo.

A descrição anatômica do tubo digestivo foi feita através de cinco intestinos dissecados e fotografados por uma câmera PM-10AK3 acoplada ao microscópio estereoscópico. As fotografias foram usadas como modelos para a preparação de um desenho esquemático.

4.3 – Determinação do pH em cada região do tubo digestivo

Corantes vitais, indicadores de pH foram misturados, na concentração de 0,4% (p/p), a uma ração preparada com pó de fígado bovino liofilizado e esterilizada em autoclave. Esta mistura tem tonalidade suficientemente clara para permitir a observação da cor assumida pelo corante no interior do tubo digestivo. Foram utilizados, separadamente, os seguintes corantes indicadores de pH: azul de bromotimol (pKa 7), vermelho de fenol (pKa 7,9) e azul de timol (pKa 8,2).

Para a execução dos experimentos, três grupos de 20 larvas foram transferidos para três potes com o fundo de gesso. Cada pote recebeu pó de fígado liofilizado misturado a apenas um dos corantes. Após 24 horas, uma parte das larvas havia ingerido a ração e o pH em cada região podia ser estimado (Gontijo et al, 1998). Isto foi feito pela comparação da cor assumida no interior do tubo digestivo, com a cor de soluções tampão 0,1M de pH conhecido, contendo os mesmos corantes. Os tubos de ensaio contendo os padrões de cor foram tratados com três gotas de clorofórmio e lacrados com rolha de borracha para impedir o crescimento de microorganismos. Para a observação dos resultados, as larvas não precisavam ser dissecadas, pois o tegumento delas é transparente e permitiu que as observações fossem feitas com as larvas ainda vivas em um microscópio estereoscópico. Um mínimo de sete, e um máximo de 13 observações foram feitas para cada grupo de larvas.

Dissecações feitas antes dos experimentos mostraram que o alimento podia ser encontrado somente no interior do intestino médio, portanto, não foi possível medir o pH nos intestinos anterior e posterior.

4.4 – Ensaio enzimáticos

4.4.1 – Soluções tampão utilizadas

Os seguintes tampões foram utilizados nos ensaios: tampão acetato/NaOH (pH 5 e 5,5); tampão ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES)/NaOH (pH 6 e 6,5); tampão ácido etanosulfônico – 4 – (2 – hidroxietil) – 1 – piperazina (HEPES)/NaOH (pH7); tampão Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS)/HCl (pH 7,5, 8 e 8,5); tampão borato/NaOH (pH9, 9,5 e 10) e finalmente tampão carbonato de sódio/HCl (pH 10,5 e 11). Todos os tampões utilizados foram preparados como soluções estoque na concentração de 0,1 M. A concentração final nos ensaios era de 0,05 M.

4.4.2 – Endoproteases digestivas

4.4.2.1 – Determinação do pH ótimo das endoproteases totais

Para a determinação do pH ótimo das endoproteases totais a azocaseína foi utilizada como substrato (Sarath et al., 1989). Foram preparados homogeneizados usando-se um conjunto de no mínimo 15 intestinos incluindo o conteúdo intestinal. Os intestinos dissecados eram transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo uma pequena quantidade de solução salina 0,9 %. O material era homogeneizado com um microhomogeneizador manual de vidro abrasivo que se encaixava perfeitamente ao fundo do tubo. Após a homogeneização, era adicionada solução salina 0,9% até o volume desejado. Essa preparação era então centrifugada a 14.000g por 10 minutos à temperatura ambiente. No final o sobrenadante era coletado e usado no ensaio.

Cinquenta microlitros de uma solução de azocaseína estoque (4%) preparada em salina 0,9% foram incubados a 30°C, durante 2 horas, em um tubo de microcentrífuga contendo também 100 µL do tampão desejado, 25 µL de uma solução aquosa de mercaptoetanol 5 mM e 25 µL de homogeneizado contendo o equivalente a um intestino da larva.

Terminada a incubação, 0,6 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% foram adicionados em cada tubo para parar a reação e precipitar a azocaseína não digerida. Após 15 minutos de espera, os tubos foram centrifugados a 10000g por 5 minutos e 0,6 mL do sobrenadante foram transferidos para outros tubos contendo 0,7 mL de NaOH

1M. A absorvância de cada amostra foi medida a 440 nm em um espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu). Os controles foram preparados substituindo-se o homogeneizado por um volume equivalente de salina. A atividade das endopeptidases totais foi expressa em densidade óptica / hora / equivalente a um intestino ($DO \cdot h^{-1} \cdot \text{intestino}^{-1}$).

Neste experimento as endoproteases totais foram ensaiadas em valores de pH entre 6,5 e 11, com intervalos de 0,5 unidades de pH.

4.4.2.2 – Determinação das classes de endoproteases presentes

O mesmo protocolo descrito na seção 4.4.2.1 foi utilizado para determinar quais classes de endoproteases estão atuando na digestão de proteínas em larvas de *L. longipalpis*. Neste caso, o ensaio da azocaseína foi conduzido na presença ou ausência de inibidores específicos para cada classe de endoprotease (Sarath et al., 1989). Os ensaios contendo inibidores de proteases foram feitos com adição de 3 μ L de solução estoque de algum dos inibidores aos 25 μ L de homogeneizado 15 minutos antes da adição dos tampões, da solução aquosa, de mercaptoetanol e do substrato. Os seguintes inibidores foram utilizados: 3,4 dicloroisocoumarino (3,4 DCI) (inibidor de serino-proteases) 10 mM dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) (concentração final 0,15 μ M), pepstatina-A (inibidor de aspartil-proteases) 1 mM dissolvida em DMSO (concentração final 0,015 μ M), transepoxysuccinyl-L-leucylamido 4-guanidino butane (E64) (inibidor de cisteíno-proteases) 1mM dissolvido em água destilada (concentração final 0,015 μ M), ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) (inibidor de metalo-proteases) 0,5M dissolvido em água destilada em pH 8,5 (concentração final 7,5 mM), *N*- α -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) (inibidor de quimotripsinas) 10 mM preparada em metanol (concentração final 0,15 μ M) e *N*- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) (inibidor de tripsinas) 10 mM dissolvido em água destilada/HCl pH 3 (concentração final 0,15 μ M). O TLCK era preparado na hora de usar. Estes experimentos foram realizados apenas em pH 8 e pH 11.

4.4.2.3 – Determinação da localização das endoproteases totais ao longo do intestino

Para obter qual é a localização das endoproteases ao longo do tubo digestivo, as endopeptidases totais foram ensaiadas usando o substrato azocaseína (Sarath et al.,

1989). Nesses experimentos foram preparados três homogeneizados diferentes. Após a dissecação das larvas o tubo digestivo era seccionado em três segmentos: intestino médio anterior com seu conteúdo, intestino médio posterior com seu conteúdo e intestino posterior com seu conteúdo. Cada um dos homogeneizados era então preparado como descrito anteriormente. O ensaio foi feito em diferentes valores de pH utilizando-se o mesmo protocolo já descrito para endoproteases totais (sessão 4.4.2.1).

4.4.2.4 – Confirmação da presença de enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina e definição do pH ótimo de atuação dessas enzimas.

Os ensaios das enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina foram feitos com o uso dos substratos sintéticos *N*- α -benzoil-L-Arginil-*p*-nitroanilida (L-BapNA) e *N*-CBZ-L-Fenilalanil-*p*-nitroanilida (N-CBZ-L-PpNA) respectivamente (Sarath et al., 1989). O preparo dos homogeneizados para esses experimentos foi feito de maneira semelhante àquela descrita para o ensaio das endoproteases totais (sessão 4.4.2.1), porém a quantidade mínima de insetos utilizados na preparação de cada homogeneizado foi cinco. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 μ L do tampão desejado, 50 μ L de homogeneizado (contendo o equivalente a 0,25 intestinos médios), 40 μ L de água e 10 μ L de L-BApNA 10 mM ou N-CBZ-L-PpNA 0,5 mM previamente dissolvidos em DMSO (as concentrações finais dos substratos nos ensaios foram 0,5 ou 0,025 mM, respectivamente). Antes de iniciar os ensaios, a placa era preaquecida a 37°C em um aparelho leitor de microplacas Benchmark (Bio-Rad) durante dois minutos e os ensaios eram conduzidos nesta temperatura. Os ensaios foram iniciados pela adição de um dos substratos e prosseguia durante 30 minutos com leituras sendo feitas a 415 nm a cada 30 segundos. Os controles foram preparados substituindo-se o homogeneizado por um volume equivalente de salina. A atividade foi expressa como velocidade máxima, normalizada para a quantidade de homogeneizado equivalente ao de um intestino (mDO.min⁻¹. intestino⁻¹).

Novamente, essas enzimas foram ensaiadas em valores de pH entre pH 6,5 e pH 11, com intervalos de 0,5 unidades de pH.

4.4.2.5 – Determinação do número de endoproteases e do seu peso molecular aparente

Uma eletroforese em gel de poli(acrilamida) descontínuo copolimerizado com gelatina foi feita de acordo com a metodologia de Lammeli (1970) e modificações propostas por Heussen and Dowdle (1980). O gel de acrilamida/bis(acrilamida) a 10% continha 0,1% de gelatina. As amostras (homogeneizado de intestino médio total centrifugado a 14.000 g por 10 minutos) foram preparadas em tampão de amostra sem mercaptoetanol e sem aquecimento. Em cada canaleta utilizada no gel a amostra continha uma quantidade relativa de 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64 intestinos. A corrida eletroforética ocorreu no aparelho Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad), a 100 V até que o marcador azul de bromofenol atingisse a base do gel.

Terminada a eletroforese, o gel foi lavado em uma solução 2,5 % de Triton X-100 em água durante 1 hora para que todo o dodecil sulfato de sódio (SDS) fosse retirado e as endoproteases fossem renaturadas. O gel foi então incubado por 12 horas em tampão Borato - NaOH 0,1 M pH 10 e após isso foi lavado em água destilada e transferido para um recipiente contendo o corante azul de Coomassie (uma solução contendo 0,1 % Azul de Coomassie G-250, 25% de metanol e 5% de ácido acético). Após a coloração das proteínas o gel era então descorado em uma solução de 10% de metanol e 5% de ácido acético. Assim, as bandas de endopeptidases aparecem como regiões não coradas em meio a um fundo azul.

O padrão de pesos moleculares, preparado com proteínas pré-coradas (low molecular weight Gibco), permitiu calcular o peso molecular aproximado de cada banda. Para isso, antes do gel ser tratado com Triton X-100 e ser corado, a posição de cada banda do padrão era marcada no gel com um pequeno orifício.

4.4.3 – Exoproteases digestivas

4.4.3.1 – Verificação da presença de aminopeptidases

Para determinar a atividade de aminopeptidases no intestino de larvas de *L. longipalpis* os seguintes substratos foram usados: Alanina-p-nitroanilida (Alanina-pNA), Arginina-p-nitroanilida (Arginina-pNA), Fenilalanina-p-nitroanilida (Fenilalanina-pNA), Glicina-p-nitroanilida (Glicina-pNA), Leucina-p-nitroanilida (Leucina-pNA), Lisina-p-nitroanilida (Lisina-pNA), Metionina-p-nitroanilida (Metionina-pNA) e Valina-p-nitroanilida (Valina-pNA) (Sarath et al., 1989).

O preparo dos homogeneizados para esses experimentos foi feito usando-se um conjunto de no mínimo 25 intestinos inteiros, incluindo o conteúdo intestinal. Os intestinos dissecados eram transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo uma pequena quantidade de solução salina 0,9 %. O material era homogeneizado com um microhomogeneizador manual de vidro abrasivo que se encaixava perfeitamente ao fundo do tubo. Após a homogeneização era adicionada solução salina 0,9% até o volume desejado. Essa preparação era então centrifugada a 14.000g por 10 minutos a temperatura ambiente, no final o sobrenadante era coletado e usado no ensaio.

Cada ensaio foi preparado como se segue: Em um poço de uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100µL do tampão desejado, 30 µL de água e 20 µL do substrato 10 mM previamente dissolvido em DMSO (concentração final 1 mM). Antes de iniciar os ensaios, a placa foi aquecida a 37°C em um aparelho leitor de microplacas. Os ensaios foram iniciados pela adição de 50 µL de amostra (contendo o equivalente a 0,5 intestinos) e prosseguia durante 30 minutos com leituras sendo feitas a 415 nm a cada 30 segundos. Este experimento foi conduzido em pH 7, pH 8,5 e pH 11 e os controles foram feitos substituindo-se a amostra por um volume equivalente de salina. A atividade foi expressa como velocidade máxima, normalizada para a quantidade de homogeneizado equivalente a uma larva ($\text{mDO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{intestino}^{-1}$).

4.4.3.2 – Definição do pH ótimo para atividade de aminopeptidases

A obtenção de uma curva de pH versus atividade para as aminopeptidases foi feita utilizando-se o protocolo descrito na sessão 4.4.3.1. Porém, neste experimento foram usados apenas os substratos Alanina-pNA, Leucina-pNA, Lisina-pNA e Metionina-pNA. Neste caso, os valores de pH utilizados nos ensaios variaram de pH 5 a pH 10, com intervalos de 0,5 unidades de pH.

4.4.3.3 – Determinação da localização das aminopeptidases ao longo do intestino

A distribuição da atividade de aminopeptidases ao longo do intestino de larvas de *L. longipalpis* foi analisada segundo o método descrito na sessão 4.4.3.1. Foram utilizados os substratos Alanina-pNA, Leucina-pNA, Lisina-pNA e Metionina-pNA. Neste caso, os ensaios foram conduzidos no pH 7,5 e dois tipos diferentes de homogeneizados foram testados: o primeiro contendo apenas extratos do intestino

médio anterior juntamente com seu conteúdo e o segundo contendo extratos apenas do intestino médio posterior com o seu conteúdo.

4.4.4 – Caracterização das enzimas como solúveis ou ligadas às membranas do epitélio intestinal

4.4.4.1 – Caracterização das endoproteases como solúveis ou ligadas às membranas do epitélio intestinal

Ensaio utilizando L-BApNA (sessão 4.4.2.4) foram feitos para determinar a distribuição da atividade tripsinolítica entre o lúmen intestinal e as células do intestino médio. Neste experimento dois tipos de amostra foram preparados: amostras contendo somente a parede do intestino médio, e amostras contendo apenas o conteúdo intestinal. Após a dissecação e separação das partes em dois tubos diferentes, as amostras foram homogeneizadas e o volume da preparação foi ajustado com uma solução salina contendo Triton X-100 de modo que a concentração final de detergente fosse de 1% e que cada 50 µL contivesse o equivalente a 0,25 paredes de intestino ou seu conteúdo equivalente. Com o auxílio de uma pipeta o volume das duas amostras foi agitado, de modo que o Triton X-100 pudesse agir dissolvendo as membranas celulares e liberando as proteínas ligadas às essas membranas. Estas preparações foram feitas com um mínimo de cinco intestinos médios. As duas amostras foram centrifugadas a 14000g por 10 minutos a temperatura ambiente e os sobrenadantes foram ensaiados no pH 8,5, de acordo com o protocolo descrito na sessão 4.4.2.4.

4.4.4.2 – Caracterização das exoproteases como solúveis ou ligadas às membranas do epitélio intestinal

Para a caracterização das aminopeptidases como solúveis ou ligadas à parede intestinal, um método diferente foi usado de acordo com Gontijo et al. (1998). Esta metodologia é baseada no fato de que as moléculas de enzimas ligadas às microvilosidades das células intestinais vão se sedimentando durante a centrifugação enquanto que as moléculas solúveis não se sedimentam. Alanina-pNA, Leucina-pNA, Lisina-pNA e Metionina-pNA foram ensaiados em um mesmo experimento. Para isso, 1440 µL de homogeneizado foram preparados com 16 intestinos médios e seus

conteúdos utilizando um microhomogeneizador de vidro. Em quatro tubos de microcentrífuga foram adicionados 360 μL do homogeneizado e cada um deles foi centrifugado a 12000 g durante zero, 1, 3 e 5 minutos. Após a centrifugação, foram coletados cuidadosamente 180 μL da parte superior do conteúdo de cada tubo sem perturbar a porção inferior. Estas porções foram transferidas para outros tubos de microcentrífuga. Antes de proceder aos ensaios com o material proveniente das porções superiores e inferiores, 20 μL de Triton X-100 10% foram adicionados a todos os tubos de modo que a concentração final do detergente fosse de 1%. Após homogeneização do conteúdo de cada um dos oito tubos, uma alíquota de 50 μL contendo o equivalente a 0,5 intestinos médios foi coletada de cada um deles e ensaiada no pH 7,5 conforme foi descrito anteriormente para aminopeptidases (sessão 4.4.3.1) com cada um dos 4 substratos. A atividade foi expressa como velocidade máxima normalizada para uma quantidade de homogeneizado equivalente a um intestino médio inteiro ($\text{mDO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{intestino}^{-1}$).

5 – RESULTADOS

5.1 – Anatomia macroscópica do intestino de larvas de *L. longipalpis*

O tubo digestivo das larvas de *L. longipalpis*, quando estirado após a dissecação, apresenta comprimento um pouco maior que o comprimento da larva L4. O intestino anterior é curto em relação ao tubo digestivo como um todo e durante as dissecações feitas, não foram encontradas glândulas salivares. Contudo, um estudo mais detalhado precisa ser feito para confirmar sua ausência. O esôfago das larvas é muito delgado e não foi possível identificar um divertículo, o que indica que não há armazenamento de alimento no intestino anterior. O proventrículo se encontra junto ao início do intestino médio e apesar de possuir forma arredondada, o canal alimentar que o atravessa é muito estreito (**figura 5**).

O intestino médio corresponde à maior parte do tubo digestivo e apresenta forma cilíndrica. Cecos gástricos não foram observados nas larvas de *L. longipalpis*. Durante as dissecações, percebemos que o alimento era encontrado apenas dentro da membrana peritrófica no intestino médio. Essa membrana peritrófica reveste todo o interior do intestino médio e tem forma tubular, o que é típico das membranas peritróficas do tipo II. Foi observado um espaço ectoperitrófico bem evidente (**figura 5**).

O local onde se inserem os Túbulos de Malpighi é chamado de piloro, e ali começa o intestino posterior. Nas larvas de *L. longipalpis* o intestino posterior é curto e possui o íleo muito delgado. Na ponta do íleo podemos perceber uma papila anal (ou reto) dilatada anteriormente assumindo um formato cônico (**figura 5**).

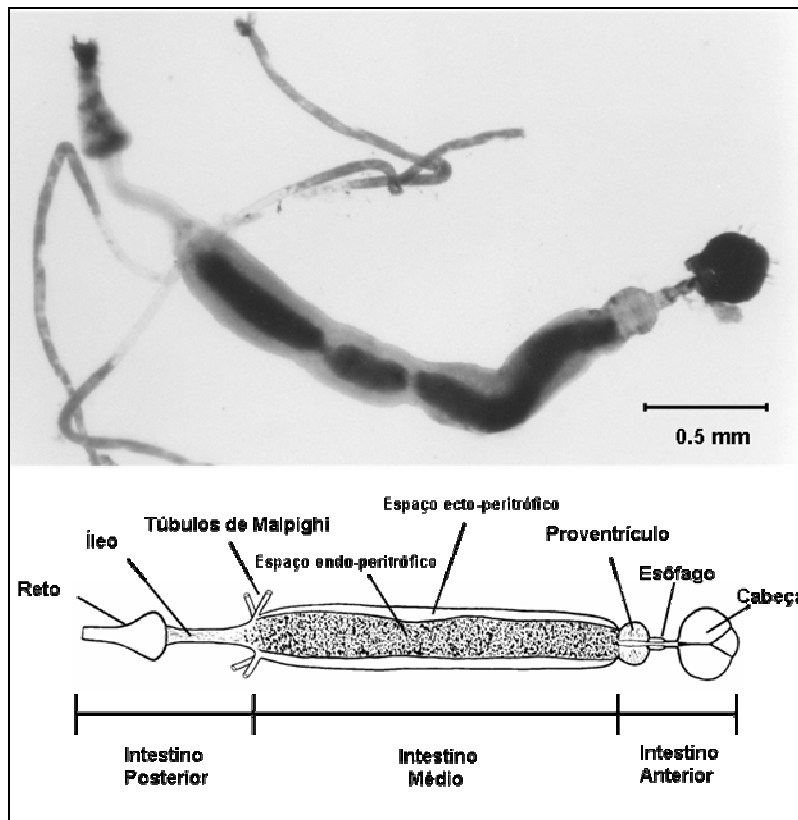


Figura 5: Fotografia e desenho esquemático do intestino de larvas L4 de *L. longipalpis*. A fotografia mostra o aspecto geral do intestino de uma larva L4 observada sob microscópio estereoscópico. Já o desenho esquemático mostra a localização do intestino anterior, intestino médio e intestino posterior e ainda aponta os diversos órgãos e estruturas identificadas.

5.2 – pH no interior do intestino de larvas de *L. longipalpis*

O uso dos três corantes vitais indicadores de pH permitiu que o pH fosse estimado apenas no interior do intestino médio, pois o alimento parece passar rapidamente pelo intestino anterior e intestino posterior. A **figura 6** mostra três fotografias de larvas de *L. longipalpis* alimentadas cada uma com um dos corantes vitais indicadores de pH usados. Os valores de pH encontrados em cada região do intestino médio estão mostrados no esquema apresentado na **figura 7**. Na região anterior do intestino médio, encontramos um valor de $\text{pH} \geq 9$. Infelizmente, como as larvas não aceitaram ingerir corantes com valores de pK_a mais elevado, não foi possível determinar o pH máximo desta região. A região mediana do intestino médio apresentou pH alcalino, com valores entre pH 7,5 e pH 8,5. Já a região posterior do intestino médio é levemente ácida. O pH encontrado ali está entre pH 6,5 e pH 7.



Larva alimentada com o corante Azul de Bromotimol



Larva alimentada com o corante Vermelho de Fenol



Larva alimentada com o corante Azul de Timol

Figura 6: Larvas L4 de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com corantes vitais indicadores de pH. Três grupos de 20 larvas foram separados em três potes diferentes. Para cada grupo de larvas, foi oferecido como alimento uma mistura de pó de fígado liofilizado contendo apenas um dos corantes vitais indicadores de pH na concentração de 0,4% (p/p). A coloração assumida pelo corante vital indicador de pH no interior do intestino médio podia ser observada através da cutícula do inseto, uma vez que essa é suficientemente transparente.

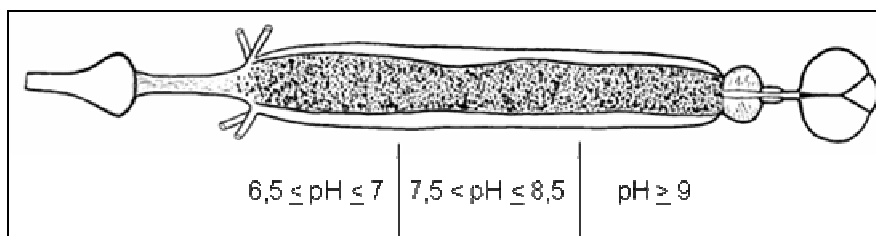


Figura 7: pH encontrado em cada uma das regiões do intestino médio de larvas L4 de *L. longipalpis*. Os valores obtidos foram estimados a partir da comparação entre a coloração assumida no interior do intestino médio e a coloração de soluções do mesmo corante com o pH conhecido.

5.3 – pH ótimo das endoproteases totais

A atividade proteolítica de extratos do intestino de larvas de *L. longipalpis* foi medida usando-se o substrato inespecífico azocaseína e a curva de pH *versus* atividade de proteases totais é mostrada na **figura 8**. A atividade encontrada nos ensaios realizados em pH 6,5 – 7 é baixa, e à medida que o meio se torna alcalino há um aumento na taxa de digestão da azocaseína. Entre o pH 7,5 e o pH 9 a atividade das endoproteases é praticamente constante mas podemos perceber um pequeno pico de atividade na faixa de pH 8,0 – 8,5. A partir do pH 9 a eficiência da digestão de azocaseína vai aumentando até atingir seu valor máximo no pH 11. A atividade relativa de 100% refere-se à maior atividade encontrada no ensaio e neste caso 100% foi igual a $0,136 \pm 0,029 \text{ DO} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{intestino}^{-1}$.

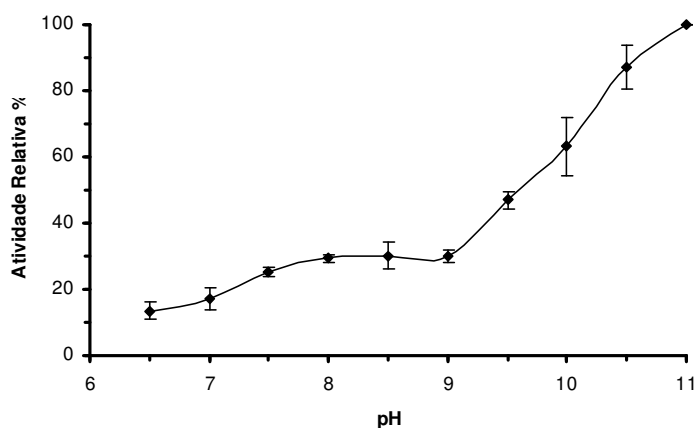


Figura 8: Curva de pH versus atividade para endoproteases totais presentes no intestino de larvas de *L. longipalpis*. Os ensaios foram feitos usando-se azocaseína como substrato e homogeneizados de pelo menos 15 intestinos. (n=3)

5.4 – Atividade endoproteolítica na presença e ausência de inibidores específicos para cada classe de endoproteases

A inibição da atividade de proteases totais foi testada com o uso dos seguintes inibidores: 3,4 DCI (inibidor de serino-proteases em geral), TLCK (inibidor de tripsinas), TPCK (inibidor de quimotripsinas), E 64 (inibidor de cisteíno-proteases), Pepstatina A (inibidor de aspartil-proteases) e EDTA (inibidor de metalo-proteases).

A **figura 9** mostra o perfil de inibição da digestão de azocaseína no pH 8. Podemos perceber que o uso dos inibidores E 64 e Pepstatina A não alterou a atividade proteolítica total, indicando que enzimas do tipo cisteíno-protease e aspartil-protease não contribuem para a digestão de proteínas em larvas de *L. longipalpis*. Quando o composto 3,4 DCI foi usado como inibidor, a atividade sofreu uma queda de aproximadamente 85%, demonstrando assim que serino-proteases são responsáveis pela degradação inicial das moléculas de proteína. Comparando a inibição causada pelo TLCK e TPCK, percebemos que no pH 8 a atividade tripsinolítica é maior que a atividade quimotripsinolítica. A digestão da azocaseína também foi inibida por EDTA, um inibidor de metalo-proteases.

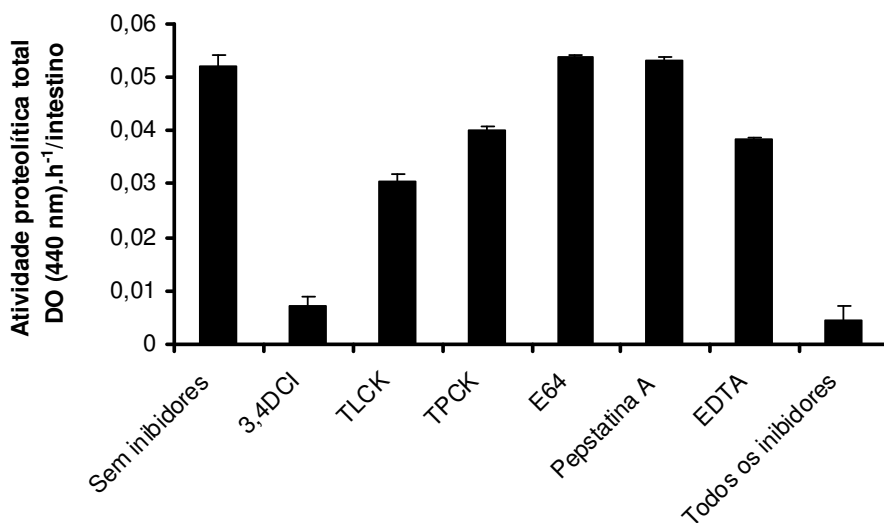


Figura 9: Atividade proteolítica total na presença e na ausência de inibidores específicos para cada classe de proteases em pH 8. As proteases totais foram ensaiadas usando-se homogêneos contendo no mínimo 15 intestinos e azocaseína como substrato. Para melhor atuação dos inibidores, estes foram adicionados à amostra 15 minutos antes da adição do substrato, do tampão e da solução aquosa de mercaptoetanol. (n=3)

O perfil de inibição das proteases no pH 11 (**figura 10**) foi semelhante àquele encontrado no pH 8. Novamente, a presença de cisteíno-proteases e aspartil-proteases não foi detectada e houve inibição causada por EDTA. Porém neste caso, a ação inibidora do 3,4 DCI não foi tão forte, ficando em torno de 26%. O TPCK foi capaz de inibir a digestão de azocaseína mais eficientemente que o TLCK, mostrando que neste valor de pH as quimotripsinas contribuem mais que as tripsinas para a digestão das proteínas.

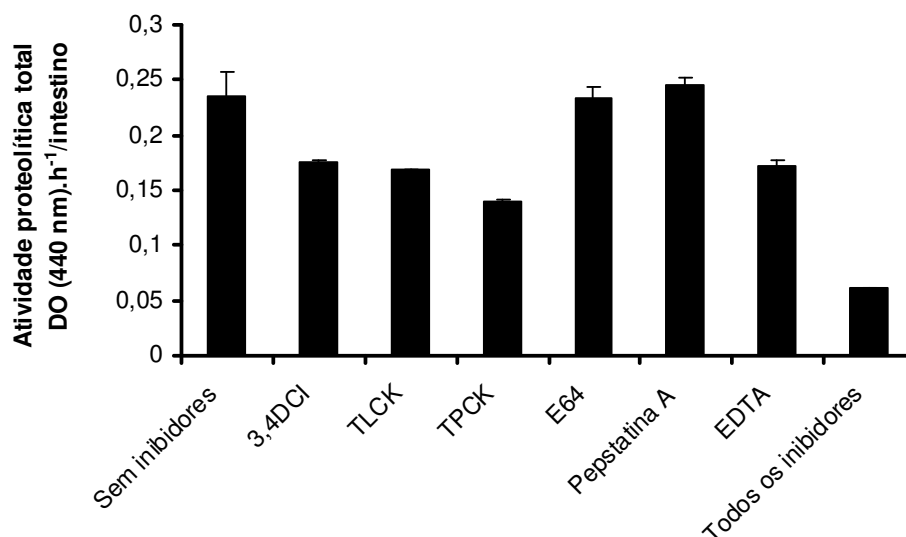


Figura 10: Atividade proteolítica total na presença e na ausência de inibidores específicos para cada classe de proteases em pH 11. As proteases totais foram ensaiadas usando-se homogeneizados contendo no mínimo 15 intestinos e azocaseína como substrato. Para melhor atuação dos inibidores, estes foram adicionados à amostra 15 minutos antes da adição do substrato, do tampão e da solução aquosa de mercaptoetanol. (n=3)

5.5 – Localização das proteases totais ao longo do intestino

A **figura 11** mostra a distribuição da atividade endoproteolítica ao longo do tubo digestivo de larvas de *L. longipalpis* em diferentes valores de pH. A atividade de endoproteases totais é maior no intestino médio anterior, onde essas enzimas são provavelmente produzidas e secretadas. No intestino médio posterior, a atividade proteolítica é consideravelmente menor, sendo que em pH 11 a atividade medida nas preparações de intestino médio posterior representa apenas 46% da atividade medida neste mesmo valor de pH no intestino médio anterior. O gráfico mostra claramente que

não há atividade proteolítica no intestino posterior. Para este ensaio, a atividade máxima obtida (100%) foi igual $0,210 \pm 0,119 \text{ DO} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{intestino}^{-1}$.

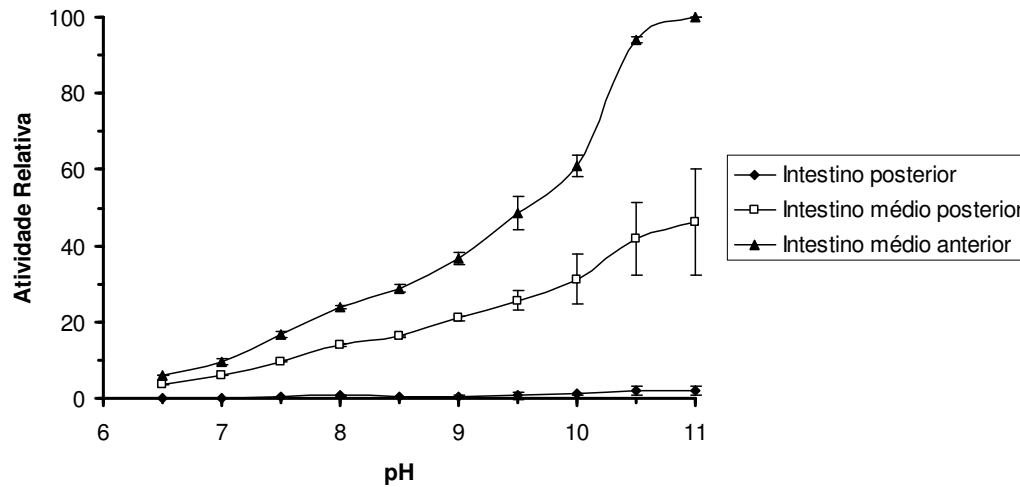


Figura 11: Atividade de endoproteases totais ao longo do intestino e em diferentes valores de pH. Os ensaios foram feitos com azocaseína como substrato e os homogeneizados foram preparados com intestino posterior, intestino médio posterior e intestino médio anterior, separadamente. Um mínimo de 15 partes de intestino foi usado em cada homogeneizado. (n=3)

5.6 – Presença de enzimas semelhantes à tripsina e à quimotripsina e pH ótimo dessas enzimas

Além do uso de inibidores específicos para tripsinas e quimotripsinas, foram usados também substratos específicos para cada uma dessas enzimas. O substrato sintético L-BApNA é usado na detecção de enzimas semelhantes à tripsina e o N-CBZ-L-PpNA na detecção de enzimas semelhantes à quimotripsina. Com o uso desses dois substratos foi possível confirmar a presença dessas enzimas e construir o gráfico de pH *versus* atividade para cada uma delas.

A **figura 12** representa a curva de pH das tripsinas intestinais de larvas de *L. longipalpis*. A atividade tripsinolítica é praticamente nula no pH 6,5 e começa a crescer em valores de pH mais alcalinos. Podemos observar dois picos de atividade, referentes ao pH 8,5 e pH 10. Acima do pH 10 a atividade tripsinolítica começa a cair. O maior valor de atividade encontrado (100%) foi $35,7 \pm 6,3 \text{ mDO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{intestino}^{-1}$.

Já a atividade quimotripsinolítica apresentou uma curva de pH muito semelhante àquela descrita para as proteases totais. Novamente houve um aumento na atividade em ambientes de pH mais alcalino. Parece haver também um pico menor de

atividade em pH 8-8,5 e o valor máximo de atividade medido foi alcançado no pH 11. Neste caso, 100% equivaleu $5,2 \pm 0,9 \text{ mDO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{intestino}^{-1}$ (figura 13).

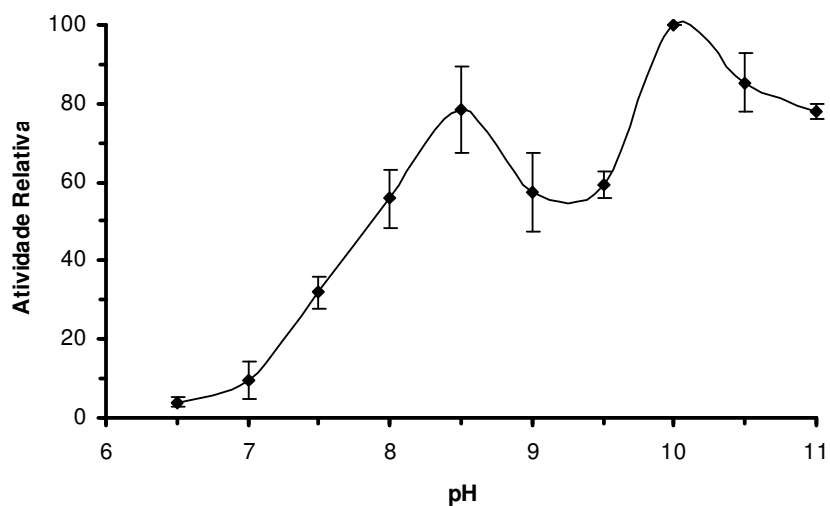


Figura 12: Curva de pH versus atividade para tripsinas intestinais de larvas de *L. longipalpis*. As tripsinas foram ensaiadas usando-se o substrato sintético L-BApNA e um mínimo de cinco intestinos no homogeneizado. (n=4)

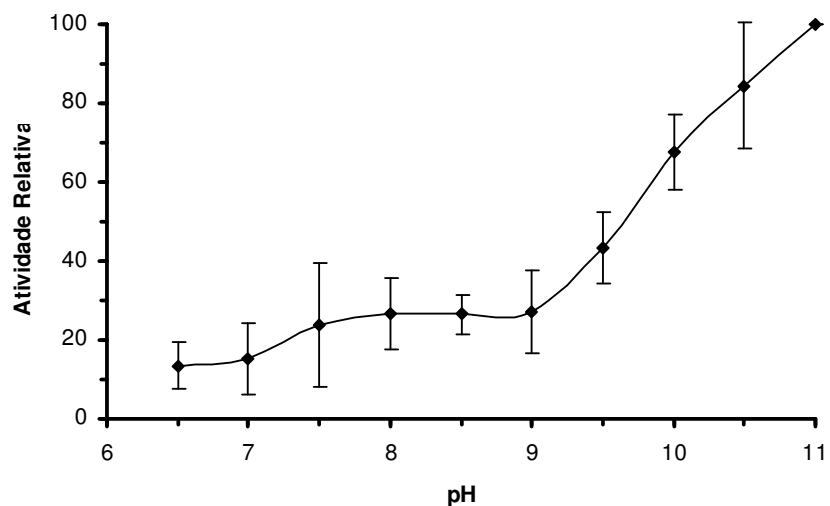


Figura 13: Curva de pH versus atividade para quimotripsinas intestinais de larvas de *L. longipalpis*. As quimotripsinas foram ensaiadas usando-se o substrato sintético N-CBZ-L-PpNA e um mínimo de cinco intestinos no homogeneizado. (n=4)

5.7 – Atividade proteolítica em gel de poliacrilamida

Com o intuito de investigar o número e o peso molecular das diferentes formas de enzimas proteolíticas presentes no intestino das larvas, um ensaio em gel de poliacrilamida contendo gelatina foi feito. Após a eletroforese, reativação das enzimas pelo Triton X-100, coloração e descoloração do gel, foi possível distinguir as bandas de atividade proteolítica como áreas claras em um fundo escuro. Para conseguirmos visualizar as bandas que estariam “encobertas” por uma área grande de hidrólise, uma série de diluições na amostra foram feitas. Ao final, 11 bandas relativas à atividade proteolítica foram encontradas e o peso molecular aproximado variou de 102 kDa à 33 kDa. Destas, 7 bandas principais foram observadas, com pesos moleculares aparentes de 102, 92, 82, 67, 49, 37 e 33 kDa. Outras 4 bandas menos evidentes possuíam pesos moleculares aparentes de 77, 74, 45 e 40 kDa (**figura 14**).

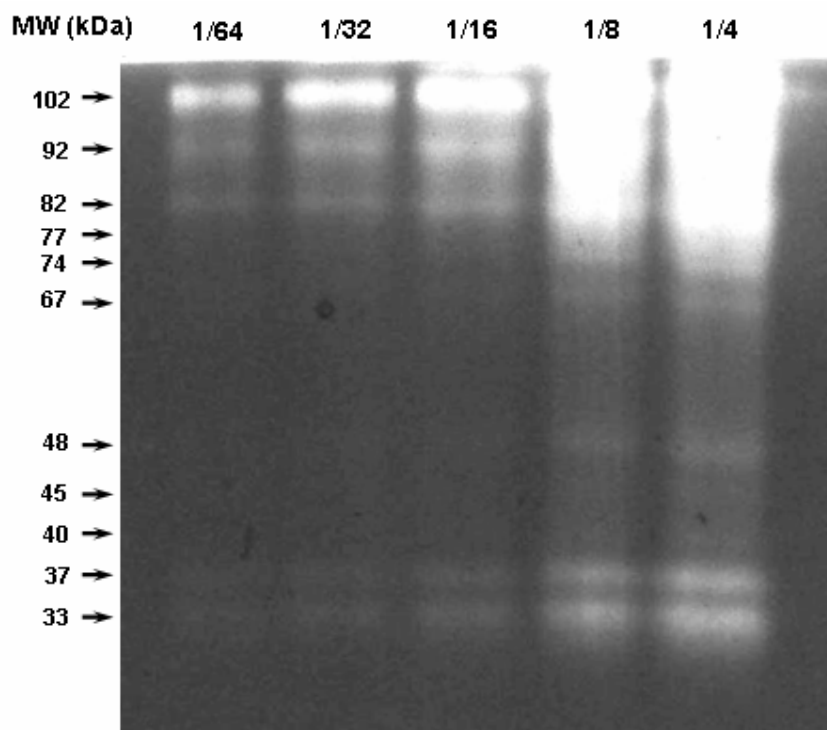


Figura 14: Separação das endoproteases intestinais de larvas de *L. longipalpis* por SDS-PAGE contendo gelatina. A eletroforese foi conduzida em um gel de acrilamida/bisacrilamida 10%, contendo 0,1% de gelatina. As amostras aplicadas nas cinco canaletas continham o equivalente a 1/64, 1/32, 1/16, 1/8 e 1/4 de intestino.

5.8 – Presença de aminopeptidases no intestino de larvas de *L. longipalpis*

Para o estudo das aminopeptidases intestinais foram usados, inicialmente, oito substratos sintéticos diferentes: Alanina-pNA, Arginina-pNA, Fenilalanina-pNA, Glicina-pNA, Leucina-pNA, Lisina-pNA, Metionina-pNA e Valina-pNA. A **tabela 1** mostra os valores de atividade encontrados para cada um desses substratos em pH 7, pH 8,5 e pH 11.

Os ensaios enzimáticos mostraram atividade de aminopeptidases sobre todos os substratos, porém alguns deles apresentaram valores mais elevados que outros. As aminopeptidases das larvas de *L. longipalpis* parecem preferir os substratos Alanina-pNA, Arginina-pNA, Leucina-pNA, Lisina-pNA e Metionina-pNA. Dentre os três valores de pH usados nos ensaios, o pH 7 foi aquele em que se mediu os maiores valores de atividade.

5.9 – pH ótimo de atuação das aminopeptidases

A partir de resultados prévios obtidos com o uso dos oito substratos para aminopeptidases, foram escolhidos quatro substratos para caracterizar o pH ótimo de ação dessas enzimas.

A curva de pH das aminopeptidases usando-se o substrato Lisina-pNA mostra uma pequena atividade em pH 5. À medida que o pH do meio se torna próximo de neutro essa atividade aumenta e atinge o valor máximo em pH 7,5. Há uma diminuição brusca da atividade após o pH 8,5 e no pH 9,5-10 essa atividade é totalmente inibida. Neste caso 100% da atividade foi igual a $16,9 \pm 2,7$ mDO. min⁻¹ . intestino⁻¹ .(**figura 15**) Com o uso do substrato Alanina-pNA, a atividade de aminopeptidases é inexistente em pH 5 e pH 10. Neste caso, as aminopeptidases atuam em condições ótimas numa faixa de pH entre pH 7 e pH 8,5. Com este substrato a atividade máxima (100%) encontrada foi $18,4 \pm 7,8$ mDO. min⁻¹ . intestino⁻¹ .(**figura 15**) Usando-se Leucina-pNA com substrato, o pH de atividade máxima foi pH 7,5 e, novamente a atividade foi próxima de zero em pH 10. Cem por cento da atividade foi $13,6 \pm 0,8$ mDO. min⁻¹ . intestino⁻¹ .(**figura 15**) Finalmente, quando Metionina-pNA foi usado como substrato a curva de pH das aminopeptidases atingiu atividade máxima em pH 7. Baixos valores de pH (menores que pH 5,5), e altos (maiores que pH 9) apresentaram pouca atividade. A atividade máxima neste caso foi $15,4 \pm 1,4$ mDO. min⁻¹ . intestino⁻¹ (**figura 15**).

Substrato	Atividade	Atividade	Atividade
	(mDO. min ⁻¹ . intestino ⁻¹ ± DP*)	(mDO. min ⁻¹ . intestino ⁻¹ ± DP*)	(mDO. min ⁻¹ . intestino ⁻¹ ± DP*)
	pH 7	pH 8,5	pH 11
Alanina pNA	18 ± 2,82	18,8 ± 1,69	1,7 ± 1,83
Arginina pNA	16 ± 2,82	11,2 n=1	0,6 ± 0,84
Fenilalanina pNA	8,5 ± 1,02	6,8 n=1	0 ± 0
Glicina pNA	2,2 ± 0,28	2,6 ± 1,97	0 ± 0
Leucina pNA	12,6 ± 0,4	10,2 ± 0,84	1,1 ± 1,55
Lisina pNA	17,2 ± 1,97	14,9 ± 0,42	1 ± 0,84
Metionina pNA	19,1 ± 0,42	14,3 ± 1,27	2,8 ± 1,69
Valina pNA	1,2 ± 1,69	1,7 ± 2,4	0 ± 0

Tabela 1: Atividade de aminopeptidase intestinais em larvas de *L. longipalpis* usando vários substratos sintéticos em pH 7, pH 8,5 e pH 11.

*DP = desvio padrão. (n=2)

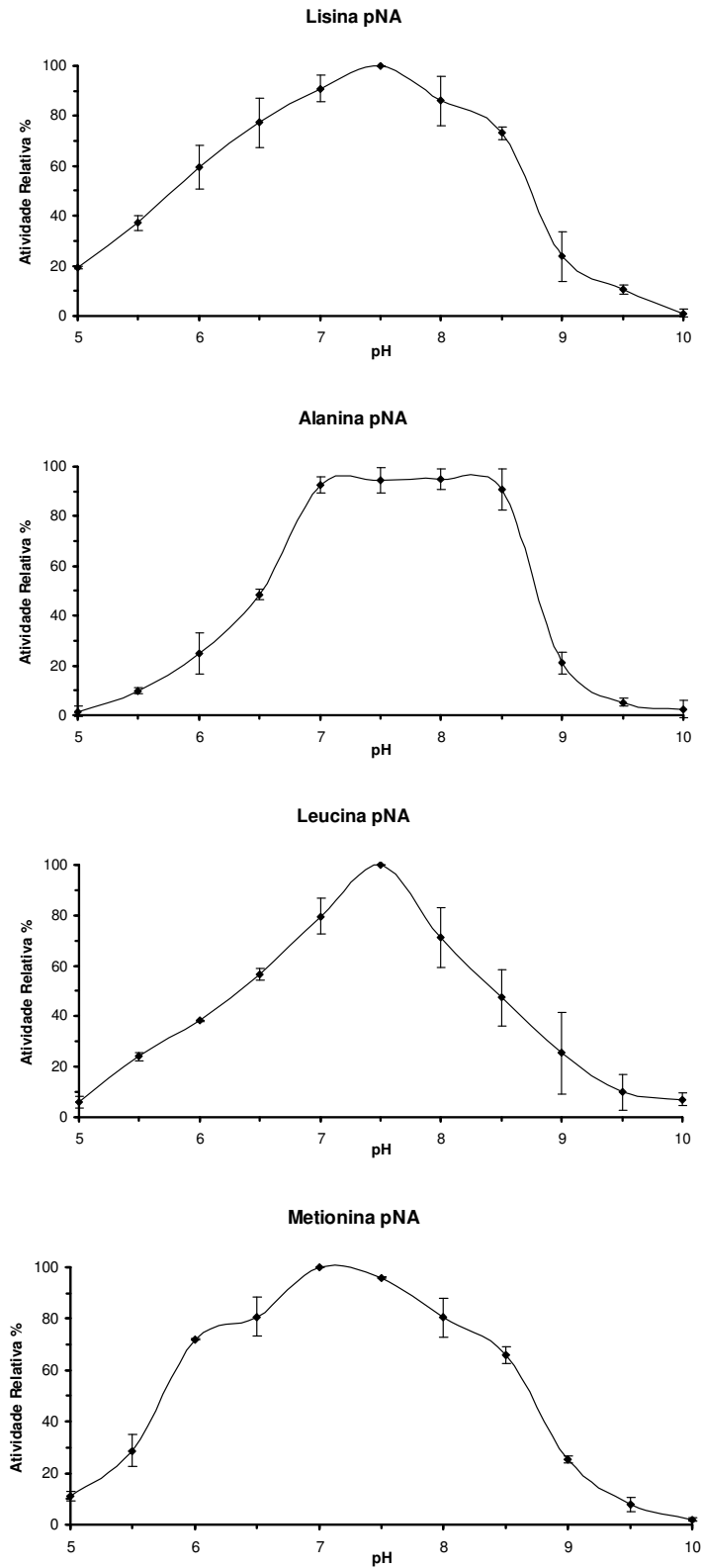


Figura 15: Curva de pH versus atividade para aminopeptidases. Foram usados quatro substratos sintéticos: Lisina pNA, Alanina pNA, Leucina pNA e Metionina pNA e os homogeneizados continham no mínimo 25 intestinos. (n=3)

5.10 – Localização das aminopeptidases ao longo do intestino

Para determinar em qual local do intestino existe maior atividade de aminopeptidases, ensaios usando Alanina-pNA, Leucina-pNA, Lisina-pNA e Metionina-pNA foram feitos com amostras do intestino médio anterior e intestino médio posterior separadamente. A **figura 16** mostra a distribuição da atividade de aminopeptidases ao longo do intestino médio de larvas de *L. longipalpis*. Podemos observar claramente que, para os quatro substratos usados, a atividade de aminopeptidases é altamente concentrada na parte posterior do intestino médio. A atividade encontrada no intestino médio anterior foi, na média para os quatro substratos, 91% menor do que aquela encontrada no intestino médio posterior.

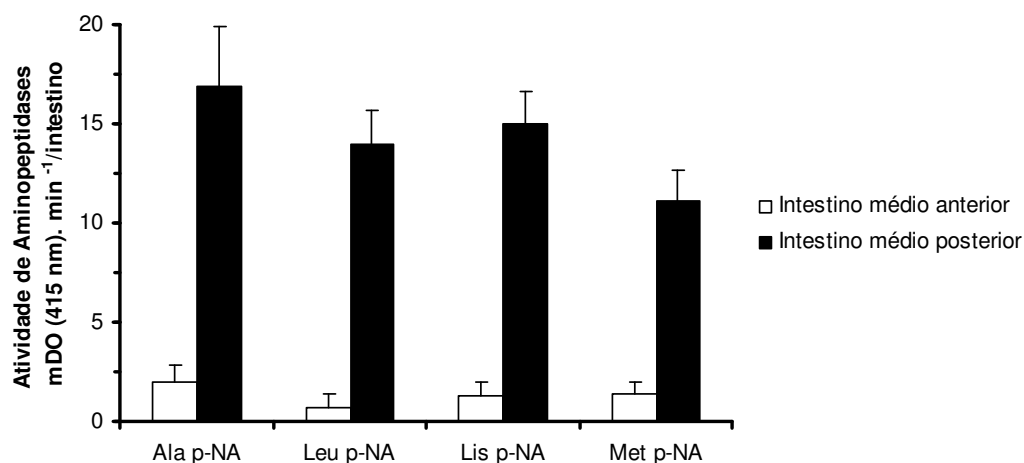


Figura 16: Distribuição da atividade de aminopeptidases ao longo do intestino médio de larvas de *L. longipalpis*. Os ensaios foram feitos usando-se Alanina-pNA, Leucina-pNA, Lisina-pNA e Metionina pNA como substrato e homogeneizados contendo apenas a parte anterior do intestino médio ou a parte posterior do intestino médio. Neste caso, um mínimo de 10 partes de intestino foram usadas em cada homogeneizado. (n=2)

5.11 – Distribuição da atividade tripsinolítica entre o conteúdo e o epitélio intestinal

A caracterização das endoproteases (do tipo tripsina) como solúveis ou ligadas às microvilosidades do epitélio intestinal foi feita usando-se o substrato L-BApNA em pH 8,5. Neste experimento, dois tipos de amostra foram usadas: uma delas contendo apenas o conteúdo intestinal e a outra contendo a parede intestinal sem o conteúdo. Como podemos observar na **tabela 2**, praticamente toda a atividade tripsinolítica é

encontrada na luz do intestino médio. Apenas 3,6 % da atividade total (atividade encontrada na luz intestinal mais atividade encontrada na parede intestinal) estão presentes nas células que compõem o epitélio intestinal.

	Atividade (mDO. min ⁻¹ / intestino ± DP*)	Atividade Relativa %
Lúmen intestinal	16.4 ± 2.8	96.4
Parede intestinal	0.6 ± 0.3	3.6
Total	-	100

Tabela 2: Distribuição da atividade tripsinolítica entre o conteúdo e a parede intestinal de larvas L4 de *L. longipalpis* *DP = desvio padrão. (n=2)

5.12 – Distribuição da atividade de aminopeptidases entre o conteúdo e o epitélio intestinal

Para definir se as aminopeptidases estão solúveis na luz do intestino ou presas às microvilosidades das células intestinais, ensaios com os substratos Alanina-pNA, Leucina-pNA, Lisina-pNA e Metionina-pNA foram conduzidos com amostras submetidas a diferentes tempos de centrifugação. Observando a **tabela 3** podemos perceber que nos ensaios realizados com amostras que não sofreram centrifugação (zero minutos), a atividade encontrada no material coletado do fundo do tubo é semelhante àquela encontrada no material coletado da parte superior do tubo. Para todos os substratos testados, na medida em que o tempo de centrifugação era aumentado a atividade do material coletado do fundo do tubo aumentava enquanto a atividade encontrada no material coletado da parte superior do tubo diminuía proporcionalmente. Esses resultados indicam que a atividade de aminopeptidases no intestino de larvas de *L. longipalpis* está associada às células do epitélio intestinal.

Substrato	Tempo de Centrifugação (minutos)	Atividade do material coletado da	Atividade do material coletado da	
		parte superior do tubo (mDO. minuto ⁻¹ . intestino ⁻¹)	parte inferior do tubo (mDO. minuto ⁻¹ . intestino ⁻¹)	
Alanina pNA	0	100,2	115,4	
	1	101,8	125,8	
	3	94	143,2	
	5	83,2	151,4	
	Leucina pNA	0	98,8	95,8
Leucina pNA	1	90,8	109,4	
	3	76,2	126	
	5	70	128,4	
	Lisina pNA	0	184	198,2
	Lisina pNA	1	169,2	219,8
3		149,4	254,6	
5		142,2	258,6	
Metionina pNA		0	140,2	139
Metionina pNA		1	130,2	151,6
	3	108,6	164,4	
	5	95,8	178,8	

Tabela 3: Caracterização das aminopeptidases intestinais de larvas de *L. longipalpis* como solúveis ou ligadas às membranas do epitélio intestinal

6 – DISCUSSÃO

Os insetos compreendem cerca de 75% do número de espécies animais conhecidas e podem ser considerados o grupo mais bem sucedido do reino animal (Ross et al., 1982). Uma das razões para esse sucesso é que os insetos se adaptaram para quase todos os nichos ecológicos e hábitos alimentares existentes. Podemos encontrar insetos utilizando fontes de alimentação tão variadas como tecidos animais e vegetais, cera, lã, detritos, microorganismos, madeira, sangue e seiva. Sendo assim, esses animais constituem excelentes modelos para o estudo das funções digestivas (Terra e Ferreira, 1994; Terra et al., 1996).

A habilidade de explorar diferentes materiais como fonte de alimento faz com que alguns insetos sejam considerados pragas na agricultura, indústria da construção, saúde humana e veterinária. Assim, há necessidade de conhecimento sobre o intestino e digestão em insetos como pré-requisito para o desenvolvimento de métodos de controle que atuem através do intestino, como por exemplo, o uso de plantas geneticamente modificadas para controlar insetos fitófagos (Kondrák et al., 2005). Finalmente, o estudo do tubo digestivo e da digestão em insetos se faz importante, pois vários patógenos causadores de doenças são transmitidos por suas formas adultas. O conhecimento da fisiologia digestiva destes insetos é essencial para entendermos a relação parasito-hospedeiro invertebrado e para tentarmos bloquear a transmissão (Terra et al., 1996).

As observações anatômicas feitas neste estudo mostraram que as larvas de *L. longipalpis* possuem o intestino médio bem maior que o intestino posterior e anterior, sendo que o alimento é normalmente encontrado somente no interior do intestino médio (**figura 5**). Isso indica que os detritos ingeridos pelas larvas passam rapidamente pelos intestinos anterior e posterior, mas passam mais lentamente pelo intestino médio, onde de fato ocorre a digestão e absorção dos nutrientes. Em alguns insetos o divertículo atua como órgão de armazenamento de alimento e até mesmo local de digestão (Terra e Ferreira, 1994; Chapman, 1998), porém isso não ocorre em larvas de *L. longipalpis*, tendo em vista que o intestino anterior é muito curto, não apresenta dilatações e não há armazenamento de alimento neste local. Essas larvas possuem um proventrículo globoso e o canal alimentar que o atravessa é muito estreito. Provavelmente, circundando esse canal existem músculos que fazem com que o proventrículo funcione

como uma válvula de entrada para o alimento ingerido. Atualmente estamos estudando a histologia do trato digestivo destas larvas de modo que este e outros aspectos morfológicos serão esclarecidos em breve. Em nossas observações não encontramos glândulas salivares nas larvas de *L. longipalpis*, mas acreditamos que um estudo mais cuidadoso deve ser feito para confirmar a ausência deste órgão. De fato, alguns besouros não possuem glândulas salivares, porém esse órgão é muito comum em insetos e já foi encontrado em larvas de vários dípteros (Chapman, 1998). Curiosamente, as larvas de *L. longipalpis* não possuem cecos gástricos, que são estruturas muito comuns em larvas de outros dípteros Nematocera como os mosquitos.

O volumoso espaço ectoperitrófico presente no intestino médio das larvas (**figura 5**) indica que ali há uma quantidade relativamente grande de líquido. Isso sugere que em larvas de *L. longipalpis* pode existir um mecanismo de contracorrente, em que o líquido dentro do espaço ectoperitrófico flui no sentido contrário ao da passagem do alimento. O mecanismo de contracorrente foi descrito pela primeira vez por Dow (1981a;1981b) em gafanhotos da espécie *Schistocerca gregaria*. No seu primeiro trabalho Dow, (1981a), após a análise de secções de intestinos dissecados, mostrou que os lobos anteriores dos cecos gástricos são os únicos locais do intestino responsáveis pela absorção de água. Posteriormente (Dow, 1981b), este autor injetou uma solução do corante amarantho na hemolinfa dos insetos e acompanhou o destino deste corante em diferentes momentos. Vinte e quatro horas após a injeção, insetos mantidos em jejum não apresentavam nenhum traço do corante na hemolinfa, mas este havia entrado no tubo digestivo através dos túbulos de Malpighi e havia se distribuído pelo divertículo e cecos gástricos. Com a análise destes resultados ficou definido que nos gafanhotos em jejum existe um mecanismo de contracorrente no espaço ectoperitrófico que é causado pela absorção de água ao nível dos cecos gástricos e também pela secreção de água no interior do intestino pelos Túbulos de Malpighi.

Este mecanismo de contracorrente foi relatado em diversas espécies de insetos (Terra, 1988), porém dependendo da posição filogenética, algumas diferenças podem ser observadas. Nos insetos holometábolos, a secreção de água não é feita pelos Túbulos de Malpighi e sim pelo epitélio posterior do intestino médio (Terra, 1990), isto evita que excretas sejam acumulados nos cecos gástricos e/ou porções anteriores do tubo digestivo. Em larvas de Nematocera, os cecos gástricos são responsáveis pela absorção de água do espaço ectoperitrófico (Terra, 1988), mas estes não estão presentes em larvas de *L. longipalpis* (**figura 5**), neste caso a parede do intestino médio anterior talvez

esteja fazendo este papel, como é comum nas larvas de Lepidoptera, que também não possuem cecos gástricos (Santos et al., 1984). A **figura 17** mostra um esquema do mecanismo de contracorrente encontrado nas larvas de lepidópteros, e que provavelmente ocorre em larvas de flebotomíneos.

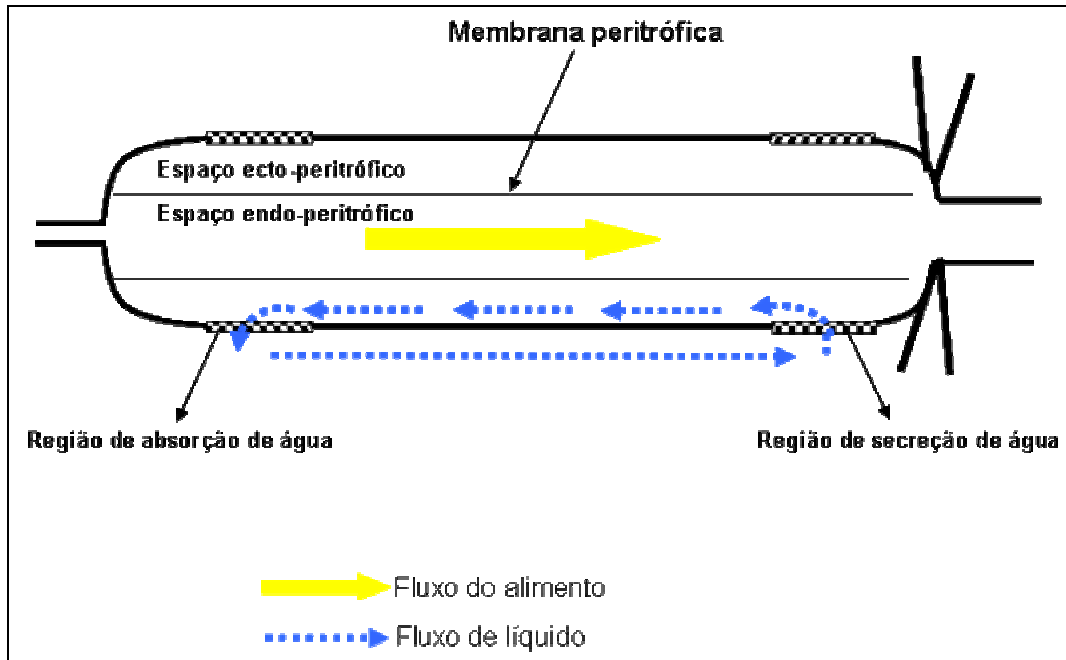


Figura 17: Mecanismo de contracorrente.

Assim, se o mecanismo de contracorrente estiver mesmo ocorrendo em larvas de *L. longipalpis*, a região anterior do intestino médio funcionaria absorvendo líquido do espaço ectoperitrófico enquanto a região posterior do intestino médio estaria secretando líquido proveniente da hemolinfa no interior do intestino. A coordenação desses dois eventos levaria então ao surgimento da contracorrente dentro do espaço ectoperitrófico (**figura 17**).

Entre os insetos que possuem simbioses no intestino posterior, o íleo é, geralmente, muito dilatado para poder abrigar esses microorganismos. Essa estrutura é chamada de *paunch* nos cupins e câmara de fermentação em larvas de alguns besouros (Scarabaeidae) (Chapman, 1998). As larvas de *L. longipalpis* possuem um íleo muito delgado e curto (**figura 5**) e como o alimento passa rapidamente pelo intestino posterior, a contribuição de microorganismos para a digestão parece não acontecer, pelo menos nesta parte do intestino.

O pH encontrado no intestino médio dos insetos geralmente varia entre pH 6 e pH 7,5. As maiores exceções são os intestinos muito alcalinos (pH 9-12) das larvas de lepidópteros, de dípteros da sub-ordem Nematocera e de alguns besouros (Terra e Ferreira, 2005). Dentre as exceções deve-se citar também a região muito ácida (pH 3,1-3,4) do intestino médio das larvas de dípteros Brachycera, e o intestino médio posterior ácido dos Hemiptera (Clark, 1999; Terra e Ferreira, 2005). O gradiente de pH encontrado no interior do intestino médio das larvas de flebotomíneos, com um intestino médio anterior muito alcalino e valores de pH menores próximo ao piloro (**figura 7**) é similar àquele encontrado em larvas de outros Nematocera como os mosquitos (Dadd, 1975), simulídeos (Undeen, 1979), tipulídeos (Sharma et al., 1984), sciarídeos (Terra et al., 1979) e outros insetos (Terra e Ferreira, 1994). Apesar de Mahmood e Borovsky (1992) não terem determinado o pH intestinal de larvas de *L. anthophora*, a presença de tripsinas e quimotripsinas (enzimas de ambientes alcalinos) nesta espécie indica condições fisiológicas semelhantes às de *L. longipalpis*.

Os altos valores de pH encontrados no intestino médio de larvas de lepidópteros parecem possibilitar que esses insetos se alimentem de matéria vegetal rica em taninos, que se ligam às proteínas em ambientes de pH não alcalino, reduzindo a eficiência da digestão (Berenbaum, 1980). Porém, outros mecanismos além do alto valor de pH encontrado no intestino médio podem prevenir a precipitação das proteínas alimentares pelos taninos. Uma possibilidade é o efeito de surfactantes, como as lisolecitinas que são formadas pela ação da fosfolipase A nas membranas celulares e ocorrem abundantemente nos fluidos intestinais dos insetos (De Veau e Schultz, 1992). Surfactantes são conhecidos por prevenir a precipitação de proteínas por taninos até mesmo em valores de pH tão baixos como pH 6,5 (Martin e Martin, 1984).

Além de prevenir a ligação de taninos às proteínas, um alto valor de pH no intestino pode ser importante para solubilizar hemiceluloses presentes na dieta. Alguns insetos, como a lagarta *Erinnyis ello*, são capazes de digerir eficientemente hemiceluloses sem afetar a celulose das plantas ingeridas (Terra et al., 1987).

Porém, o papel da alcalinidade encontrada no intestino médio das larvas dos Nematocera detritívoros ainda não foi completamente esclarecido. A manutenção de um pH tão alto no intestino requer um grande gasto energético (Dow, 1992), assim a alcalinidade encontrada no intestino médio anterior deve ter um papel muito importante para esses insetos. Altos valores de pH devem agir nas partículas de detritos e microorganismos presentes na dieta das larvas, permitindo que as moléculas de

proteínas, carboidratos complexos e lipídeos sejam solubilizadas e se dispersem mais facilmente, facilitando assim a ação das enzimas digestivas (Terra, 1988).

Os mecanismos de alcalinização do intestino médio são relativamente conhecidos para os lepidópteros. Nesses insetos, bombas de prótons (H^+ V-ATPase) presentes nas células caliciformes do intestino médio hiperpolarizam a membrana apical dessas células. É formada então uma diferença de potencial que conduz a troca do íon H^+ presente no lúmen por K^+ celular, diminuindo assim a concentração de prótons na luz intestinal (Wieczork et al., 1999). Outra molécula responsável pela alcalinização no intestino de lagartas é a anidrase carbônica. Esta enzima catalisa a reação de hidratação do dióxido de carbono (CO_2) formando ácido carbônico (H_2CO_3). O ácido carbônico por sua vez se dissocia em H^+ e em íons bicarbonato (HCO_3^-). O bicarbonato ainda pode se dissociar em H^+ e íons carbonato (CO_3^{2-}). A anidrase carbônica é encontrada nas células caliciformes (Turbeck e Folder, 1970) e o bicarbonato formado no interior da célula é secretado. Próximo à membrana da célula caliciforme o bicarbonato perde um H^+ que é rapidamente reabsorvido pela célula. O carbonato formado fica então no lúmen intestinal e ajuda a manter o pH elevado, uma vez que o pKa deste íon está próximo de 10,3, ele atua tamponando o meio (Dow, 1992).

Em larvas de Nematocera, os mecanismos de alcalinização do intestino médio anterior ainda não foram totalmente esclarecidos. Nestes insetos, o epitélio intestinal parece não possuir células especializadas na manutenção da alcalinidade como as células caliciformes dos lepidópteros (Volkman e Peters, 1989; Zhuang et al., 1999), porém moléculas semelhantes são usadas.

Filippova et al. (1998) mostraram que uma H^+ VATPase é altamente expressa no intestino médio de larvas de *A. aegypti*. Essa molécula se localiza na membrana basal das células do intestino médio anterior e na membrana apical das células dos cecos gástricos e do intestino médio posterior (Zhuang et al., 1999). Assim, no intestino médio anterior de *A. aegypti* a presença de H^+ VATPases na membrana basal das células promove a alcalinização do intestino por retirar o H^+ do lúmen e hiperpolarizar a membrana basal (Boudko et al., 2001).

Em larvas do mosquito *Aedes aegypti* a existência da anidrase carbônica foi comprovada por Corena et al. (2002), que além de clonar e caracterizar o cDNA desta enzima ainda detectou sua presença e localização no intestino médio. Neste estudo larvas alimentadas com uma mistura de corante indicador de pH e metazolamida (um potente inibidor da anidrase carbônica) mostraram diminuição na alcalinização

intestinal. Interessantemente, o intestino médio anterior é o local onde existe menor concentração da anidrase carbônica. Assim, o ânion carbonato é produzido nos cecos gástricos e intestino médio posterior (onde a atividade de anidrase carbônica é alta) e usado para tamponar a porção anterior do intestino médio. Mais recentemente, o papel da anidrase carbônica foi investigado em outras espécies de mosquitos e essa enzima parece ser crucial na manutenção do pH intestinal em larvas desses insetos (Corena et al., 2004).

Larvas de insetos detritívoros apresentam altos níveis de endoproteases no tubo digestivo (Martin et al., 1980; Martin et al., 1981; Sharma et al., 1984). É provável que isso se deva à necessidade de digerir eficientemente as proteínas presentes em baixa concentração no grande volume de detritos ingeridos e processados pelas larvas (Mahmood and Borovsky, 1992). Esse alto fluxo de detritos que passa pelo tubo digestivo das larvas dos flebotomíneos é outro argumento em favor de um mecanismo de contracorrente especialmente eficiente. Neste caso, a contracorrente estaria atuando como um mecanismo de reciclagem das enzimas digestivas solúveis, evitando assim grandes perdas dessas moléculas pelas fezes.

A hipótese de que o mecanismo de contracorrente atua reciclando enzimas digestivas solúveis foi testada por Terra e Ferreira (1981) a partir da constatação de que há uma compartimentalização da digestão no intestino médio de insetos (Terra et al., 1979). Em um trabalho pioneiro, Terra et al. (1979) mostraram que em larvas de *Rhynchosira americana* (Diptera, Nematocera) a digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico por hidrolases solúveis como tripsinas e amilases, que atuam diminuindo o tamanho das moléculas do alimento. A digestão intermediária ocorre no espaço ectoperitrófico por enzimas como as aminopeptidases. Finalmente, os produtos gerados pela digestão intermediária (normalmente dímeros) são processados por enzimas de digestão final como dipeptidases e dissacaridases que estão ligadas às microvilosidades do epitélio intestinal. Os dados sobre fluxo de água no espaço ectoperitrófico (Dow, 1981a; Dow, 1981b) e compartimentalização da digestão (Terra et al., 1979), levaram Terra e Ferreira (1981) a formularem o conceito de mecanismo de reciclagem ou circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas solúveis. Assim, enzimas responsáveis pela digestão inicial possuem baixo peso molecular e são capazes de atravessar a membrana peritrófica e agir sobre os polímeros no espaço endoperitrófico. No momento em que o complexo enzima-substrato se torna suficientemente pequeno ele atravessa a membrana peritrófica e cai no espaço

ectoperitrófico. Lá o substrato é transformado em peptídeos e as enzimas, após se dissociarem dos mesmos, seguem o fluxo contrário ao do alimento até entrarem por difusão novamente no espaço endoperitrófico, o que impede que essas moléculas sejam eliminadas rapidamente nas fezes do inseto. Os oligômeros formados pela fase inicial da digestão são então atacados no espaço ectoperitrófico por enzimas de digestão intermediária. Essas enzimas possuem alto peso molecular ou estão ligadas às membranas celulares, o que as confina no espaço ectoperitrófico (**figura 18**). Deste modo, a compartimentalização da digestão e a circulação endo-ectoperitrófica não só reciclam enzimas digestivas como impedem que polímeros compitam com oligômeros e dímeros pelos sítios de ligação de hidrolases de membrana (Terra, 1988). Além disso, esses fenômenos fazem como que a produção de monômeros ocorra somente em locais próximos à superfície das células intestinais, o que pode facilitar a absorção (Terra et al., 1985).

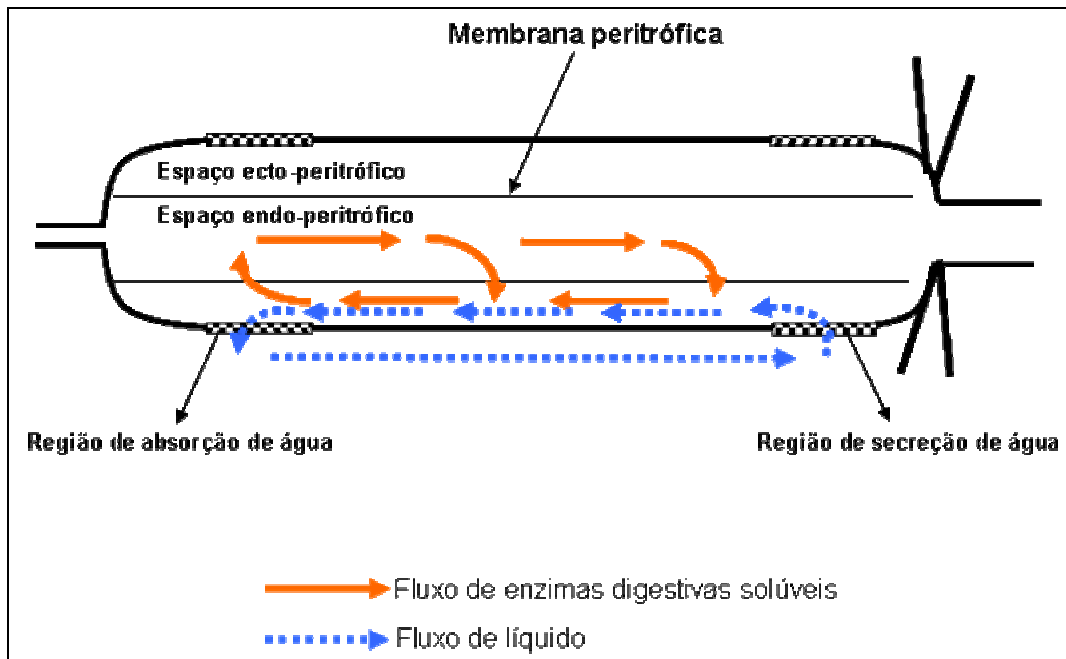


Figura 18: Esquema da circulação endo-ectoperitrófica.

As curvas de pH versus atividade das proteases totais, tripsinas e quimotripsinas mostram que as enzimas que atuam como endoproteases em larvas de *L. longipalpis* possuem pH ótimo de atividade sempre alcalino (**figuras 8, 12 e 13**). De fato, as serino-proteases digestivas de insetos geralmente mostram atividade em ambientes com valores de pH entre pH 8 e pH 10 (Terra e Ferreira, 1994).

Podemos observar que o intestino médio anterior é o local em que existe maior atividade de endoproteases (**figura 11**) e é ali que essas enzimas são, provavelmente, produzidas e secretadas. Observa-se ainda que essa região do intestino possui a alcalinidade necessária para que as endoproteases atuem suficientemente bem (**figuras 7 e 8**). Possivelmente, as endoproteases atravessam a membrana peritrófica de volta ao espaço ectoperitrófico à medida que o seu substrato se torna suficientemente hidrolisado diminuindo o tamanho do complexo. Se a circulação endo-ectoperitrófica estiver mesmo acontecendo no intestino das larvas de flebotomíneos, é esperado haver mais endoproteases no intestino médio anterior, uma vez que este local recebe de volta várias moléculas que estão sendo recicladas e também deve ser o local onde as endoproteases são produzidas. De fato, nossos resultados mostraram que, em larvas de *L. longipalpis*, o intestino médio anterior é o local onde há maior atividade de endoproteases (**figura 11**). Resultados semelhantes foram encontrados em larvas de *Rhynchosciara americana*, onde o intestino médio anterior apresentou atividade tripsinolítica maior que o intestino médio posterior. Interessantemente, quando as larvas de *R. americana* foram alimentadas com uma dieta 100% protéica essa diferença não era mais vista. Provavelmente, a passagem de muitas moléculas de proteína pelo intestino médio faz com que as moléculas de tripsina não consigam diminuir o tamanho dos complexos tripsina-proteínas da dieta a tempo de ficarem suficientemente pequenos para passarem para o espaço ectoperitrófico. Se a maior parte dos complexos não passa pela membrana peritrófica até o espaço ectoperitrófico, as moléculas de tripsina que os compõem não podem ser recicladas (Terra e Ferreira, 1981).

Os resultados obtidos nos ensaios de endopeptidases totais na presença de inibidores específicos (**figuras 9 e 10**) e os ensaios usando substratos sintéticos específicos (**figuras 12 e 13**) mostram que as endopeptidases digestivas presentes nas larvas de *L. longipalpis* são serino-proteases semelhantes à tripsina e quimotripsina. Essas enzimas são comuns na maioria dos insetos, principalmente naqueles que apresentam tubo digestivo alcalino (Terra, e Ferreira, 1994). Além disso, serino-proteases estão presentes em formas imaturas de *L. anthophora* e em adultos de outras espécies de flebotomíneos (Borovsky e Schlein, 1987; Mahmood e Borovsky, 1992, 1993; Dillon e Lane, 1993; Gontijo et al., 1998; Ramalho-Ortigão et al., 2003).

Em larvas de *Tipula abdominalis* (Diptera: Nematocera: Tipulidae) (Sharma et al., 1984), a tripsina parece ser a principal endoprotease encontrada no tubo digestivo enquanto em larvas de *L. anthophora* a quimotripsina é a principal endoprotease

(Mahmood e Borovisky, 1992). Os resultados obtidos com o uso de inibidores específicos mostraram que em pH 8 (**figura 9**) a redução da proteólise com o uso do TLCK foi maior que a redução causada pelo TPCK, porém em pH 11 (**figura 10**) ocorreu o contrário. Isso indica que em larvas de *L. longipalpis* predomina a atividade tripsinolítica em pH 8 e quimotripsinolítica em pH 11.

A inibição da digestão da azocaseína provocada pelo EDTA (**figuras 9 e 10**) pode indicar a presença de uma pequena quantidade de alguma metalo-protease ainda não descrita, ou mais provavelmente, isto pode ser reflexo da ação direta ou indireta deste inibidor sobre as tripsinas e/ou quimotripsinas. As atividades de enzimas semelhantes à tripsina em *Spodoptera littoralis* (Lee e Anstee, 1995), *Melolontha melolontha* (Wagner et al., 2002) e *Anticarsia gemmatalis* (Oliveira et al., 2005) também foram inibidas após a incubação com o EDTA. Nesses trabalhos, os autores sugerem que as tripsinas desses insetos poderiam necessitar de um co-fator metálico, possivelmente o íon Ca^{+2} , e que a inibição causada pelo EDTA se daria pela quelação desses íons. Porém, em uma importante revisão sobre enzimas digestivas de insetos Terra e Ferreira (1994) afirmam que, diferentemente das tripsinas de vertebrados, as tripsinas dos insetos parecem não ser ativadas ou estabilizadas por íons como o cálcio. Portanto, em nosso estudo e talvez nos estudos mencionados acima, onde observou-se alguma inibição pelo EDTA, este inibidor poderia estar atuando diretamente nas serino-proteases e não como quelante de cálcio. Não se pode descartar ainda a possibilidade de que peptídeos relativamente grandes produzidos pela ação de endoproteases (e que seriam precipitados com o tratamento com TCA) tenham sido atacados por exoproteases dependentes de íons metálicos tais como as aminopeptidases e assim tenham se tornado pequenos e solúveis, não sendo precipitados pelo TCA.

As tripsinas estão solúveis na luz do intestino de larvas de *L. longipalpis* (**tabela 2**) o que possibilita que essas enzimas se difundam pelo intestino, atravessem a membrana peritrófica e atuem sobre o alimento no espaço endoperitrófico. Situação semelhante foi encontrada em fêmeas de *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus langeroni* onde 92,6 % da atividade tripsinolítica total foi encontrada no lúmen intestinal (Dillon e Lane, 1993).

A presença de mais de um pico de atividade nas curvas de pH para endoproteases (**figuras 8, 12 e 13**) indica que várias isoenzimas semelhantes a tripsinas e quimotripsinas estariam atuando na digestão de proteínas. De fato, a eletroforese em gel de poliacrilamida copolimerizada com gelatina mostrou um total de 11 bandas de

endoproteases (**figura 14**). Este número é muito semelhante ao das 12 bandas encontradas por Mahmood and Borovisky (1992) em larvas de *L. anthophora* utilizando uma técnica onde o sítio ativo das enzimas era marcado radioisotopicamente com [1,3-³H] DIP, um inibidor irreversível de serino-proteases. Entretanto, o peso molecular das isoformas encontradas em *L. anthophora* não foi determinado, o que impossibilita comparações entre o peso molecular dessas enzimas em larvas de *L. longipalpis* e em larvas de *L. anthophora*.

Na maioria dos insetos estudados até o momento, o peso molecular das tripsinas e quimotripsinas é pequeno (aproximadamente 30 kDa ou menor) (Terra e Ferreira, 1994). Um peso molecular tão pequeno é compatível apenas com algumas das bandas de endoproteases encontradas em larvas de *L. longipalpis*, porém bandas de alto peso molecular, bem individualizadas, também foram observadas no gel (**figura 14**). Alguns resultados obtidos com larvas de outros insetos indicam que endoproteases de alto peso molecular podem estar presentes no intestino. Oliveira et al. (2005) encontraram moléculas de tripsina com pesos moleculares variando entre 66 kDa e 91 kDa no tubo digestivo da lagarta *Anticarsia gemmatalis*. Endoproteases de peso molecular não usual (variando entre 53 e 66 kDa) também foram encontradas em larvas de *Spodoptera litura* (Lepidoptera) (Ahmad et al., 1980) e em larvas de *Melolontha melolontha* (Coleoptera) (Wagner et al., 2002). Além das endoproteases de alto peso molecular existem indícios de que a membrana peritrófica de algumas larvas de insetos permite a passagem de grandes moléculas. Edwards e Jacobs-Lorena (2000) observaram que a membrana peritrófica das larvas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* era permeável a moléculas de até 148 kDa. Estes dados se opõem à idéia de que somente moléculas ou complexos moleculares pequenos é que podem atravessar a membrana peritrófica. É provável que o tamanho dos poros em diferentes membranas peritróficas variem consideravelmente entre os insetos.

A presença de aminopeptidases em larvas de *L. longipalpis* foi confirmada com o uso de substratos sintéticos (**tabela 1**). É interessante notar que essas enzimas estão quase totalmente restritas ao intestino médio posterior (**figura 16**) onde o pH do ambiente (**figura 7**) é próximo ao pH de atividade máxima das aminopeptidases (**figura 15**). O pH ótimo de atividade dessas exoproteases é muito semelhante àquele encontrado para larvas de outras espécies de Nematocera (Terra et al., 1979), porém flebotomíneos adultos possuem aminopeptidases com pH ótimo um pouco mais elevado do que o encontrado para larvas de *L. longipalpis* (Dillon e Lane, 1993).

O fato das aminopeptidases das larvas de *L. longipalpis* estarem ligadas às membranas celulares do epitélio intestinal (**tabela 3**) faz com que essas enzimas permaneçam no intestino médio posterior mesmo na presença do fluxo de líquido dentro do espaço ectoperitrófico (**figura 16**). Se as aminopeptidases estivessem solúveis e fossem arrastadas para o intestino médio anterior elas perderiam sua função digestiva. Curiosamente, a atividade de aminopeptidases encontrada nos ensaios para determinar se essas enzimas estavam ou não ligadas às membranas do epitélio intestinal foi muito maior que a atividade encontrada nos demais ensaios. Provavelmente, isso se deve ao fato de que os ensaios para determinar se as aminopeptidases estavam solúveis ou não continham Triton X-100. A ação do detergente, dissolvendo as membranas plasmáticas e liberando as enzimas que estavam presas no epitélio, provavelmente foi responsável por esse aumento no valor da atividade. Aminopeptidases podem ser encontradas livres no lúmen ou ligadas às membranas das células do intestino (Terra e Ferreira, 1994). Aminopeptidases solúveis são encontradas geralmente em insetos primitivos como Orthoptera, Dictyoptera e Hemiptera. Nos grupos mais recentes (Diptera e Lepidoptera), essas enzimas são encontradas tanto ligadas às microvilosidades intestinais como solúveis no interior do espaço ectoperitrófico (Terra e Ferreira, 2005). As larvas de dípteros Nematocera possuem, normalmente, uma alta atividade de aminopeptidases no interior dos cecos gástricos, onde realmente ocorre a digestão final de proteínas (Terra et al., 1979). Esse padrão não ocorre em larvas de *L. longipalpis*, onde a ausência de cecos gástricos (**figura 5**) parece ter feito com que, ao longo da sua história evolutiva, as aminopeptidases fossem ligadas à membrana do intestino médio posterior, assim como nos Lepidoptera (Terra, 1990).

Assim, este trabalho mostrou pela primeira vez a anatomia macroscópica, o pH do tubo digestivo e como ocorre a digestão de proteínas em larvas de um flebotomíneo. Com os resultados obtidos, pudemos propor um modelo fisiológico de como as proteínas ingeridas sofrem digestão. Resumindo, as proteínas são digeridas inicialmente no intestino médio anterior, dentro do espaço endoperitrófico por endoproteases solúveis (tripsinas e quimotripsinas). O local da digestão inicial das proteínas possui pH adequado para a atuação das endoproteases que estas larvas possuem. Na medida em que o tamanho do substrato diminui, a digestão passa a ser efetuada por aminopeptidases no espaço ectoperitrófico do intestino médio posterior, onde o pH encontrado é o ideal para a ação dessas exopeptidases. Apesar de não termos testado a existência da circulação endo-ectoperitrófica em larvas de flebotomíneo, os nossos

resultados sugerem que esse mecanismo de reciclagem de enzimas digestivas deve estar atuando nessas larvas.

Nossos resultados abrem perspectivas para a continuação do estudo da morfologia e fisiologia digestiva das larvas de *L. longipalpis*. Atualmente estamos estudando a histologia do intestino dessas larvas, com o intuito de melhor conhecer a morfologia intestinal e procurar estruturas que ainda não foram identificadas. A microscopia eletrônica poderá nos ajudar a encontrar diferenças nas células que compõe as regiões anteriores e posteriores do intestino médio. Pretendemos também investigar o papel das moléculas anidrase carbônica e H^+ V ATPase na alcalinização do intestino médio anterior e tentar descobrir a localização dessas moléculas no epitélio intestinal. Para melhor caracterizar a digestão de proteínas em larvas de *L. longipalpis*, pretendemos purificar e caracterizar uma tripsina intestinal e ainda confirmar a presença de carboxipeptidases e dipeptidases. Acreditamos que com o estudo de carboidrases, lipases e nucleases do intestino dessas larvas poderemos obter outras informações importantes sobre a fisiologia digestiva desses insetos.

7 – CONCLUSÕES

Em larvas de *L. longipalpis* o intestino médio representa a maior parte do canal alimentar, não possui cecos gástricos e é o único local de armazenamento do alimento. Possivelmente as glândulas salivares estão ausentes nesses insetos.

Existe um gradiente de pH no interior do intestino médio de larvas de *Lutzomyia longipalpis*. A região anterior do intestino médio apresenta um valor de pH maior ou igual ao pH 9 e a região posterior do intestino médio apresenta pH entre pH 6,5 e pH 7.

As endoproteases encontradas no intestino de larvas de *L. longipalpis* atuam em condições ideais em valores de pH bastante alcalinos, enquanto as exoproteases (aminopeptidases) intestinais atuam melhor em ambientes com pH próximo do pH neutro.

O uso de um gel de poliacrilamida contendo substrato possibilitou encontrar 11 bandas de atividade para endoproteases. O peso molecular das bandas encontradas variou de 102 kDa até 33 kDa.

O intestino médio anterior das larvas de *L. longipalpis* é o local do intestino em que as endoproteases totais apresentaram maior atividade, sendo que essas não apresentaram atividade no intestino posterior. Já as exoproteases (aminopeptidases) mostraram atividade marcadamente relacionada com a porção posterior do intestino médio.

O uso de inibidores mostrou que as enzimas responsáveis pela digestão de proteínas em larvas de *L. longipalpis* são serino-proteases semelhantes à tripsina e à quimotripsina. Em pH 8 predomina a atividade de tripsinas enquanto em pH 11 a atividade de quimotripsinas é predominante.

As tripsinas (e provavelmente as quimotripsinas) estão solúveis na luz do intestino médio e por isso podem atravessar os poros da membrana peritrófica e atuar no espaço endoperitrófico. As aminopeptidases apresentam padrão diferente, são ligadas às membranas do epitélio intestinal e atuam somente no espaço ectoperitrófico

Um mecanismo de contracorrente que atue reciclando as enzimas digestivas solúveis deve estar atuando em larvas de *L. longipalpis*.

8 – REFEREÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDIS, C.J. (1945) *Phlebotomus (Dampfomyia) anthophorus* and *Phlebotomus diabolicus* hall from Texas (Diptera: Psychodidae). *Journal of Parasitology*. n. 31, p. 119-127.

AHMAD, Z.; SALEEMUDDIN, M.; SIDDI, M. (1980) Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of army worm, *Spodoptera litura*. *Insect Biochemistry*, n. 10, p. 667-673.

ALEXANDER, B.; USMA, M.C. (1994) Potential sugar sources of *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. n. 88, p. 543-549.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M.; SAMPAIO, D.P.; BADARÓ, R. (1998) Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control of canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. n. 59, p. 53-57.

BARRETT, A.J. (1994) Classification of peptidases. In: *Methods in enzymology: Proteolytic enzymes: Serine and Cysteine Peptidases*. (ed. Barrett AJ) p. 1-15. Academic Press, San Diego.

BATES, P.A. (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand fly. *International Journal for Parasitology*. n. 37, p. 1097-1106.

BERENBAUM, M. (1980) Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera. *The American Naturalist*. n. 115, p. 138-146

BILLINSLEY, P.F.; LEHANE, M.J. (1996) Structural biology of the midgut. In: *Biology of insect midgut*. (ed. Lehane ML & Billingsley PF) p. 3-25. Chapman & Hall, London.

BLANCO-LABRA, A.; MARTINEZ-GALLARDO, N.A.; SANDOVAL-CARDOSO, L.; DELANO-FRIER, J. (1996) Purification and characterization of a digestive Cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n. 26, p. 95-100.

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. *Medical and Veterinary Entomology*. n. 1, p. 235-242.

BOUDKO, D.; MOROZ, L.L.; LINSER, P.J.; TRIMARCHI, J.R.; SMITH, P.J.S.; HARVEY, W.R. (2001) *In situ* analysis of pH gradients in mosquito larvae using non-invasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes. *The Journal of Experimental Biology*. n. 204, p. 691-699.

BRIEGEL, H.; LEA, A.O. (1975) Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. n. 21, p. 1597-1604.

CAMERON, M.M.; PESSOA, F.A.C.; VASCONCELOS, A.W. (1995) Sugar meal sources for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*. n. 9, p. 263-272.

CAROCCI, A.S.; CALVO, E.; RIBOLLA, P.E.; DE BIANCHI, A.G.; MARINOTTI, O. (2003) Two digestive trypsins occur in three species of neotropical anophelines. *Journal of Medical Entomology*. v. 40, n. 6, p. 991-995.

CAVALCANTE, R.R.; PEREIRA, M.H.; GONTIJO, N.F. (2003) Anti-complement activity in saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagus insects. *Parasitology*. n. 127, p. 87-93.

CHAPMAN, R.F. (1998) Alimentary canal, digestion and absorption. In: *The Insects: Structure and function*. (ed. Chapman RF), p. 38-68. University Press, Cambridge.

- CLARK, T.M. (1999) Evolution and adaptive significance of larval midgut alkalization in the insect superorder Mecoptera. *Journal of Chemical Ecology*. n. 25, p. 1945-1960.
- CORENA, M.P.; FIEDLER, M.M.; VANEKERIS, L.; TU, C.; SILVERMAN, D.N.; LINSER, P.J. (2004) Alkalization of larval mosquito midgut and the role of carbonic anhydrase in different species of mosquitoes. *Comparative Biochemistry and Physiology* (parte C). n. 137, p. 207-225.
- CORENA, M.P.; SERON, T.J.; LEHMAN, H.K.; OCHRIETOR, J.D.; KOHN, A.; TU, C.; LINSER, P.J. (2002) Carbonic anhydrase in the midgut of larval *Aedes aegypti*: cloning, localization and inhibition. *The Journal of Experimental Biology*. n. 205, p. 591-602.
- DADD, R.H. (1975) Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. *Journal of Insect Physiology*. n. 21, p. 1847-1853.
- DE VEAU, F.J.L.; SCHULTZ, J.C. (1992) Reassessment of interaction between gut detergents and tannins in Lepidoptera and significance for gypsy moth larvae. *Journal of Chemical Ecology*. n. 18, p. 1437-1453.
- DESJEUX, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. n. 27, p. 305-318.
- DILLON, R.J.; LANE, R.P. (1993) Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Medical and Veterinary Entomology*. n. 7, p. 225-232.
- DOW, J.A.T. (1981a) Localization and characterization of water uptake from the midgut of the locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*. n. 93, p. 269-281.
- DOW, J.A.T. (1981b) Countercurrent flows, water movements and nutrient absorption in the locust midgut. *Journal of Insect Biology*. n. 27, p. 579-585.

DOW, J.A.T. (1992) pH gradients in lepidopteran midgut. *Journal of Experimental Biology*. n. 172, p. 355-375.

EDWARDS, M.J.; JACOBS-LORENA, M. (2000) Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Insect Physiology*. n. 46, p. 1313-1320.

ESPINOZA-FUENTES, F.P.; TERRA, W.R. (1987) Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochemistry*. n. 17, p. 809-817.

FELICIANGELI, M.D. (2004) Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*. n. 18, p. 71-80.

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. *Journal of Medical Entomology*. v. 34, n. 6, p. 719-728.

FILIPPOVA, M.; ROSS, L.S.; GILL, S.S. (1998) Cloning of the V-ATPase B subunit cDNA from *Culex quinquefasciatus* and expression of the B and C subunits in mosquitoes. *Insect Molecular Biology*. N. 7, p. 223-232.

FORATTINI, O .P. (1973) Subfamília Phlebotominae - Biologia. *Entomologia Médica*. (ed. Edgard Bücher Ltda e ed. Universidade de São Paulo), p119-206.

GONTIJO, N.F.; ALMEIDA-SILVA, S.; COSTA, F.F.; MARES-GUIA, M.L.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. (1998) *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases and some speculations upon *Leishmania* development. *Experimental Parasitology*. n. 90, p. 212-219.

GREENBERG, B.; PARETSKY, D. (1955) Proteolytic enzymes in the house fly *Musca domestica* (L.). *Annals of the Entomological Society of America*. n.48, pag. 46-50.

HAMSON, W.J. (1961) The breeding places of *Phlebotomus* in Panamá. *Annals of the Entomological Society of America*. n.54, p. 317-322.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrate. *Analytical Biochemistry*. n. 102, p. 196-202.

HO, B.C.; KHOO, H.G.N.; CHEW, L.; WONG, K.P.; EWERT, A. (1992) Food ingestion and digestive enzymes in larval *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. v. 29, n. 6, p. 960-964.

JOHNSTON, K.A.; LEE, M.J.; BROUGH, C.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. (1995) Protease activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v.25, n.3, p. 375-383.

KILLICK-KENDRICK, R. (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*. n. 17, p. 279-289.

KILLICK-KENDRICK, R. (1978) Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sand flies: a review. *Acta Tropica*. n.35, p. 297-513.

KONDRÁK, M.; KUTAS, J.; SZENTHE, B.; PATTHY, A.; BÁNFALVI, Z.; NÁDASY, M.; GRÁF L.; ASBÓTH, B. (2005) Inhibition of Colorado potato beetle larvae by a locust proteinase inhibitor peptide expressed in potato. *Biotechnology Letters*. n. 27, p. 829-834.

KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. (1997) Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n. 27, p. 887-900.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. n. 227, p. 680-685.

- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. (2005) *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 100, n. 8, p. 811-827.
- LANE, R.; PHILLIPS, A.; MOLYNEUX, D.H.; PROCTER, G.; WARD, R.D. (1985) Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. n. 79, p. 225-229.
- LANZARO, G.C.; OSTROVSKA, K.; HERRERO, M.V.; LAWYER, P.G.; WARBURG, A. (1993) *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. n. 48, p. 839-847.
- LEE, M.J.; ANSTEE, J.H. (1995) Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* includes a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n. 25, p. 49-61.
- LEHANE, M.J. (1997) Peritrophic membrane structure and function. *Annual Review of Entomology*. n. 42, p. 525-550.
- LEITE, A.C.R.; WILLIAMS, P. (1996) Description of the fourth instar larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. n. 91, p. 571-578.
- LERNER, E.A.; RIBEIRO, J.M.; NELSON, R.J.; LERNER, M.R. (1991) Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *The Journal of Biological Chemistry*. n. 17, p. 1234-1236.
- LOPES, A.R.; JULIANO, M.A.; MARANA, S.R.; JULIANO, L.; TERRA, W.R. (2006) Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n. 36, p. 130-140.

LYNNE, S.; GARCIA, A.; BRUCKNER, D.A. (1997) Leishmaniasis. *Diagnostic Medical Parasitology*. (ed. D.C. Washington) p. 167-190. London, AS Press.

MAHMOOD, F.; BOROVSKY, D. (1993) Biosynthesis of serine proteases in *Lutzomyia anthophora* (Díptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*. n. 29, p. 683-688.

MAHMOOD, F.; BOROVSKY, D. (1992) Biosynthesis of trypsinlike and chymotrypsinlike enzymes immature *Lutzomyia anthophora* (Díptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*. n. 30, p. 489-495.

MANGABEIRA, O. (1969) Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. n. 21, p. 3-26.

MARTIN, M.M.; MARTIN, J.S. (1984) Surfactants: their role in preventing the precipitation of proteins by tannins in insect guts. *Oecologia*. n. 61, p. 342-345.

MARTIN, M.M.; MARTIN, J.S.; KUKOR, J.J.; MERRIT, R.W. (1980) The digestion of protein and carbohydrate by the stream detritivore, *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae). *Oecologia*. n. 46, p. 360-364.

MARTIN, M.M.; KUKOR, J.J.; MARTIN, J.S., LAWSON, D.L.; MERRITT, R.W. (1981) Digestive enzymes of larvae of three species of caddisflies (Tricoptera). *Insect Biochemistry*. N. 11, p. 501-505.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. (2000) The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*. v. 16, n. 5, p. 188-189.

MILLER, N.; LEHANE, M.J. (1993) Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors. *Parasitology Today*. n. 9, p. 45-50.

MODI, G.B.; TESH, R.B. (1983) A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*. n. 20, p. 568-569.

MUHARSINI, S.; DALRYMPLE, B.; VUOCOLO, T.; HAMILTON, S.; WILLADSEN, P.; WIJFFELS, G. (2001) Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the Old World Screwworm fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n.31, p. 1029-1040.

MUTEBI, J.P.; TRIPET, F.; ALEXANDER, J.B.; LANZARO, G.C. (2002) Genetic differentiation among populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Central and South America. *Annals of Entomological Society of America*. n. 95, p. 740-752.

OLIVEIRA, M.G.A.; DE SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. (2005) Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* (parte B). n. 140, p. 369-380.

OPPERT, B.; KRAMER, K.J.; MCGAUGHEY, W.H. (1997) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *The Chemist*. n. January/February, p. 7-10.

PASCOA, V.; OLIVEIRA, P.L.; DANSA-PETRETSKI, M.; SILVA, J.R.; ALVARENGA, P.H.; JACOBS-LORENA, M; LEMOS, F.J. (2002) *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n. 32, p. 517-523.

PETERS, W. (1992) Peritrophic membranes, Zoophysiology Series. Vol. 30, Springer, Berlin, 238pp.

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

RAMALHO-ORTIGÃO, J.M.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.D.; RIBEIRO, J.M.; VALENZUELA, J.G. (2003) Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n. 33, p. 163-171.

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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. n. 81, p. 431-438.

RIBEIRO, J.M. (1987a) Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology*. n. 32, p. 463-478.

RIBEIRO, J.M. (1987b) Vector salivation and parasite transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 82, n.3, p. 1-3.

RIBEIRO, J.M.; ROSSIGNOL, P.A.; SPIELMAN, A. (1986) Blood-finding strategy of capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. n. 83, p. 683-686.

ROSS, H.H.; ROSS, C.A.; ROSS, J.R.P. (1982) A textbook of entomology. New York, 666pp.

SANTOS, C.D.; RIBEIRO, A.F.; FERREIRA, C.; TERRA, W.R. (1984) The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell and Tissue Research*. n. 237, p. 565-574.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R.; WAGNER, F. (1989) Protease assay methods. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Press at Oxford, University Press, Cap.3, p.25-55.

SCHLEIN, Y.; ROMANO, H. (1986) *Leishmania major* and *L. donovani*: effects on proteolytic enzymes of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) and their possible role in adaptation to the vector. *Experimental Parasitology*. n. 62, p. 376-380.

SCHLEIN, Y.; WARBURG, A. (1986) Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *Journal of Medical Entomology*. n. 23, p. 11-15.

SECUNDINO, N.F.C.; EGER-MANGRICH, I.; BRAGA, E.M.; SANTORO, M.M.; PIMENTA, P.F.P (2005) *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. *Journal of Medical Entomology*. n. 42, p. 928-938.

SHARMA, B.R.; MARTIN, M.M.; SHAFER, J.A. (1984). Alkaline proteases from the gut fluid of detritus feeding larvae of the crane fly *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae). *Insect Biochemistry*. n. 14, p. 37-44.

SHAW, J.J. (1999) The relationship of sandfly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. *Contributions to the Knowledge of Diptera*. (ed. J.F. Burger) p. 503-517. Gainesville, Associated Publishers.

SILVA, F.C.B.L.; ALCAZAR, A.; MACEDO, L.L.P.; OLIVEIRA, A.S.; MACEDO, F.P.; ABREU, L.R.D.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. (2006) Digestive enzymes during development of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteases targets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n. 36, p. 561-569.

SUDHA, P.M.; MUTHU, S.P. (1988) Damage to the midgut epithelium caused by food in the absence of peritrophic membrane. *Current Science*. n.57, p. 624-625.

TABOURET, G.; BRET-BENNIS, L.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. (2003) Serine proteases in excretory-secretory products of *Oestuis ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Veterinary Parasitology*. n. 114, p. 305-314.

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

TELLAM, R.L. (1996) The peritrophic matrix. In: Biology of the insect midgut. (ed. Lehane ML & Billingsley PF) p. 86-114. Chapman & Hall, London.

TELLAM, R.L.; EISEMANN, C. (2000) Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n. 30, p. 1189-1201.

TERRA, W.R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*. n. 35, p. 181-200.

TERRA, W.R. (1988). Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*. n. 21, p. 657-734.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. (2005) Biochemistry of Digestion. In: Comprehensive Molecular Insect Science. (ed. Gilbert LI & Iatrou K) p. 171-224. Elsevier, Oxford.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. n. 109b, p. 1-62.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. (1981) The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut of starved *Rhynchosciara*. *Journal of Insect Physiology*. n. 27, p. 325-331.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; JORDÃO, B.P.; DILLON, R.J. (1996) Digestive enzymes. In: Biology of Insect Midgut. (ed. Lehane ML & Billingsley PF) p. 153-194. Chapman & Hall, London.

TERRA, W.R.; ESPINOZA-FUENTES, F.P.; RIBEIRO, A.F.; FERREIRA, C. (1988) The larval midgut of housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation of digestion. *Journal of Insect Physiology*. v.35, n. 6, p.463-472.

TERRA, W.R.; VALENTIN, A.; SANTOS, C.D. (1987) Utilization of sugars, hemicellulose, starch, protein, fat and minerals by *Erinnyis ello* caterpillars and the digestive role of their midgut hydrolases. *Insect Biochemistry*. n. 17, p. 1143-1147.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; BASTOS, F. (1985) Phylogenetic considerations of insect digestion. Disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry*. n. 15, p. 443-449.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A.G. (1979). Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciaria americana* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology*.n. 25, p. 487-494.

TURBECK, O.B.; FODER, B. (1970) Studies on a carbonic anhydrase from the midgut epithelium of larvae of Lepidoptera. *Biochimica et Biophysica Acta*. n. 212, p. 139-149.

UNDEEN, A.H. (1979) Simuliid larval midgut pH and its implication for control. *Mosquito News*. n. 39, p. 391-392.

VOLKMANN, A.; PETERS, W. (1989) Investigation on the midgut caeca of mosquito larva. I. Fine structure. *Tissue*. n. 21, p. 243-251.

WAGNER, W.; MOHRLLEN, F.; SCHNETTER, W. (2002) Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockhafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. n. 32, p. 803-814.

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G.; NEVA, F. (1994) Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. n. 345, p. 223-230.

WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. (1986) The effect of a post blood meal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. n. 35, p-926.

WARD, C.W. (1975) Properties and specificity of the major metal-chelator-sensitive proteinase in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. *Biochimica et Biophysica Acta*. n.384, pag. 215-227.

WARD, R.D.; PHILLIPS, A.; BURNET, B.; MARCONDES, C.B. (1988) The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. *Biosystematics of Haematophagus Insects*. p. 257-269. Oxford, Clarendon Press.

WERMELINGER, E.D.; ZANUNCIO, J.C. (2001) Development of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) larvae in different diets. *Brazilian Journal of Biology*. v.61, n. 3, p. 405-408.

WIECZOREK, H.; GRUBER, G.; HARVEY, W.R.; HUSS, M.; MERZENDORFER, H. (1998) The plasma membrane H⁺V ATPase from tobacco hornworm midgut. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. n. 31, p. 67-74.

WIEMAN, K.F.; NIELSEN, S.S. (1988) Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval *Acanthoscelides abtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* (parte B). n. 89, p. 419-426.

WILLIAMS, P. (1999) Patterns in the geographical distribution of members of the genus *Lutzomyia* França (Diptera: Psychodidae – Phlebotominae). *Contributions to the Knowledge of Diptera*. (ed. J.F. Burger) p. 455-502. Gainesville, Associated Publishers.

YANG, Y.A.; DAVIES, D.M. (1971) Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. *Journal of Insect Physiology*. n. 17, p. 117-131.

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

ZHUANG, Z.; LINSER, P.J.; HARVEY, W.R. (1999) Antibody to H⁺ V-ATPase subunit E colocalizes with protosomes in alkaline larval midgut of a freshwater mosquito (*Aedes aegypti* L.) *The Journal of Experimental Biology*. n. 202, p. 2449-2460.

MINISTÉRIO DA SAÚDE

http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=22140. Acesso em 01/12/2007.

OMS – Organização Mundial de Saúde

<http://www.who.int/leishmaniasis>. Acesso em 01/12/2007.