

VÂNIA CRISTINA DOS SANTOS

**DETERMINAÇÃO DO pH E ESTUDO DOS MECANISMOS
ENVOLVIDOS EM SEU CONTROLE NO INTESTINO
MÉDIO DE *LUTZOMYIA (LUTZOMYIA) LONGIPALPIS*
(DIPTERA: PSYCHODIDAE) DURANTE A DIGESTÃO DE
SANGUE E AÇÚCARES**



Belo Horizonte
Minas Gerais - Brasil
2006

VÂNIA CRISTINA DOS SANTOS

Determinação do pH e Estudo dos Mecanismos Envolvidos em seu Controle no Intestino Médio de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) durante a digestão de sangue e açúcares

Dissertação Submetida Ao Colegiado Do Programa De Pós-Graduação Em Parasitologia Do Departamento De Parasitologia - Instituto De Ciências Biológicas - Universidade Federal De Minas Gerais, Como Requisito Parcial Para Obtenção De Título De Mestre Em Parasitologia

Área De Concentração:

Entomologia

Orientador: Dr. NELDER DE FIGUEIREDO GONTIJO

Co-orientador: Dr. MARCOS HORÁCIO PEREIRA

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos

Departamento de Parasitologia - ICB - UFMG

Junho - 2006

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiro a Deus, pela minha vida, e por Ele colocar tantas pessoas especiais em meu caminho até aqui;
- aos meus pais, Wilson e Geralda, por me apoiarem incondicionalmente neste trabalho de mestrado e em todos os meus projetos de vida, e por servirem de maravilhosas referências de vida e exemplos de dignidade pra mim;
- aos meus irmãos, Alysson e Helen, pelo grande carinho e torcida, e por compartilharem comigo as alegrias das minhas conquistas e os sentimentos dos momentos difíceis;
- à toda minha família, que sempre torce muito por mim;
- ao Renato, pela compreensão, pelo apoio incondicional, e por ser meu grande amor em todos os momentos, desde que nos conhecemos;
- à família do Renato, Dona Lourdinha, Seu Antônio, Glorinha, Cristina, Marina, Marcelo, Otávio, Sérgio, Marquinho, Cleomar, Meire, Cíntia e todos os sobrinhos e amigos, pela grande acolhida e pelo carinho, que tornaram minha caminhada mais alegre;
- ao meu Orientador, Professor Dr. Nelder Gontijo, que além de toda a dedicação a este nosso trabalho, sempre me incentivou a buscar o conhecimento, seja de forma direta, ou simplesmente servindo de exemplo de amor à pesquisa;
- ao meu co-orientador, Professor Dr. Marcos Pereira, pelas idéias e sugestões neste trabalho e na minha vida científica, além do convívio alegre no laboratório;
- ao Professor Dr. Álvaro Eiras, pela atenção em relatar este trabalho, pelas críticas, sugestões e contribuições;
- aos examinadores Dr. Evanguedes Kalapothakis e Dra. Maria Norma Melo, pela grande dedicação, pelo carinho e pelas ótimas idéias e contribuições na avaliação desta dissertação;

- à Luciane, minha grande amiga e companheira, por ter iniciado este projeto comigo, e mesmo buscando outros caminhos na pesquisa e na biologia, ter continuado sempre contribuindo e me apoiando com carinho e amizade inestimáveis;
- à Ceres, minha grande amiga desde muito, por todo o carinho, amizade e disponibilidade, me apoiando e me acompanhando sempre na realização deste trabalho;
- às amigas que encontrei no LFIH, Isabella, Adriana Soares, Adriana Chefa, Fernanda (Uberlândia) e Veruska, pelos conselhos, pela solidariedade e momentos de alegria;
- ao Ricardo, Felipe e Fernanda (PUC) do LFIH pelo grande apoio, paciência e prestatividade na parte de Biologia Molecular, além da amizade e torcida;
- ao técnico do LFIH César pela atenção e dedicação no fornecimento dos Flebotomíneos;
- a todos no LFIH, que de várias formas, tornaram a realização deste trabalho muito mais alegre e menos estressante: Vladimir, Andrezza, Rafaela, Natasha, Jéssica, Érica e Arthur; além dos que já passaram pelo laboratório: Raquel, Thelma, Dani, Artur, Warrison, Maurício, Sílvia, Reginaldo, e tantos outros;
- Carol e Elisa ("AH UU AH!"), não tenho palavras para descrever o quão intensa e verdadeira se tornou nossa amizade ao longo deste mestrado. Agradeço a Deus por ter encontrado vocês nessa caminhada, e por termos caminhado tão unidas nos momentos muito felizes e em outros nem tanto, durante esta fase. Vocês foram muito especiais e importantes na realização deste trabalho, e sempre serão muito importantes na minha vida.
- Agradeço aos amigos do mestrado que vieram de longe, e que me ensinaram muito a respeito de determinação, dedicação à pesquisa, e acima de tudo, a respeito de relações de amizade. Michel e Ândrey, pelos pesquisadores fantásticos que vocês são, cada um ao seu modo, admiro muito vocês!
- Agradeço a Marcelle, Juliana, Silvia, Daniel e Haendel, pela amizade, união, apoio, e pelo convívio tão agradável durante o mestrado;
- à Eveline e Bárbara, pela convivência e aprendizado durante o mestrado;

- aos amigos do Departamento de Parasitologia, Mateus, Maíra, Raquel, Felipe, Tatiana, Márcia, Rose, Renatinha, Leandra, Carinão, e todos os outros com quem convivi durante o mestrado, pelos momentos felizes e de descontração e pelo apoio;
- aos amigos do GIDE, Marco, Gustavo, Vitor , Stênio, Diego, Hudson, Wanderlaine, Sr. Aírton e Sr. Alberto, pela torcida e convívio curto mas muito agradável;
- aos grandes amigos da Biologia, em especial Marjorie, Priscila, Ludmila e Marina pela amizade sincera, pela torcida, e por todos os momentos vividos;
- ao Jamil Oliveira, do Laboratório de Enzimologia e Estrutura de Proteínas (Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB - UFMG), pela disponibilidade e gentileza no empréstimo de equipamentos;
- ao Laboratório de Membranas Excitáveis (Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB - UFMG), na pessoa do Dr. Paulo Beirão, pela disponibilidade e gentileza no uso de equipamentos;
- ao Professor Miguel J. Lopes (Departamento de Fisiologia - ICB - UFMG), pela contribuição na elaboração do projeto deste trabalho;
- ao Laboratório de Malária do Instituto René Rachou, FIOCRUZ - MG, na pessoa do Dr. Luciano Moreira, pela gentileza de nos ter cedido material biológico;
- à secretária da pós-graduação de parasitologia, Sumara, pelo grande apoio, por todos os conselhos, e pelo grande carinho e atenção dedicados a mim e a todos os alunos;
- aos professores do Departamento de Parasitologia, em especial ao Professor Alan Lane de Melo, que de várias formas, me deram muitos ensinamentos dentro e fora da sala de aula;
- ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa do Dr. Pedro Marcos Linardi, pela grande oportunidade de realizar este trabalho de mestrado e pelo apoio financeiro na divulgação dos resultados em Congressos.

Este Trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), do Departamento de Parasitologia - ICB - UFMG, e contou com o apoio financeiro do Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho à pessoa que, com sua criatividade, sabedoria, e dedicação me inspira no mundo da ciência, e que me ensinou e continua a me ensinar a fazer pesquisa. Nelder, vou ser sempre grata pelos ensinamentos e pela confiança.

"Tenho uma teoria de que o cientista e a criança trabalham com a mesma motivação, a curiosidade. Têm que descobrir o mundo, o que é, para que serve. Só que o cientista vai à biblioteca, separa o que não é conhecido, pesquisa o desconhecido. Mas para a criança, tudo é desconhecido. Ela mexe, abre, fuça. 'Por que, mãe'? E tem mãe que enche o saco e fala: que menino chato, chega aqui e bagunça, mexe em tudo! Se ele vence esta repressão, ou vira cientista ou alguém com a mente indagativa, que muitos chamam de subversivo(...)"

Ângelo Machado

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| LISTA DE QUADROS | xiv |
| LISTA DE FIGURAS | xv |
| RESUMO | xvii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Aspectos da biologia e características gerais de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 3 |
| 1.2 Características do tubo digestivo de flebotomíneos | 5 |
| 1.3 Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> sp., processos digestivos, e pH no intestino médio dos flebotomíneos | 9 |
| 1.4 Manutenção do pH intestinal em insetos | 19 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 24 |
| 3 OBJETIVOS | 26 |
| 3.1 Objetivo geral | 26 |
| 3.2 Objetivos específicos | 26 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 Manutenção de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 28 |
| 4.2 Medida do pH no intestino médio abdominal e no intestino médio torácico durante a digestão do repasto sanguíneo em fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com sangue | 28 |
| 4.2.1 Medida do pH no intestino médio abdominal | 28 |
| 4.2.1.a Confeção de microeletrodos e montagem do aparato para a medida de pH | 29 |
| 4.2.1.b Alimentação de fêmeas e medida de pH | 32 |

| | | |
|------------|--|----|
| 4.2.2 | Medidas de pH no intestino médio torácico em fêmeas com repasto sanguíneo | 34 |
| 4.3 | Verificação da distribuição da atividade da α -glicosidase no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem o repasto sanguíneo | 36 |
| 4.4 | Verificação do possível papel da volatilização do dióxido de carbono (CO ₂) no processo de alcalinização do intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com sangue | 38 |
| 4.4.1 | Alimentação das fêmeas e medida de pH | 38 |
| 4.5 | Verificação da existência de manutenção ativa do pH 6,0 no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem o repasto sanguíneo | 39 |
| 4.5.1 | Alimentação forçada | 40 |
| 4.5.2 | Medida do pH nas várias regiões do tubo digestivo | 42 |
| 4.6 | Verificação do efeito da acetazolamida no possível mecanismo ativo de controle do pH no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem o repasto sanguíneo | 43 |
| 4.6.1 | Verificação do efeito da inibição da atividade da anidrase carbônica na alcalinização do intestino médio | 43 |
| 4.6.2 | Verificação do efeito da inibição da atividade da anidrase carbônica na acidificação do intestino médio | 44 |
| 4.7 | Verificação da presença de atividade da anidrase carbônica no intestino médio de <i>L. longipalpis</i> durante a digestão do repasto sanguíneo | 45 |
| 4.8 | Verificação da ocorrência de expressão de genes para a anidrase carbônica nas células do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem repasto sanguíneo através de RT – PCR (“Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction”) | 47 |
| 4.8.1 | Extração de RNA do intestino de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 47 |
| 4.8.2 | Síntese de cDNA usando oligo dT | 48 |
| 4.8.3 | PCR (“Polimerase Chain Reaction”) | 48 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.8.4 | Controle positivo para os iniciadores do gene para anidrase carbônica e verificação da presença de seqüência(s) para a enzima no DNA de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 50 |
| 4.9 | Verificação do papel do transporte diferencial de fosfato na acidificação do pH no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem repasto sanguíneo | 51 |
| 5 | RESULTADOS | 53 |
| 5.1 | Medida do pH no intestino médio abdominal e no intestino médio torácico em fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> com repasto sanguíneo | 53 |
| 5.1.1 | Medida do pH do intestino médio abdominal em fêmeas com repasto sanguíneo | 53 |
| 5.1.2 | Medida de pH no intestino médio torácico em fêmeas com repasto sanguíneo | 56 |
| 5.2 | Distribuição da atividade da α -glicosidase no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem o repasto sanguíneo | 57 |
| 5.3 | Papel da volatilização do dióxido de carbono (CO ₂) no processo de alcalinização do intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com sangue | 59 |
| 5.4 | Ocorrência de manutenção ativa do pH 6,0 no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem o repasto sanguíneo | 62 |
| 5.5 | Efeito da acetazolamida, inibidor da atividade da anidrase carbônica, no mecanismo ativo de controle do pH do intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem o repasto sanguíneo | 65 |
| 5.6 | Verificação da presença de atividade da anidrase carbônica no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> durante a digestão do repasto sanguíneo | 69 |
| 5.7 | Verificação da expressão de anidrase carbônica nas células do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem repasto sanguíneo através de RT-PCR. | 71 |
| 5.8 | Verificação do papel do transporte diferencial de um dos íons fosfato na acidificação do pH no intestino médio de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> sem repasto sanguíneo | 73 |
| 6 | DISCUSSÃO | 76 |

| | | |
|----------|-----------------------------------|-----------|
| 7 | PERSPECTIVAS | 91 |
| 8 | CONCLUSÕES | 93 |
| 9 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | pHs alcançados pelo sangue pobre em CO ₂ no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 60 |
| Tabela 2 | pHs alcançados pelo sangue rico em CO ₂ no intestino médio abdominal de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 61 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|----------|---|----|
| Quadro 1 | Ensaio enzimático da anidrase carbônica (adaptado do trabalho de Terra et al., 1988) | 46 |
| Quadro 2 | Calibrações feitas antes e depois da medida de pH no intestino médio abdominal de uma fêmea de <i>L. longipalpis</i> | 53 |
| Quadro 3 | Médias entre as calibrações anterior e posterior à medida do pH no intestino médio abdominal de <i>L. longipalpis</i> | 54 |
| Quadro 4 | Atividade da α - glicosidase em intestino médio torácico e intestino médio abdominal de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> não alimentadas com sangue | 58 |
| Quadro 5 | Atividade da enzima anidrase carbônica no tubo digestivo de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> alimentadas com sangue | 70 |
| Quadro 6 | Atividade da enzima anidrase carbônica no tubo digestivo de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> <u>não</u> alimentadas com sangue | 70 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 | Fotografia de fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 4 |
| Figura 2 | Tubo digestivo de flebotomíneos | 8 |
| Figura 2.A | Desenho descritivo do tubo digestivo de fêmea de <i>Phlebotomus papatasi</i> dissecado | 8 |
| Figura 2.B | Fotografia do tubo digestivo de fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> dissecado após repasto sanguíneo | 8 |
| Figura 3 | Fases de desenvolvimento de <i>Leishmania</i> sp. no intestino médio do flebotomíneo vetor | 15 |
| Figura 4 | Esquema do aparato para medida de pH | 31 |
| Figura 5 | Inserção dos microeletrodos no intestino médio abdominal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 33 |
| Figura 6 | Cores das soluções padrão de azul de bromotimol e púrpura de bromocresol em pHs conhecidos | 35 |
| Figura 6.A | Soluções do azul de bromotimol | 35 |
| Figura 6.B | Soluções do púrpura de bromocresol | 35 |
| Figura 7 | Alimentação forçada em fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 42 |
| Figura 8 | Cores das soluções padrão do verde de bromocresol em pHs conhecidos | 52 |
| Figura 9 | Curva de calibração dos microeletrodos, relacionando a média das medidas em milivolts com o valor do pH das soluções padrão. | 54 |
| Figura 10 | pH do conteúdo do intestino médio abdominal de <i>Lutzomyia longipalpis</i> durante a digestão sanguínea | 55 |
| Figura 11 | pH no intestino médio torácico de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentadas com sangue e sacarose 24 e 27 horas após repasto | 57 |
| Figura 12 | pHs e distribuição da enzima α -glicosidase nas porções torácica e abdominal do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após repasto sanguíneo | 59 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 13 | Frequência de pHs observada no tubo digestivo de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após a ingestão forçada do tampão MES a 40mM ou 80mM pH 5,0 | 64 |
| Figura 14 | Frequência de pHs observada no tubo digestivo de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após a ingestão forçada do tampão HEPES a 40mM ou 80mM pH 7,5 | 64 |
| Figura 15 | Frequência de pHs observada no intestino médio torácico e no divertículo esofágico de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após a ingestão forçada de tampão MES 160mM pH 5,0 com e sem acetazolamida | 66 |
| Figura 16 | Frequência de pHs observada no intestino médio abdominal e no divertículo esofágico de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após a ingestão forçada de tampão MES 160mM pH 5,0 com e sem acetazolamida | 66 |
| Figura 17 | Frequência de pHs observada no intestino médio torácico e no divertículo de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após a ingestão forçada de tampão HEPES 160mM pH 7,5 com e sem acetazolamida | 68 |
| Figura 18 | Frequência de pHs observada no intestino médio abdominal e no divertículo de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após a ingestão forçada de tampão HEPES 160mM pH 7,5 com e sem acetazolamida | 68 |
| Figura 19 | Produtos da RT-PCR com intestino de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> sem repasto sanguíneo, utilizando os iniciadores para a anidrase carbônica de <i>Anopheles gambiae</i> | 71 |
| Figura 20 | Produtos da PCR com DNA de <i>Anopheles gambiae</i> e <i>Lutzomyia longipalpis</i> utilizando os iniciadores desenhados a partir de seqüências de anidrase carbônica de <i>A. gambiae</i> | 72 |
| Figura 21 | pHs no tubo digestivo de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após a ingestão forçada do fosfato de potássio a 40mM pH 7,5 | 74 |
| Figura 22 | pHs no tubo digestivo de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> após a ingestão forçada do HEPES a 40mM pH 7,5 | 74 |

RESUMO

Apesar da importância do pH no desenvolvimento de *Leishmania* e nos processos digestivos que ocorrem no tubo digestivo dos flebotomíneos, não há na literatura, nenhum estudo a respeito do pH e seus mecanismos de controle no intestino médio de *Lutzomyia longipalpis*. No presente trabalho, utilizamos corantes vitais indicadores de pH e microeletrodos para medir o pH das porções torácica e abdominal do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* durante a digestão do repasto sanguíneo. O pH no intestino médio abdominal atinge valores iguais ou superiores a 8,0, enquanto que no intestino médio torácico, o pH é de aproximadamente 6,0. Através de espectrofotometria, foi observado que a atividade da enzima digestiva α -glicosidase (que digere sacarose) é cerca de 14 vezes maior no intestino médio torácico do que no intestino médio abdominal de fêmeas de *L. longipalpis*, durante a digestão do repasto sanguíneo. Assim, demonstramos que a digestão do repasto sanguíneo e dos açúcares ingeridos pelo flebotomíneo é compartimentalizada: os açúcares são digeridos em meio ácido no intestino médio torácico, enquanto as proteínas são clivadas em meio alcalino no intestino médio abdominal. Introduzindo soluções tamponadas MES ou HEPES (pHs 5,0 e 7,5, respectivamente) no tubo digestivo de *L. longipalpis*, através de alimentação forçada, demonstramos que o pH 6,0 do intestino médio de fêmeas não alimentadas com sangue é mantido ativamente sem alteração. Utilizando a mesma técnica, observamos que a acetazolamida, um inibidor da anidrase carbônica, dificulta a acidificação do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*, quando estas são desafiadas com uma solução tampão HEPES pH 7,5, contendo o inibidor, mas parece não ter influência na alcalinização do meio intestinal, quando o desafio é feito com tampão MES pH 5,0. A anidrase carbônica provavelmente participa da regulação do pH intestinal de *L. longipalpis*, mas não fomos capazes de detectar por RT-PCR, o produto de transcrição do seu gene, quando utilizamos iniciadores homólogos a anidrase carbônica de *Anopheles gambiae*. Também não foi possível detectar a atividade de anidrase carbônica no tubo digestivo de flebotomíneos com ou sem o repasto sanguíneo utilizando espectrofotometria. Alimentando fêmeas com tampão fosfato de potássio (alimentação forçada), foi possível demonstrar que íons fosfato não têm envolvimento direto na manutenção do pH no intestino médio de *L. longipalpis*, pelo menos quando o inseto está sem o repasto sanguíneo. Alimentando fêmeas (em alimentador artificial) com sangue humano degaseificado, observamos que a retirada do CO₂ do sangue pode ter alguma influência na alcalinização do pH intestinal de *L. longipalpis*, mas provavelmente outros mecanismos participam da alcalinização no intestino médio abdominal durante a digestão do repasto sanguíneo.

1- INTRODUÇÃO

As leishmanioses humanas são causadas por várias espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), e constituem um sério problema de saúde pública em várias regiões do mundo. Aproximadamente 350 milhões de pessoas em 88 países estão ameaçadas pela doença (OMS, 2006). Na natureza, todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas de insetos dípteros, da família Psychodidae (Subfamília: Phlebotominae) conhecidos como flebotomíneos. Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, tais como: roedores, canídeos, primatas – inclusive humanos, entre outros.

Leishmania (Leishmania) chagasi Cunha e Chagas, 1934 é a espécie responsável pela leishmaniose visceral americana (Calazar), uma zoonose que tem como reservatório primário a raposa, pode atingir cães, bem como provocar a forma visceral generalizada em humanos (Cunha e Chagas, 1937; Chagas *et al.* 1938).

L. chagasi pertence ao complexo donovani, ao qual também pertencem *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, causadoras da leishmaniose visceral no Velho Mundo. Até algumas décadas atrás, *L. chagasi* e *L. infantum* eram consideradas duas espécies distintas. A partir da década de 90, várias evidências têm mostrado que *L. chagasi* é indistinguível de *L. infantum* (Maurício *et al.*, 2000). Dentre estas evidências, podemos citar as baseadas em estudos enzimáticos (Cupolillo *et al.*, 1994), e também em análises do RNA ribossomal e de mini-exons do DNA de exemplares de várias cepas isoladas de

diferentes hospedeiros (Mauricio *et al.*, 2000). Ao longo do texto desta dissertação, utilizaremos *L. chagasi* como sinonímia para *L. infantum*.

O calazar em humanos inicialmente era uma doença de ambientes silvestres ou rurais, mas nas últimas décadas, muitos casos têm ocorrido em centros urbanos e em áreas residenciais (Lainson e Rangel, 2005). Na América Latina, a doença já foi relatada em pelo menos 12 países sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (Deane e Grimaldi 1985; Lainson e Rangel, 2005).

Em nosso país, a leishmaniose visceral é endêmica, com registro de surtos freqüentes, e encontra-se em franca expansão para grandes centros. Casos autóctones já são comumente diagnosticados em Teresina (PI), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Natal (RN), e em outras capitais brasileiras, incluindo Belo Horizonte. Atualmente, o calazar está distribuído em 19 Estados da Federação, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras. Sua maior incidência encontra-se no Nordeste, região responsável por aproximadamente 70% do total de casos, seguido pela região Sudeste, região Norte, e região Centro-Oeste. Tem-se registrado, em média, cerca de 3.500 casos humanos por ano, e as taxas de letalidade, de acordo com os registros oficiais podem chegar a 10% em alguns locais (MS, 2006).

Desde os primeiros relatos da leishmaniose visceral no Brasil na década de 30, o flebotomíneo *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) tem sido incriminado como o principal vetor de *L. chagasi* em nosso país e nas Américas (Chagas, 1936; Lainson *et al.*, 1977).

1.1 - Aspectos da biologia e características gerais de *Lutzomyia longipalpis*

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, cujo desenvolvimento a partir do ovo passa por quatro estádios larvais e pelo estágio de pupa (Ward, 1990; Killick-Kendrick, 1999). Os criadouros de flebotomíneos na natureza são de difícil localização, mas sabe-se que as larvas se alimentam de matéria orgânica do solo (Ferro *et al.*, 1997), enquanto que os adultos, machos e fêmeas, utilizam seiva de plantas, néctar de flores e secreções açucaradas de insetos como fonte de alimentação (Chanotis, 1974; Schlein, 1986; Molyneux *et al.*, 1991). Somente as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas, e o sangue obtido durante o repasto sanguíneo é utilizado para a maturação dos ovariolos. Em espécimes de *L. longipalpis* criados em laboratório, a digestão do sangue no intestino dura aproximadamente 50 horas, sendo que a oviposição é feita a partir do quinto dia após o repasto sanguíneo. Da fase de ovo até a emergência dos adultos, se passam aproximadamente 40 dias. Este período pode variar, dependendo das condições de criação. Rangel *et al.*, (1986), por exemplo, observaram um período de desenvolvimento que variou de 28 a 36 dias para *L. longipalpis* e *Lutzomyia intermedia* criados em condições de laboratório.

Os adultos de *L. longipalpis* se caracterizam pelo tamanho reduzido (entre 2,0 e 3,0mm), e pelo corpo densamente coberto de cerdas finas. As pernas e antenas são relativamente longas e finas (Young e Duncan, 1994). Um exemplar fêmea desta espécie é mostrado na **figura 1**.

Figura 1 – Fotografia de Fêmea de *Lutzomyia longipalpis*



Quando vivos e em repouso, os flebotomíneos mantêm suas asas em posição semi-ereta. O abdome é formado por 11 segmentos, sendo a extremidade posterior bem diferenciada entre os sexos. Nas fêmeas, a porção final do abdome é ligeiramente arredondada, sendo os últimos segmentos telescopados. Nos machos, o 9^o e o 10^o segmento são bifurcados, e compõe, juntamente com outros elementos, a genitália masculina (Young e Duncan, 1994).

As peças bucais são do tipo sugador pungitivo, constituídas de labro, um par de mandíbulas, hipofaringe, um par de maxilas e lábio (Young e Duncan, 1994). Na altura da hipofaringe, se desembocam os ductos das glândulas salivares, que são responsáveis pela produção de uma saliva rica em biomoléculas ativas de grande importância no processo de hematofagia das fêmeas, e na capacidade de facilitar a implantação da infecção de *Leishmania* sp. nos hospedeiros vertebrados (Ribeiro, 1987a; Ribeiro, 1987b).

Vasodilatadores (Ribeiro *et al.*, 1989) e inibidores do sistema de complemento dos mamíferos (Cavalcante *et al.*, 2003), são apenas alguns exemplos dessas biomoléculas.

Os machos de *L. longipalpis* têm mandíbulas rudimentares, não sendo capazes de penetrar suas peças bucais na pele de vertebrados (Young e Duncan, 1994).

1.2 - Características do tubo digestivo de flebotomíneos

O tubo digestivo dos insetos, de maneira geral, pode ser dividido em três regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Chapman, 1998).

O intestino anterior dos insetos tem origem ectodérmica (Baldwin *et al.*, 1996), e é constituído por uma monocamada de células achatadas revestidas por uma película de quitina (Chapman, 1998). Esta porção do tubo digestivo não está envolvida em processos de absorção ou secreção (Chapman, 1998). O intestino anterior de *L. longipalpis* é formado pelo cibário e pela faringe. Estas duas regiões são ligadas à musculaturas contráteis, formando a bomba cibarial e a bomba faringiana (Jobling, 1987), que funcionando em conjunto, permitem a sucção do alimento. Logo após a faringe, é encontrado o esôfago, que faz a ligação do intestino anterior com o restante do tubo digestivo. Do esôfago emerge um divertículo (Jobling, 1987), responsável pelo armazenamento inicial de açúcares (Schlein, 1986; Tang e Ward, 1998) (ver **figura 2.A**). Os açúcares armazenados no divertículo vão sendo lentamente enviados ao intestino médio, e esta passagem é controlada pela válvula presente no estomodeu (Tang e Ward, 1998).

O intestino médio dos insetos, que tem origem endodérmica (Baldwin *et al.*, 1996), é formado por uma monocamada de células colunares que estão ativamente envolvidas na

produção e secreção de enzimas, bem como na absorção de nutrientes (Billingsley e Lehane, 1996).

O intestino médio, de maneira geral, é o órgão responsável pelo armazenamento e digestão do sangue (em se tratando de hematófagos) e também de carboidratos (Billingsley e Lehane, 1996). Em *L. longipalpis*, o intestino médio é formado por um epitélio de camada única, com células cilíndricas densamente cobertas por microvilosidades voltadas para o lúmen. Estas células estão apoiadas numa lâmina basal fina, que separa o tubo digestivo da hemocele do inseto (Rudin e Hecker, 1982). Assim como ocorre em outros insetos, nos flebotomíneos, a superfície da membrana basal encontra-se envolvida por fibras musculares longitudinais e circulares, que formam uma rede muscular responsável pelos movimentos de todo o intestino (anterior, médio e posterior) durante a passagem dos alimentos (Billingsley e Lehane, 1996; Andrade-Coelho *et al.*, 2001). Além da secreção de enzimas digestivas e da absorção e transporte dos produtos da digestão, as células do intestino médio abdominal dos flebotomíneos são responsáveis também pela produção e secreção da membrana peritrófica (Adler, 1964). Esta membrana é uma estrutura acelular amorfa composta de quitina, mucopolissacarídeos e outras proteínas, que envolve o bolo alimentar, evitando danos ao epitélio intestinal e protegendo o flebotomíneo contra possíveis agentes infectantes (Gemetchu, 1974; Killick-Kendrick, 1979; Killick-Kendrick, 1990; Pimenta *et al.* 1997). *L. longipalpis* possui dois tipos de células endócrinas dispersas na monocamada do epitélio do intestino médio. O primeiro tipo produz grânulos ativos que parecem ser enviados para a hemolinfa via membrana celular, e o segundo se abre para o lúmen secretando seus produtos através das microvilosidades (Leite e Evangelista, 2001). Estes

dois tipos celulares, e seus produtos de secreção provavelmente estão envolvidos no controle dos processos digestivos do flebotomíneo.

O intestino médio de *L. longipalpis* se subdivide em duas regiões distintas: o intestino médio torácico e o intestino médio abdominal. A região inicial do intestino médio torácico é chamada de estomodeu, e possui uma válvula. De maneira geral, o intestino médio torácico é uma porção estreita, para onde se dirigem, gradativamente, os açúcares ingeridos que estavam armazenados no divertículo (Tang e Ward, 1998). O intestino médio abdominal é uma porção dilatada para onde vai todo o sangue ingerido durante o repasto sanguíneo, como mostra a **figura 2.B**. Pode-se observar que o tubo digestivo de *L. longipalpis*, em termos de estrutura, é bastante semelhante ao de *Phlebotomus papatasi*, descrito por Jobling (1987) (ver **figura 2**).

Figura 2 -*Tubo digestivo de flebotomíneos*

Figura 2.A - *Desenho descritivo do tubo digestivo de fêmea de Phlebotomus papatasi dissecado (Jobling, 1987)*

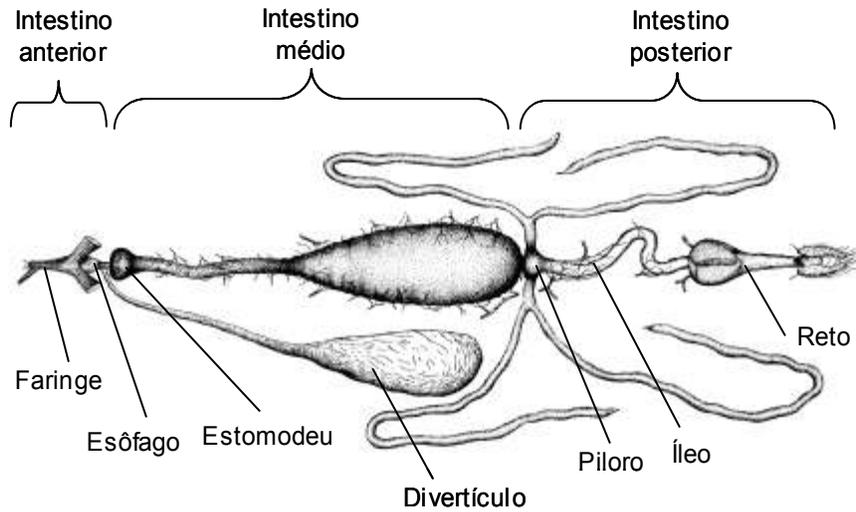
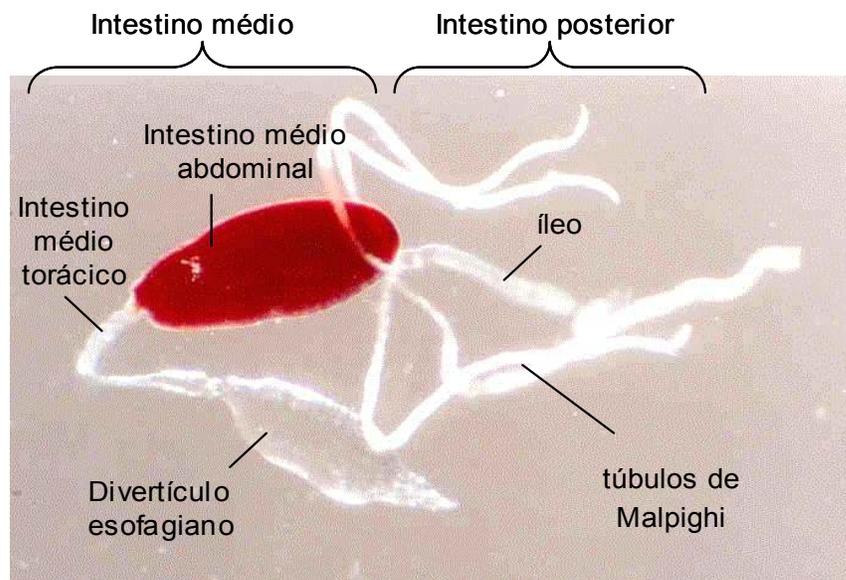


Figura 2.B - *Fotografia do tubo digestivo de fêmea de Lutzomyia longipalpis dissecado após repasto sangüíneo*



O intestino posterior dos insetos se forma a partir de células do ectoderma (Baldwin *et al.*, 1996), e é constituído principalmente por células ricas em mitocôndrias no ápice, que são responsáveis pelo transporte de íons e água (Chapman, 1998). Assim como em vários outros insetos (Chapman, 1998), nos flebotomíneos o intestino posterior é diferenciado em piloro, íleo e reto (Jobling, 1987) (**figura 2.A**). O piloro funciona como uma válvula, e dele emergem dois pares de túbulos de Malpighi que auxiliam na excreção de água e de alguns eletrólitos (Chapman, 1998).

1.3 - Desenvolvimento de *Leishmania* sp., processos digestivos, e pH no intestino médio dos flebotomíneos

Leishmania sp. circula entre os hospedeiros vertebrados e seus vetores, apresentando, as formas amastigotas (ovais e sem flagelo aparente) nas células do sistema mononuclear fagocitário dos mamíferos, e várias formas flageladas no tubo digestivo dos flebotomíneos (promastigotas). Alguns autores têm usado o termo promastigota procíclica para denominar todas as formas flageladas que se desenvolvem ao longo do tubo digestivo do vetor, excetuando-se as promastigotas metacíclicas que ocorrem ao final do processo de desenvolvimento (Pinto-da Silva *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2002). Já em outros trabalhos, os autores usam várias denominações, que refletem melhor as diferenças morfológicas e bioquímicas entre as várias formas promastigotas que já foram observadas em culturas e no intestino do vetor (Walters, 1993; Sacks e Kamhavi, 2001; Gossage *et al.*, 2003, Bates e Rogers, 2004).

Ainda não há um consenso com relação ao número de tipos de formas promastigotas de *Leishmania* sp. que existem. No presente trabalho, serão utilizadas as mesmas denominações encontradas no trabalho de Gossage *et al.* (2003), que são: promastigota procíclica, promastigota nectomônada, promastigota leptomônada, e promastigota metacíclica. Em alguns casos, são observadas formas de *Leishmania* sp. relativamente curtas e arredondadas fixadas à superfície cuticular da válvula do estomodeu através de hemidesmossomos. Estas formas são chamadas de promastigotas haptomônadas, e provavelmente são originadas das promastigotas leptomônadas (Killick-kendrick *et al.*, 1974; Bates e Rogers, 2004). Paramastigotas, assim como as haptomônadas, são formas flageladas fixas encontradas na região do estomodeu, mas possuem o núcleo adjacente ao kinetoplasto, e portanto, não são consideradas promastigotas (Bates e Rogers, 2004).

Leishmania sp. é introduzida no tubo digestivo dos insetos vetores quando estes se alimentam num hospedeiro vertebrado infectado. Sabe-se que as fêmeas dos flebotomíneos não obtêm o sangue dos hospedeiros canulando diretamente um vaso sanguíneo (solenofagia). O inseto usa suas peças bucais, que são relativamente curtas e rígidas, para dilacerar os tecidos e vasos sanguíneos do mamífero, formando um pequeno poço de sangue, líquido intersticial e restos celulares, no qual pode se alimentar (telmatofagia). Vale ressaltar aqui, que a infecção de flebotomíneos por *Leishmania* sp. é muito favorecida por este modo de alimentação telmatofágico do inseto, que permite que os protozoários presentes nos macrófagos da pele do hospedeiro sejam ingeridos pelo vetor juntamente com os restos celulares.

O ciclo de *Leishmania* sp. no inseto vetor tem início quando os macrófagos parasitados, após passagem pelo intestino anterior, se rompem no intestino médio abdominal, liberando ali as formas amastigotas (Lainson *et al.*, 1987).

No intestino médio abdominal, os protozoários vivem no meio extracelular (lúmen intestinal) misturados ao bolo alimentar, que é envolvido pela membrana peritrófica (já descrita no **item 1.2**). A partir daí, vários fatores relacionados à *Leishmania* sp. e ao ambiente intestinal, vão influenciar no desenvolvimento e na diferenciação do parasito, determinando se o ciclo intravetorial será bem sucedido e culminará com a transmissão da forma infectante ao hospedeiro vertebrado (Sacks, 2001).

Com a chegada do sangue (infectado ou não por *Leishmania* sp.) ao intestino do flebotomíneo, inicia-se a digestão das proteínas ingeridas no repasto sanguíneo, através da ação de enzimas proteolíticas, que normalmente são ativas em pHs ligeiramente alcalinos (Dilon e Lane, 1993a; Mahmood e Borovsky, 1993; Schlein e Jacobson, 1998). A atividade de proteases semelhantes à tripsina já foi detectada no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* após o repasto sanguíneo por Gontijo *et al.* (1998). Mahmood e Borovsky (1993) estudaram a síntese de proteases no intestino de exemplares de *Lutzomyia anthophora* em diferentes estados fisiológicos.

Sabe-se que as formas amastigotas de *Leishmania* sp. quando estão se diferenciando para formas promastigotas são altamente susceptíveis às proteases e ao ambiente do intestino do flebotomíneo (Pimenta *et al.*, 1997). Isso constituiria, portanto, uma primeira barreira para a continuidade do ciclo intravetorial (Schlein, 1986; Pimenta *et al.*, 1997; Sacks, 2001). Neste momento, a membrana peritrófica funcionaria como uma proteção para

os parasitos, retardando a chegada da ação enzimática letal às formas amastigotas que se encontram por acaso no centro do bolo digestivo (Pimenta *et al.*, 1997).

As formas em transição que escapam da ação das proteases completam a diferenciação para formas flageladas promastigotas (Killick-Kendrick, 1979; Killick-Kendrick 1990; Killick-Kendrick e Rioux, 1991; Walters, 1993). As primeiras promastigotas formadas são curtas, ovóides e pouco móveis, e são denominadas promastigotas procíclicas (Gossage *et al.*, 2003; Bates e Rogers, 2004). Após transformação completa em promastigotas, *Leishmania* sp. passa a ser resistente à atividade proteolítica do intestino (Pimenta *et al.*, 1997; Sacks, 2001). Inclusive, sabe-se que, quando infectando seus vetores naturais, as promastigotas de algumas espécies de *Leishmania* chegam a modular a atividade das proteases intestinais, garantindo assim a sua sobrevivência (Schlein e Romano, 1986; Borovsky e Schlein, 1987; Dillon e Lane, 1993b; Schlein e Jacobson, 1998). Já foi visto, por exemplo, que *Leishmania major* é capaz de inibir a atividade proteolítica no intestino de *Phlebotomus papatasi*, seu vetor natural. Acredita-se que esta alteração da atividade proteolítica do flebotomíneo esteja relacionada à liberação de glicoconjugados derivados de proteoglicanos presentes na superfície das formas promastigotas de *Leishmania* sp. (Sacks *et al.*, 2000).

As promastigotas procíclicas que sobreviveram à atividade proteolítica do intestino se dividem intensamente, e se diferenciam, resultando em formas mais alongadas, chamadas de promastigotas nectomônadas (Gossage *et al.*, 2003). As nectomônadas conseguem perfurar a membrana peritrófica utilizando quitinases (Schlein *et al.*, 1991) e algumas delas se fixam, através da inserção dos flagelos, nas microvilosidades da região anterior do intestino médio abdominal (Molyneux e Killick-Kendrick, 1987; Walters *et al.*,

1989; Lang *et al.*, 1991). Esta fixação é mediada pelo LPG (Lipofosfoglicano), uma molécula constituinte do glicocálice das formas promastigotas que é constituída de cadeias repetidas de galactose-manose-fosfato, e recobre toda a superfície do protozoário, incluindo o flagelo (McConville *et al.*, 1992, Pimenta *et al.*, 1992; Pimenta *et al.*, 1994; Sacks *et al.*, 1995; Sacks *et al.*, 2000).

Após a expulsão dos restos do sangue digerido e da membrana peritrófica, as nectomônadas que foram capazes de se fixar às microvilosidades do intestino médio abdominal e escaparam da eliminação, vão migrando paulatinamente para o intestino médio torácico (Sacks, 2001).

L. chagasi, dentro do tubo digestivo de *L. longipalpis* tem seu desenvolvimento limitado aos intestinos médio e anterior, sem passagem pelo intestino posterior, caracterizando essa espécie como suprapilária, e pertencente ao subgênero *Leishmania* (Lainson *et al.*, 1979).

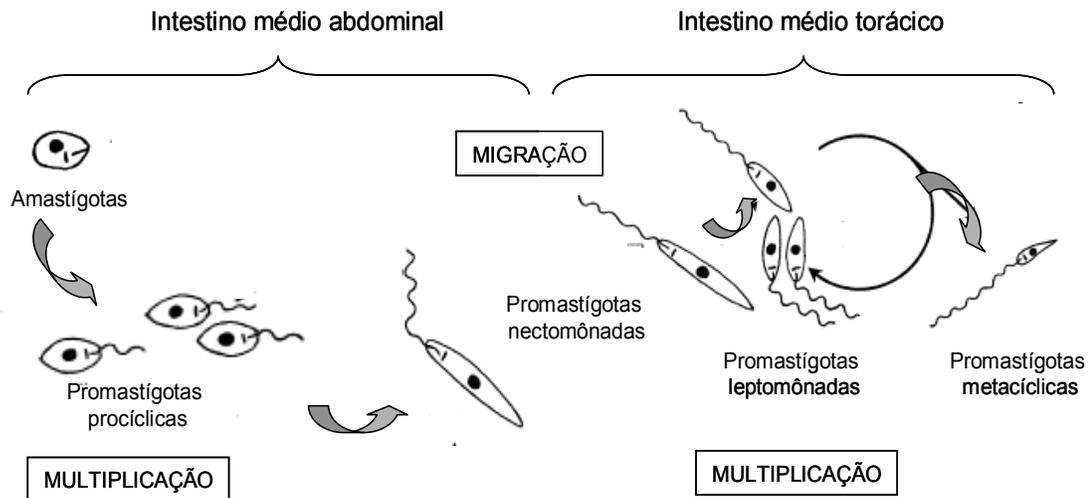
De maneira geral, neste momento do seu ciclo de vida, uma fêmea de flebotomíneo infectada ou não por *Leishmania* sp. já teve acesso a substâncias açucaradas, complementado o repasto sangüíneo com a ingestão de carboidratos (Schlein, 1986; Molyneux *et al.*, 1991). Estes carboidratos têm um papel relevante na migração das promastigotas para as regiões anteriores do tubo digestivo através de um processo quimiotáxico (Oliveira *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 2006). Durante a migração das formas nectomônadas, a presença de carboidratos constituirá também um fator nutricional importante para o desenvolvimento de *Leishmania* sp. (Smith *et al.* 1941; Sherlock e Sherlock, 1961; Warburg e Schlein, 1986).

Sabe-se que os flebotomíneos engolem sua própria saliva quando ingerem carboidratos (Cavalcante *et al.*, 2006), e que esta saliva é capaz de inibir a multiplicação das promastigotas de *Leishmania* sp., induzindo assim, a diferenciação destas em formas promastigotas metacíclicas (Charlab e Ribeiro, 1993). Já foi visto também, que moléculas de hemoglobina inibem a diferenciação das formas nectomônadas em leptomônadas em meio de cultura (Schlein e Jacobson, 1994); e que a hemina, derivada da digestão da hemoglobina, também é capaz de inibir a atividade da saliva, impedindo conseqüentemente, a indução da formação das metacíclicas de *Leishmania* sp. (Charlab *et al.*, 1995). Portanto, neste momento do ciclo intravetorial, a presença da saliva, e ao mesmo tempo, a ausência de hemoglobina e hemina são fatores necessários à formação das formas metacíclicas infectantes (metaciclogênese).

Em meio de cultura, o esgotamento de nutrientes e a queda do pH também são fatores muito importantes na indução da diferenciação de *Leishmania* sp., estimulando a transformação das promastigotas em promastigotas metacíclicas (Giannini, 1974; Bates e Tetley, 1993; Bates, 1994). Muito provavelmente, estes fatores também têm importância no desenvolvimento do parasito no interior do intestino do flebotomíneo.

Assim, num ambiente com queda da quantidade de nutrientes e do pH, as promastigotas nectomônadas se diferenciam em formas leptomônadas, que são mais curtas (Gossage, *et al.*, 2003). Estas, por sua vez, originarão as formas infectantes curtas, afiladas e bastante ativas, chamadas de promastigotas metacíclicas (Sacks, 2001, Bates e Rogers, 2004). A **figura 3** resume as fases do ciclo de *Leishmania* sp. no intestino médio do flebotomíneo.

Figura 3 - Fases de desenvolvimento de *Leishmania sp.* no intestino médio do flebotomíneo vetor



Adaptado de Gossage *et al.* (2003)

Uma vez formadas as promastigotas metacíclicas, estas precisam ser transmitidas ao hospedeiro vertebrado para dar continuidade ao ciclo de vida de *Leishmania sp.* Numa revisão bastante abrangente, Bates e Rogers (2004) apresentam alguns mecanismos diferentes, mas não excludentes, para explicar essa transmissão. Um fator comum e necessário à transmissão é o regurgitamento das promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado.

Schlein *et al.* (1992) acreditam que as quitinases secretadas pelas promastigotas de *Leishmania sp.*, quando estas escapam da membrana peritrófica, são capazes de alterar o funcionamento da válvula do estomodeu, o que provoca um refluxo do conteúdo do intestino médio quando o inseto tenta realizar um novo repasto sanguíneo. Assim, as

formas metacíclicas livres presentes do intestino anterior são inoculadas no hospedeiro vertebrado, numa próxima tentativa de repasto sanguíneo.

Algumas das formas promastigotas formadas no intestino médio estabelecem uma infecção maciça na válvula do estomodeu, e as restantes podem invadir o intestino anterior, colonizando a faringe, o cibário e a probóscida (Sacks, 2001). Num interessante estudo, Rogers *et al.* 2002, demonstraram que as formas promastigotas leptomônadas formadas no intestino médio torácico, produzem e secretam uma espécie de gel (mucina), que posteriormente foi identificado como um proteofosfoglicano filamentosos (fPPG) (Rogers *et al.*, 2004). Este gel e a própria presença do protozoário no intestino médio torácico alteram o funcionamento da válvula do estomodeu. A válvula fica aberta por mais tempo, aumentando o refluxo das promastigotas livres do intestino médio abdominal e no intestino anterior. Assim, há maior possibilidade das formas infectantes de *Leishmania* sp. alcançarem a pele do hospedeiro vertebrado, quando o flebotomíneo tenta realizar um novo repasto sanguíneo (Rogers *et al.*, 2004, Bates e Rogers, 2004;).

Com relação às fontes de alimentos açucarados utilizadas pelos flebotomíneos, sabe-se que a seiva de plantas é rica em sacarose (Ziegler, 1975), e a secreção de afídeos e coccídeos contem sacarose, glicose e frutose, além de outros carboidratos (Auclair, 1963). Tanto os flebotomíneos, quanto os protozoários que eventualmente os estejam infectando, precisam digerir os carboidratos ingeridos, reduzindo-os a monossacarídeos, antes de absorvê-los e utilizá-los. Para tal, são necessárias enzimas adequadas para a digestão da sacarose. A presença e a atividade de glicosidases digestivas no intestino de flebotomíneos

já foi demonstrada em *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia youngi* (Samie *et al.*, 1990; Anez *et al.* 1994).

Gontijo *et al.* (1998) demonstraram e caracterizaram a atividade da enzima α -glicosidase no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* sem repasto sanguíneo e não infectadas. A α -glicosidase é uma enzima ligada à membrana das células intestinais, que tem pH ótimo de atividade próximo a 6,0. Esta enzima apresenta especificidade com relação ao substrato, atuando na glicose alfa-configurada do dissacarídeo glicose-frutose presente na sacarose ingerida pelo flebotomíneo.

Para a digestão dos diversos tipos de proteínas presentes no repasto sanguíneo, o flebotomíneo necessita também da atividade de enzimas proteolíticas. A atividade de proteases como as aminopeptidases, tripsinas e quimiotripsinas, já foi observada em *P. papatasi* e *Phlebotomus langeroni*, sendo as aminopeptidases mais atuantes nas células da parede do intestino, e as tripsinas e quimiotripsinas (enzimas solúveis) capazes de atravessar a membrana peritrófica e atingir o lúmen intestinal. Estas proteases têm pHs ótimos entre 8,0 e 9,0 (Dillon e Lane, 1993a). A biosíntese de serino-proteases também foi estudada por Mahmood e Borovsky (1993) em *Lutzomyia anthophora*.

Durante o desenvolvimento dos parasitos no tubo digestivo do flebotomíneo, tanto as sacarases quanto as proteases do inseto precisam estar ativas no intestino médio para manter os processos de digestão dos açúcares e das proteínas ingeridos.

A concentração de íons hidrogênio (pH) influencia fortemente a atividade enzimática durante a digestão, e como foi citado anteriormente, também pode afetar o desenvolvimento dos protozoários no intestino médio dos flebotomíneos.

Formas promastigotas de *Leishmania* sp. cultivadas em diferentes meios de cultura crescem melhor em pH neutro ou ligeiramente alcalino (Melo, 1982; Sacks e Perkins, 1985). Já as promastigotas cultivadas no pH 5,5 se diferenciam em formas metacíclicas infectantes em número muito maior do que as cultivadas em pH 7,6 (Bates e Tetley, 1993; Zakai *et al.* 1998). A acidificação do meio de cultura parece ser um dos principais estímulos que determinam a diferenciação de *Leishmania* sp. em cultivo, e muito provavelmente, tem um papel semelhante durante o seu desenvolvimento no tubo digestivo dos flebotomíneos (Bates e Tetley, 1993). Por outro lado, todas as enzimas responsáveis pela digestão das proteínas ingeridas por flebotomíneos atuam melhor em pH alcalino (Borovsky e Schlein, 1987; Mahmood e Borovsky, 1992; Dillon e Lane, 1993a; Mahmood e Borovsky, 1993), enquanto que as responsáveis pela digestão dos açúcares, na maioria dos casos, atuam em pHs ligeiramente ácidos (pH~6,0) (Gontijo *et al.*, 1998).

Ora, se as enzimas que precisam funcionar durante a digestão do sangue e dos açúcares requerem pHs alcalino e ácido, respectivamente, e também a multiplicação e a diferenciação de *Leishmania* sp. ocorrem em pHs diferentes, como esses processos poderiam ocorrer todos num mesmo espaço físico (o intestino médio do flebotomíneo)?

Esta aparente contradição pode ser explicada se assumirmos a hipótese proposta por Gontijo *et al.* (1998): o pH alcalino e a disponibilidade de nutrientes durante a digestão de

proteínas logo após o repasto sanguíneo favoreceriam a multiplicação de *Leishmania* sp. Durante esta fase, o pH mais alto, e a presença de hemoglobina estariam inibindo a diferenciação das promastigotas procíclicas em promastigotas metacíclicas (metaciclologênese) (Schlein e Jacobson, 1994). Como citado anteriormente, a hemina, derivada da digestão da hemoglobina, parece impedir a ativação da metaciclologênese das leishmânias, inibindo a atividade da saliva engolida pelo flebotomíneo junto com o repasto sanguíneo (Charlab e Ribeiro, 1993; Charlab *et al.*, 1995). Com o final da digestão das proteínas, hemina e/ou hemoglobina estariam esgotadas, e o pH cairia, tornando-se um estímulo para a metaciclologênese (Gontijo *et al.* 1998). A queda do pH favoreceria também a atividade das glicosidases digestivas, tanto dos flebotomíneos, quanto das formas promastigotas de *Leishmania* sp., já que ambas funcionam bem em pH ácido (Gontijo *et al.* 1996; Gontijo *et al.* 1998).

1.4 - Manutenção do pH intestinal em insetos

Utilizando corantes vitais indicadores de pH, Gontijo *et al.* (1998), mostraram que o pH nas duas porções do intestino médio de *L. longipalpis* se mantém entre 5,5 e 6,0, e fica em torno de 6,5 no divertículo esofágico de fêmeas sem repasto sanguíneo. Além do uso de indicadores de pH, outras metodologias têm sido propostas para medida de pH no tubo digestivo de insetos. Uma delas é a utilização de microeletrodos sensíveis ao íon H^+ (Billker *et al.*, 2000, Boudko *et al.*, 2001a). Apesar de mais complexo e trabalhoso, o uso de microeletrodos permite medidas de pH mais precisas e possibilita a medida de pH do

sangue em digestão. Isto não poderia ser feito com corantes indicadores, pois a coloração do sangue não permite a visualização da cor assumida pelos corantes.

Uma vez que o pH intestinal é um dos principais fatores responsáveis pela regulação do desenvolvimento de *Leishmania* sp. no tubo digestivo dos flebotomíneos, torna-se bastante relevante o estudo dos mecanismos envolvidos no seu controle. Alguns estudos de controle de pH no intestino de insetos têm sido realizados, como será citado a seguir.

Um dos mecanismos de regulação do pH do sangue de mamíferos envolve o equilíbrio entre o dióxido de carbono (CO₂) dissolvido no sangue e os íons bicarbonato ali presentes. A perda de CO₂ do sangue de camundongos (exposto ao ar), provoca um aumento de pH 7,4 (pH fisiológico do sangue) para pH 8,0 em apenas 10 minutos. No intestino médio de *Anopheles stephensi* foi observado um aumento de pH 7,4 para pH 7,8, 24 horas após o repasto sangüíneo, através do uso de microeletrodos sensíveis ao íon H⁺. Essa alcalinização que ocorre no sangue ingerido pelo culicídeo dentro do tubo digestivo, poderia ser explicada pela perda do CO₂ neste momento da digestão do repasto (Billker *et al.*, 2000).

O mecanismo de alcalinização de soluções no intestino através da volatilização do CO₂ ocorreria da seguinte forma: a saída deste gás do lúmen intestinal para a hemolinfa, e da hemolinfa para fora do corpo do inseto através do sistema traqueal, provocaria o deslocamento do equilíbrio da equação $\uparrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, de maneira a consumir íons H⁺. O CO₂ se desprenderia lentamente do sangue (através do sistema de ventilação do inseto), aumentando o pH no lúmen intestinal (Billker

et al., 2000). Mecanismo semelhante poderia ocorrer no intestino médio de *L. longipalpis*, uma vez que os flebotomíneos ingerem o sangue de mamíferos, que é rico em CO₂.

Contudo, será que apenas a volatilização de CO₂ seria suficiente para manter um pH alcalino por várias horas após o repasto sanguíneo? Essa é uma condição essencial para o processo de digestão de proteínas e para a multiplicação de *Leishmania* sp. nos flebotomíneos. Provavelmente outros mecanismos devem estar envolvidos na manutenção do pH no tubo digestivo deste inseto.

A enzima anidrase carbônica catalisa a reação que forma o ácido carbônico (H₂CO₃) a partir de CO₂ e H₂O. O ácido carbônico por sua vez se dissocia em H⁺ e íons bicarbonato (HCO₃⁻), que podem ser transportados entre a hemolinfa e o lúmen intestinal dos insetos. Em larvas de *Musca domestica*, por exemplo, foi detectada a atividade de anidrase carbônica no intestino médio (Terra *et al.*, 1988). No caso das larvas da mosca, acredita-se que os íons HCO₃⁻ produzidos nas células intestinais passam para a hemolinfa, enquanto que íons H⁺ são transportados ativamente para o lúmen do intestino médio, ajudando a manter este local bastante ácido, com pH próximo a 3,1 (Terra e Regel, 1995). Genes para a anidrase carbônica já foram clonados a partir de amostras de cDNA de intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*, e a própria enzima já foi detectada no tecido intestinal, através de hibridização *in situ* e testes histoquímicos (Corena *et al.*, 2002). A atividade de anidrase carbônica no intestino médio de *L. longipalpis* seria um forte indício de que esta enzima estaria envolvida na geração de íons bicarbonato e íons H⁺ que por sua vez, poderiam ser utilizados na alcalinização ou na acidificação do tubo digestivo de acordo com seu estado fisiológico (Planelles *et al.*, 1992).

Sabe-se que ao longo do tubo digestivo de larvas de *A. aegypti*, existe um forte gradiente de concentração de íons H^+ , sendo que o pH permanece entre pH 7,0 e pH 8,0 na região posterior do intestino médio, mas pode chegar a pH ~ 11 na porção anterior (Dadd, 1975; Boudko *et al.*, 2001b). Essa alcalinização no intestino médio anterior estaria relacionada, segundo Boudko *et al.*, 2001b, ao acúmulo de ânions OH^- , CO_3^{2-} , ou HCO_3^- na região. Testando o efeito do DIDS (inibidor do transporte de ânions) e da acetazolamida (inibidor da anidrase carbônica), e medindo as concentrações de íons HCO_3^- e Cl^- no lúmen e nas células do intestino médio anterior de *A. aegypti*, Boudko *et al.* (2001b) verificaram que o antiporte HCO_3^-/Cl^- e a atividade da anidrase carbônica são fatores de grande importância no processo de alcalinização intestinal deste inseto. Processos semelhantes poderiam influenciar no controle do pH no intestino médio de *L. longipalpis*.

Íons HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$ (ácidos fracos) provenientes da dissociação do ácido fosfórico (H_3PO_4) são considerados, dentre outros, agentes tamponantes na hemolinfa de insetos (Harrison, 2001). O fosfato orgânico contribui, por exemplo, na manutenção do pH da hemolinfa em Lepidoptera (Wyatt, 1961; Harrison, 2001).

Em *M. doméstica*, foi visto que amônia e fosfato estão presentes em altas concentrações no intestino anterior e no intestino posterior, e poderiam influenciar na manutenção de pHs próximos a 7,0 nestes locais (Terra e Regel, 1995).

Dosando fosfato no sangue humano, observou-se que de um total de 6,4mM encontrados, 4,8 mM se apresentam compondo moléculas orgânicas tais como DNA, ATP, fosfolipídios, etc; e 1,6mM na forma de íons inorgânicos $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} (dados não

publicados). Estes íons poderiam ser transportados pelas membranas celulares do tubo digestivo. Quando um inseto se alimenta de sangue, além de uma determinada quantidade dos íons fosfato livres serem ingeridos, o próprio processo de digestão do sangue pode gerar ainda mais íons fosfatos, liberando-os de suas moléculas ligantes.

O transporte preferencial de um dos íons fosfato (devido a diferença da densidade das cargas) do lúmen intestinal para a hemolinfa do inseto hematófago, poderia deslocar o equilíbrio da equação $\text{H}_2\text{PO}_4^- \leftrightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$ de maneira a alterar o pH intestinal. Se o íon H_2PO_4^- fosse a forma predominantemente transportada através das células intestinais, em detrimento do íon HPO_4^{2-} , o equilíbrio químico resultante levaria a uma alcalinização do tubo digestivo. Caso contrário, se o íon preferencialmente transportado fosse o HPO_4^{2-} , então haveria uma acidificação. Assim, levanta-se a hipótese de que o transporte diferencial de íons fosfato também poderia ter influência no controle do pH intestinal em fêmeas de *L. longipalpis*, já que o sangue, uma fonte de fosfato, está presente em sua dieta.

2 - JUSTIFICATIVA

Como se sabe, a concentração de íons hidrogênio (H^+) ou pH, tem grande importância na fisiologia de todos os organismos. Os íons H^+ são altamente reativos e ubíquos em meio aquoso, e tal reatividade deve-se a grande densidade de carga positiva. Esses íons podem influenciar fortemente a atividade de várias moléculas biológicas, em particular das proteínas. Eles podem entrar em equilíbrio com diversos grupos químicos presentes nas proteínas tais como os grupamentos carboxi e amino-terminais, ou com as cadeias laterais de aminoácidos ionizáveis modificando sua carga. Estas mudanças de carga acabam afetando a conformação das proteínas e conseqüentemente a sua atividade biológica.

Em diversos artrópodes, mecanismos internos de regulação ácido-base já foram observados ao nível intracelular e ao nível de sistemas, e interagem com fatores externos como temperatura, pressão de CO_2 e com a concentração de vários íons no ambiente, entre outros (Harrison, 2001). Tais mecanismos são de vital importância na manutenção do equilíbrio fisiológico nos artrópodes. Os insetos, por exemplo, têm grande capacidade de regular o pH, resistindo a desafios como ambientes ácidos, alterações de pH intestinal provenientes do tipo de alimentação, dentre outros (Harrison, 2001).

Em flebotomíneos, o pH intestinal é essencial nos processos de digestão, principalmente no que diz respeito à atividade das várias enzimas digestivas. Entretanto, até onde foi possível verificar na literatura, apenas um trabalho publicado se dedicou à medir o pH intestinal de *L. longipalpis*. Em tal trabalho, Gontijo *et al.* (1998) demonstrou que o pH no intestino médio de fêmeas sem o repasto sanguíneo se mantém próximo a 6,0, mas não

foram feitas medidas do pH intestinal na presença do repasto sanguíneo. Assim, muito pouco se conhece a respeito dos processos digestivos que ocorrem nos flebotomíneos, quando estes se alimentam de sangue e de açúcares, hábito alimentar normalmente observado na natureza.

Com relação ao desenvolvimento de *Leishmania* sp., sabe-se que em cultivo, um pH ligeiramente alcalino favorece a multiplicação das promastigotas, enquanto que ocorre maior diferenciação das promastigotas em formas metacíclicas quando o cultivo é feito no pH 5,5 (Melo, 1982; Sacks e Perkins, 1985). A acidificação do meio de cultura constitui um importante estímulo na diferenciação de *Leishmania* em cultivo (Bates e Tetley, 1993). Muito provavelmente, estes fatores têm um papel semelhante no controle da diferenciação do protozoário no tubo digestivo dos flebotomíneos.

A determinação do pH intestinal e da atividade de certas enzimas durante e após a digestão do repasto sanguíneo, bem como o estudo dos possíveis mecanismos envolvidos no controle do pH ao longo do tubo digestivo de *L. longipalpis*, podem contribuir para um maior conhecimento da fisiologia digestiva desse inseto, bem como permitir uma melhor compreensão da complexa e interessante relação entre *Leishmania* sp. e seus vetores.

No presente trabalho, nos propusemos a determinar o pH nas diferentes partes do intestino médio durante a digestão sanguínea e a iniciar uma investigação dos possíveis mecanismos que poderiam estar atuando no controle do pH do intestino médio de *L. longipalpis* em diferentes estados fisiológicos.

3- OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Determinar o pH no intestino médio de *L. longipalpis* durante a digestão sanguínea e investigar possíveis mecanismos envolvidos no controle do pH intestinal durante a digestão do repasto sanguíneo e dos açúcares.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Medir o pH no intestino médio abdominal e no intestino médio torácico durante a digestão do repasto sanguíneo em fêmeas alimentadas com sangue.

- 2 - Relacionar os pHs observados nas porções abdominal e torácica do intestino médio com a atividade da enzima digestiva α -glicosidase.

- 3 - Verificar o possível papel da volatilização do dióxido de carbono (CO₂) no processo de alcalinização do intestino médio abdominal de fêmeas alimentadas com sangue.

- 4 - Verificar se o pH no intestino médio de fêmeas sem o repasto sanguíneo é ativamente mantido constante no pH 6,0.

5 - Caso exista um mecanismo de manutenção do pH no intestino de fêmeas não alimentadas, verificar o efeito da acetazolamida, um inibidor da anidrase carbônica neste mecanismo.

6 - Verificar se ocorre atividade de anidrase carbônica nas células do intestino médio de fêmeas com repasto sanguíneo através de espectrofotometria.

7 - Verificar se ocorre a expressão de genes para a enzima anidrase carbônica nas células do intestino médio de *L. longipalpis*, através de RT - PCR (“Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction”).

8 - Verificar se o transporte diferencial de fosfato tem participação na manutenção do pH 6,0 no intestino médio de fêmeas sem repasto sanguíneo.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Manutenção de *Lutzomyia longipalpis*

Em todos os experimentos realizados, foram utilizadas fêmeas de *L. longipalpis* não infectadas com *Leishmania* sp. mantidas há mais de 100 gerações no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade federal de Minas Gerais (UFMG).

No insetário, as larvas de *L. longipalpis* são criadas em “potes” plásticos contendo gesso, que serve como substrato, e alimentadas com uma ração preparada com terra e fezes de coelho. Os adultos, machos e fêmeas são mantidos em gaiolas de náilon, e alimentados com sacarose a 30%. As fêmeas fazem o repasto sanguíneo em hamsters anestesiados com 0,3 mL de Thiopental®. Os flebotomíneos são mantidos à temperatura ambiente de 25°C, com aproximadamente 70% de umidade relativa do ar (Modi e Tesh, 1983).

No início de todos os testes realizados, as fêmeas utilizadas tinham entre 3 e 5 dias de idade.

4.2 - Medida do pH no intestino médio abdominal e no intestino médio torácico durante a digestão do repasto sanguíneo em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com sangue

4.2.1 - Medida do pH no intestino médio abdominal

A presença do sangue no intestino médio abdominal das fêmeas inviabiliza a utilização de corantes indicadores para medida de pH neste local. Dessa forma, foram confeccionados microeletrodos para as medidas de pH nessa região do intestino. A confecção dos microeletrodos é descrita a seguir (**item 4.2.1.a**).

4.2.1. a - Confeção de microeletrodos e montagem do aparato para a medida de pH no intestino médio abdominal (adaptada a partir de Felle, 1987)

Capilares de vidro para micro-hematócrito (diâmetro interno de 1,0 mm) foram estirados no interior de filamentos incandescentes de uma microforja (PP-83, Narishge®, Japan) gentilmente emprestada pelo Professor Dr. Paulo Beirão, do Laboratório de Membranas Excitáveis do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB – UFMG. Assim, obtivemos micropipetas com pontas suficientemente finas para serem introduzidas no intestino médio dos flebotomíneos.

As micropipetas tiveram as pontas polidas em microforja (Beaudouin®, França), e utilizadas para confecção de dois tipos de microeletrodos: um microeletrodo de referência, e um microeletrodo condutor de íons H^+ .

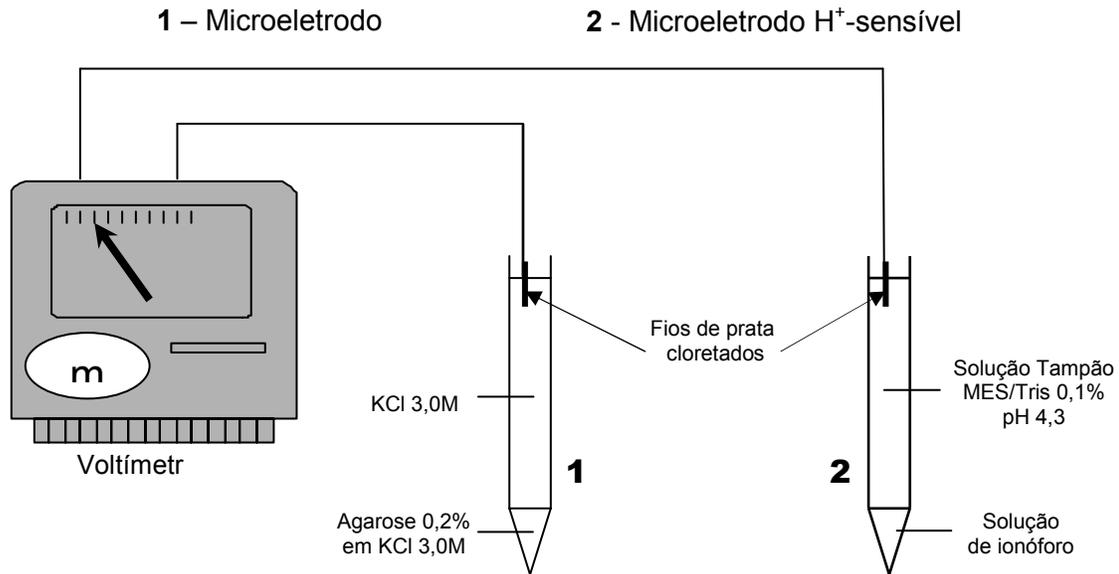
As micropipetas utilizadas como microeletrodos de referência, receberam na ponta, 0,5 μ L de solução de agarose 0,2% em KCl 3,0M. Após a gelificação da agarose, foram preenchidas com KCl 3,0M.

As micropipetas usadas como microeletrodos condutores de íons H^+ receberam na ponta, 1,0 μ L de uma mistura contendo 0,7 μ L de PVC a 0,075% dissolvido em tetraidrofurano e aproximadamente 0,3 μ L de ionóforo para H^+ (FLUKA®). Quando o

solvente tetrahidrofurano se evapora, o PVC forma uma camada porosa e resistente que serve para manter o ionóforo na ponta da micropipeta. O tetrahidrofurano foi secado a vácuo durante sete dias no interior de um dessecador. Imediatamente antes de serem utilizadas, essas micropipetas eram preenchidas com tampão MES 0,1M; KCl 0,1M; pH ajustado em pH 4,3 com algumas gotas de TRIS 0,5M.

Para cada experimento, um par de micropipetas era encaixado em pequenos cilindros de vidro que serviam de suporte e proteção para fios de prata (cloretados com uma camada de cloreto de prata) soldados em fios condutores. As micropipetas conectadas aos fios de prata formavam assim, os microeletrodos. Os dois microeletrodos (o de referência e o condutor de H^+), eram montados em micromanipuladores de modo que podiam ser inseridos no tubo digestivo de fêmeas alimentadas com sangue para medida do pH intestinal. Os fios dos microeletrodos eram conectados a um aparelho (pH Meter 26-Radiometer®, Copenhagen) que mede diferença de potencial (voltagem). A montagem do aparato está representada na **figura 4**.

Figura 4 - Esquema do aparato para medida de pH no intestino médio abdominal de *Lutzomyia longipalpis*



Quando os dois microeletrodos são mergulhados simultaneamente numa determinada solução podem ocorrer três possíveis eventos: A solução pode ser mais ácida, igualmente ácida ou mais alcalina que a solução interna do microeletrodo. Como exemplo podemos citar o que acontece quando a solução na qual os microeletrodos foram mergulhados é mais alcalina. Neste caso ocorrerá passagem de cargas positivas (íons H^+) de dentro para fora do microeletrodo. Como íons negativos não podem ser transportados no sistema, o interior do eletrodo vai ficando cada vez mais negativo em relação ao exterior. A tendência de saída dos íons H^+ acaba sendo contrabalançada pelas cargas negativas que vão aparecendo no lado de dentro cada vez que sai um íon H^+ . Com isso o sistema acaba por atingir um estado de equilíbrio. A diferença de potencial determinada pela distribuição

desigual de cargas no interior e exterior do microeletrodo pode ser medida em milivolts e é proporcional a concentração de H^+ da solução onde os eletrodos estão mergulhados.

Antes dos experimentos, os microeletrodos eram calibrados em soluções-tampão que funcionavam como padrões de pH's conhecidos (pHs entre 6,0 e 8,5). Cada pH gerava uma diferença de potencial estável que podia ser medida. Com os dados assim gerados podia-se construir uma curva de calibração relacionando o pH da solução padrão com a diferença de potencial alcançada em cada caso através de regressão linear. Quando o microeletrodo era mergulhado no tubo digestivo de uma fêmea (um meio de pH desconhecido), a curva de calibração podia ser usada para calcular o pH neste local.

Só eram consideradas válidas as medidas feitas com microeletrodos que mantinham a mesma calibração (com variação máxima de 5%) antes e depois de efetuadas as medidas.

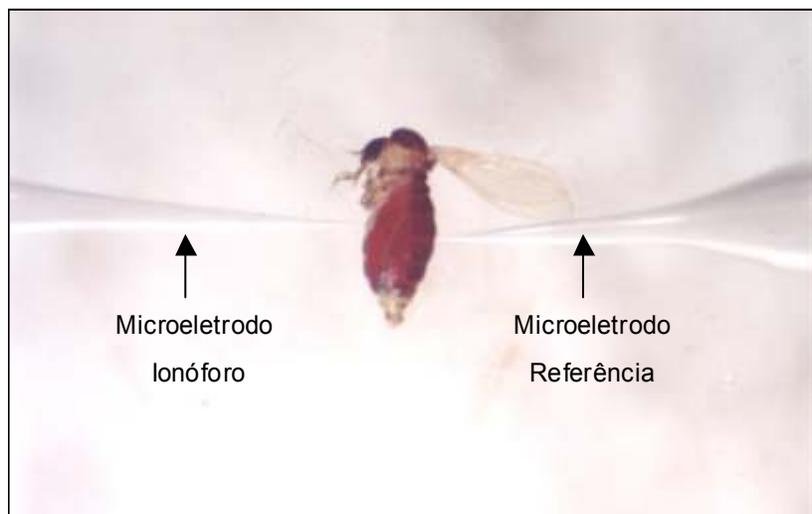
4.2.1.b - Alimentação de fêmeas e medida de pH intestinal

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) anestesiados com Thiopental® (0,2 mL / 100g do peso do animal) foram usados para o repasto dos flebotomíneos. Cada hamster anestesiado era colocado numa gaiola de náilon, onde fêmeas de 3 a 4 dias podiam realizar o repasto sanguíneo durante 1 hora. Foram feitas medidas de pH intestinal em períodos entre 0 e 50 horas após o repasto sanguíneo. Para cada medida, uma fêmea ingurgitada era escolhida e mergulhada por alguns segundos em 5,0 mL de uma solução detergente (detergente caseiro diluído) para retirada das cerdas corporais. Imediatamente depois, a fêmea era lavada duas vezes em solução salina 0,9%, e colocada ainda viva, sobre um pequeno gel de

poliacrilamida 15% umedecido também em salina 0,9%. A umidade na superfície do gel impede que o inseto deslize ou fique ressecado durante a inserção dos microeletrodos.

Com a ajuda de micromanipuladores, e sob microscópio estereoscópico (SZ-PT, Olympus[®], Japan - aumento total de até 40 vezes) um par de microeletrodos previamente calibrado era introduzido no intestino médio abdominal da fêmea. A inserção dos microeletrodos nos intestinos foi feita através da cutícula do abdome sem dissecar os insetos (**figura 5**). Billker *et al.* (2000) também utilizaram esta metodologia de inserção de microeletrodos para medir o pH nos intestinos de *Anopheles gambiae* e de *Aedes. aegypti*. Para garantir a introdução dos microeletrodos no intestino abdominal, estes eram afastados e reintroduzidos no intestino até que fosse possível visualizar suas micropontas no local desejado.

Figura 5 - Inserção dos microeletrodos no intestino médio abdominal de *Lutzomyia longipalpis*



4.2.2 - Medidas de pH no intestino médio torácico em fêmeas com repasto sangüíneo

O uso de microeletrodos no intestino médio torácico é bastante difícil, devido ao tamanho reduzido e a forma estreita desta porção do intestino (ver **figura 2**). Como todo o sangue ingerido pelas fêmeas se acumula no intestino médio abdominal, foi possível utilizar corantes vitais indicadores de pH para verificar o pH na região do intestino médio torácico durante a digestão do sangue.

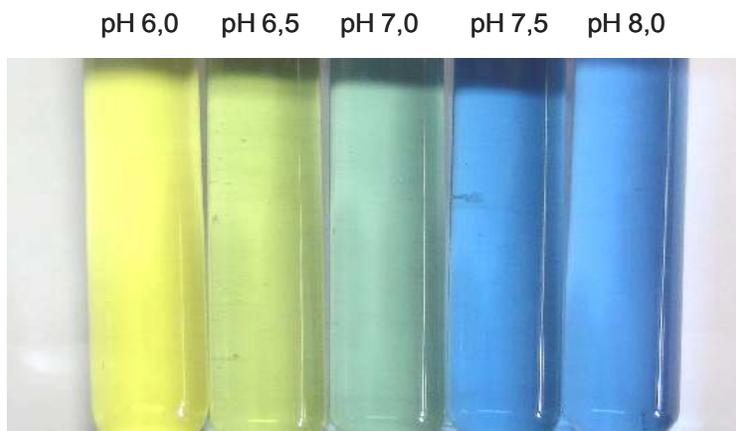
Soluções 0,1% dos indicadores de pH, azul de bromotimol ($pK_a = 7,0$) e púrpura de bromocresol ($pK_a = 6,3$) eram preparadas em sacarose 10%. O pH destas duas soluções era ajustado para 7,0 e 6,5, respectivamente.

Fêmeas de 4 a 5 dias eram alimentadas com sangue de hamster anestesiado, e separadas em dois grupos. Entre uma e três horas depois, soluções recém preparadas de sacarose com um dos corantes indicadores de pH citados no parágrafo anterior eram oferecidas, em pequenas bolinhas de algodão, a cada grupo. Depois de 24 horas, as fêmeas que haviam ingerido a solução de sacarose eram dissecadas sob microscópio estereoscópico, e a cor observada no intestino médio torácico era comparada com soluções-padrão dos corantes com diferentes valores de pH (entre 5,5 e 8,0).

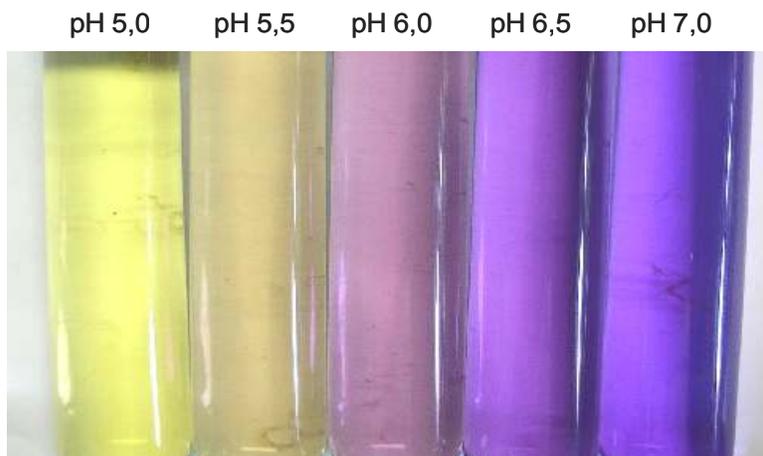
A cor amarela adquirida em pHs abaixo de 6,0 dificulta a visualização dos corantes no intestino. Nestes casos, uma gota da base forte hidróxido de potássio (KOH) 0,1M era adicionada ao intestino dissecado, para confirmar a presença do corante através do aparecimento da cor azul ou roxa, dependendo do corante utilizado. A **figura 6** mostra as cores das soluções-padrão dos dois corantes nos diversos pHs. Com esta metodologia, foi possível alcançar uma precisão de 0,5 unidades de pH nas medidas.

Figura 6 – Cores das soluções padrão de azul de bromotimol e púrpura de bromocresol em pHs conhecidos

6.A - Soluções do azul de bromotimol



6.B - Soluções do púrpura de bromocresol



A solução-padrão do azul de bromotimol no pH 6,0 continha tampão MES à 0,1M. As soluções de pHs 6,5, 7,0 e 8,0, foram preparadas com o tampão fosfato de potássio à 0,1M. A solução padrão de pH 8,5 continha o tampão TRIS/HCl 0,1M. Todas as soluções-

padrão do púrpura de bromocresol (de pH 5,0 a pH 7,0) foram preparadas com uma mistura dos tampões MES e fosfato de potássio, ambos à 0,1M. Cada tampão foi escolhido de acordo com sua faixa de tamponamento, com o intuito de manter os pHs de todas as soluções-padrão dos dois corantes sempre estáveis. Foram adicionados aproximadamente 0,5 miligramas dos indicadores de pH à estas soluções, quantidade suficiente para visualizar a cor adquirida pelo corante em cada pH. Depois de terem os pHs ajustados, as soluções-padrão foram acondicionadas em tubos de ensaio, receberam três gotas de clorofórmio para evitar o desenvolvimento de microorganismos, e foram lacradas com rolhas de borracha. Dessa forma, foi possível utilizar estas soluções como padrão para os corantes durante vários meses.

4.3 - Verificação da distribuição da atividade da α -glicosidase no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem o repasto sanguíneo

Para verificar a distribuição da atividade da α -glicosidase ao longo do intestino médio, foram realizados ensaios enzimáticos. Quinze fêmeas de 3 a 4 dias de idade mantidas sem nenhum tipo de alimentação, tiveram seus intestinos médios dissecados em solução salina 0.9%, sob microscópio estereoscópico. Separavam-se os intestinos médios torácicos e os intestinos médios abdominais, e cada um deles era transferido com os próprios estiletos de dissecação, para microtubos de microcentrífuga mantidos em gelo contendo 250 e 100 μ L de Triton X-100 1% v/v, respectivamente. Após dissolução dos intestinos pelo detergente (“banho maria” por 5 minutos à 30°C), e homogeneização por

agitação manual, retirava-se de cada tubo, amostras de 50 μ L, cada uma contendo “0,2” intestinos médios torácicos ou “0,5” intestinos médios abdominais. Foram utilizadas diluições diferentes para cada parte do intestino médio porque, em testes preliminares, foi visto que a atividade de α -glicosidase era consideravelmente mais alta no intestino médio torácico. A cada amostra de 50 μ L contendo uma das porções do intestino médio eram adicionados: 100 μ L de tampão MES 0,5M (pH 6,0); 100 μ L de H₂O destilada e 250 μ L de substrato p-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo 12mM (concentração final 6,0mM) totalizando 500 μ L de solução em cada microtubo. Para cada ensaio com intestino médio torácico, havia um com intestino médio abdominal correspondente (ambos de uma mesma fêmea).

Os microtubos eram incubados por 1 hora a 30^oC. Ao final da incubação, adicionava-se 1000 μ L de tampão glicina 0,375M pH 10,5 para interromper a reação e provocar a ionização do p-Nitrofenil liberado pela enzima. Em pH alcalino o substrato hidrolisado adquire cor amarela que pode ser lida em espectrofotômetro. No tubo controle, 50 μ L de H₂O destilada foram utilizados no lugar das amostras com intestinos. As amostras e o controle (“branco”) foram lidos no espectrofotômetro à 400nm. Após a leitura, o valor (em absorvância) do “branco” foi descontado das leituras obtidas nas amostras.

As absorvâncias encontradas nas duas porções do intestino médio foram comparadas, levando-se em consideração, a diferença de área de superfície entre o intestino médio abdominal e o intestino médio torácico. Para determinar quantas vezes o intestino médio abdominal é maior do que o intestino médio torácico, foi recortada uma foto do intestino médio de uma fêmea sem repasto sanguíneo, separando se as duas porções do

intestino na imagem. Os dois recortes foram pesados em balança analítica, e conhecendo o peso correspondente a cada um dos recortes, verificamos que a área do intestino médio abdominal é pelo menos 4,8 vezes maior do que a área do intestino médio torácico.

4.4 - Verificação do possível papel da volatilização do dióxido de carbono (CO₂) no processo de alcalinização do intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com sangue

4.4.1 - Alimentação das fêmeas e medida de pH

Cinco mililitros de sangue humano eram coletados em 0,5 mL do anti-coagulante citrato de sódio à 129mM. O sangue era degaseificado durante uma hora e meia dentro de um recipiente submetido a vácuo, na presença de uma barra magnética, que o mantinha em agitação constante. Após a retirada do CO₂ pela degaseificação, o pH do sangue era ajustado para pHs entre 6,6 e 7,0.

Assim, foi possível verificar se, mesmo sem o CO₂, o sangue sofreria a mesma alcalinização observada no intestino médio abdominal de fêmeas alimentadas com sangue rico em dióxido de carbono.

Para cada experimento, o sangue degaseificado tinha seu pH medido. Uma alíquota deste sangue permanecia acondicionada num recipiente em contato com o ar. Isso foi feito para verificarmos o comportamento do pH sanguíneo fora do tubo digestivo do flebotômico.

O restante do sangue degaseificado e com o pH ajustado para pHs entre 6,6 e 7,0 era colocado num alimentador artificial de vidro coberto com pele de pinto recém nascido, lavada previamente em solução salina 0,9%. O alimentador era conectado a um circulador de água com temperatura controlada, que mantinha a temperatura do sangue dentro do alimentador à 37°C.

Aproximadamente 20 fêmeas de 3 a 4 dias de idade nunca alimentadas com sangue ou sacarose, acondicionadas numa gaiola de náilon, puderam se alimentar do sangue através da membrana de pele de pintinho no alimentador artificial, durante uma hora. Em cada experimento, aproximadamente 5 das 20 fêmeas utilizadas realizavam efetivamente o repasto sanguíneo no alimentador artificial. Foram feitas 12 medidas de pH nos intestinos das fêmeas em intervalos entre zero e 26 horas após o repasto no alimentador artificial. Para cada medida, introduzia-se, um par de microeletrodos previamente calibrados no intestino médio abdominal de uma fêmea com repasto sanguíneo, como descrito no **item 4.2.1. b**.

O critério utilizado para considerar uma medida de pH confiável ou não, também foi o mesmo que o explicado no **item 4.2.1. b**. As medidas de pH obtidas foram comparadas com os dados de monitoramento do pH intestinal em fêmeas alimentadas diretamente em hamsters (com sangue normal rico em CO₂).

4.5 – Verificação da existência de manutenção ativa do pH 6,0 no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem o repasto sanguíneo

Para saber se os flebotomíneos são capazes de manter o pH intestinal estável após a ingestão de líquidos com pHs diferentes do normal, foram introduzidas no tubo digestivo

de 57 fêmeas de 3 a 4 dias de idade mantidas sem nenhum tipo de alimentação, soluções altamente tamponadas com pHs acima ou abaixo de 6,0, que é o pH normal em fêmeas não alimentadas com sangue.

Para verificar se ocorreria acidificação de soluções alcalinas altamente tamponadas, até o pH 6,0, soluções tampão HEPES (pKa 7,66) 40 e 80 mM contendo azul de bromotimol 0,1% no pH 7,5 foram introduzidas no tubo digestivo das fêmeas. O tampão de escolha foi o HEPES (“HydroxyEthyl Piperazine EthaneSulphonic acid”), devido a sua alta capacidade de tamponamento no pH 7,5 e por ser uma molécula sintética, não transportada normalmente em sistemas biológicos.

Para verificar se ocorreria alcalinização de soluções ácidas altamente tamponadas até alcançarem o pH 6,0, soluções-tampão MES (pKa 6,21) 40 e 80 mM; púrpura de bromocresol 0,1% pH 5,0 foram introduzidas no tubo digestivo das fêmeas. O MES (“2-N-Morpholino ethanesulphonic acid”) foi utilizado neste teste, devido a sua alta capacidade de tamponamento no pH 5,0 e também por não ser normalmente transportada em sistemas biológicos.

Ambas as soluções-tampão (HEPES e MES) foram introduzidas no tubo digestivo das fêmeas através da técnica da alimentação forçada, descrita no **item 4.5.1**, a seguir.

4.5.1 - Alimentação forçada (adaptada de Hertig e Hertig, 1927 e Anez *et al.* 1997).

A técnica da alimentação forçada foi idealizada por Hertig e Hertig em 1927. Por meio dessa técnica o reflexo da ingestão de líquidos é artificialmente induzido nas fêmeas

pela introdução das suas peças bucais (exceto o lábio) num microcapilar de vidro contendo o líquido a ser ingerido.

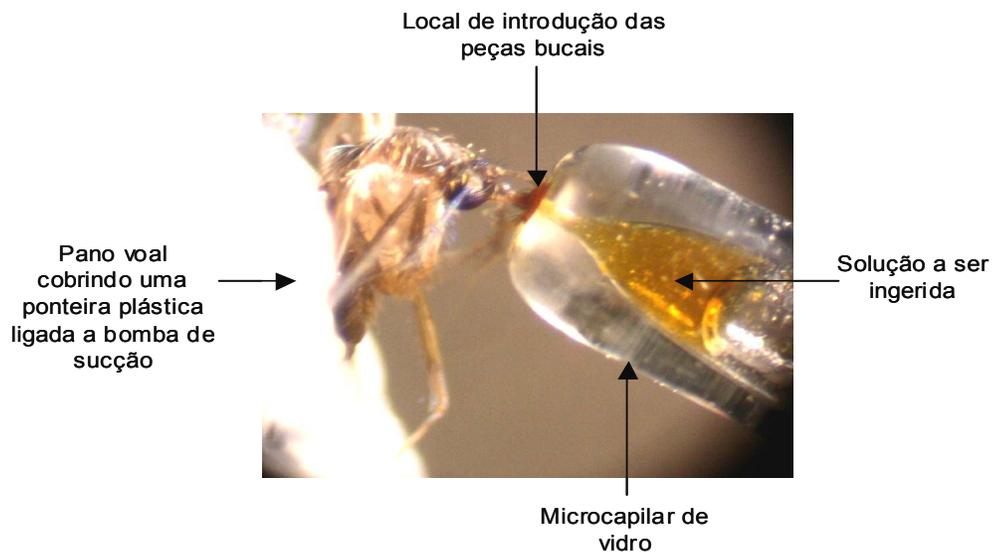
Sabe-se que as fêmeas de flebotomíneo são capazes de ingerir e armazenar no intestino médio, um volume em média de 0,8 μ L de sangue (quando totalmente repletas) (dados não publicados, Gontijo, 2003). Por meio da alimentação forçada, foi possível introduzir no intestino das fêmeas, volumes próximos de 0,5 μ L das soluções-tampão HEPES e MES, suficientes para que a cor dos corantes indicadores presentes nestas soluções pudesse ser visualizada ao longo de todo o tubo digestivo.

Numa situação normal, um flebotomíneo se alimenta apenas de sangue ou de soluções açucaradas. O sangue é dirigido para o intestino médio abdominal e as soluções açucaradas para o divertículo de onde vagarosamente são lançadas no intestino médio para digestão dos açúcares e sua absorção (Tang e Ward, 1998). Usualmente, soluções contendo sais minerais são interpretadas como sendo sangue e na maioria das vezes são dirigidas para o intestino médio. Assim, as soluções tampão utilizadas nos experimentos de alimentação forçada normalmente eram dirigidas para o intestino médio. Porém, em muitos casos, as soluções também eram distribuídas entre o intestino médio e o divertículo, permitindo medir o pH nessas duas regiões do tubo digestivo.

O microcapilar de vidro utilizado na alimentação forçada precisa ter sua ponta estreitada no fogo até atingir um diâmetro suficiente para abrigar todas as peças bucais das fêmeas, exceto o lábio que é mais volumoso e envolve as outras peças bucais. Durante uma picada, o lábio é a única peça que não penetra no hospedeiro.

No momento da alimentação, o microcapilar de vidro estirado contendo a solução a ser ingerida pelo inseto era manipulado manualmente sobre um pedaço de massa de modelar, até que as peças bucais ficassem posicionadas no interior do capilar. As fêmeas eram imobilizadas na extremidade de uma ponteira de plástico de 1,0 mL (cortada na ponta e protegida com um pedaço de pano voal) conectada a uma bomba de sucção cirúrgica (com potência de sucção controlada). Todo este processo era realizado sob microscópio estereoscópico. A abordagem utilizada na alimentação forçada está representada a seguir, na **figura 7**.

Figura 7 – Alimentação forçada em fêmea de *Lutzomyia longipalpis*



Após a alimentação forçada, o pH alcançado pelas soluções no tubo digestivo das fêmeas foi medido da maneira descrita no **item 4.5.2**, a seguir.

4.5.2 - Medida do pH nas várias regiões do tubo digestivo

Cinco minutos após a alimentação forçada, o tubo digestivo de cada fêmea era dissecado sob microscópio estereoscópico e o pH era medido visualmente, comparando-se a cor adquirida pela solução tampão ingerida, com as cores de soluções-padrão do azul de bromotimol e do púrpura de bromocresol em pHs conhecidos. As soluções-padrão para estes corantes já foram mostradas na **figura 6**, do **item 4.2.2**.

4.6 - Verificação do efeito da acetazolamida, inibidor da atividade da anidrase carbônica, no possível mecanismo ativo de controle do pH do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem o repasto sanguíneo

Sabendo-se que a enzima anidrase carbônica pode estar envolvida em processos de alcalinização ou acidificação de pH intestinal, foi verificado se a inibição da anidrase carbônica influenciava na manutenção do pH normal do intestino (pH 6,0).

Para tanto, soluções tampão contendo ou não acetazolamida (inibidor específico da anidrase carbônica) foram introduzidas no tubo digestivo de fêmeas de 3 a 4 dias de idade nunca alimentadas antes, através da técnica da alimentação forçada, já descrita no **item 4.5.1**. Foram feitos dois tipos de experimento para verificar o efeito da acetazolamida na alcalinização e na acidificação do intestino médio. Tais experimentos são descritos a seguir, nos **itens 4.6.1 e 4.6.2**.

4.6.1 - Verificação do efeito da inibição da atividade da anidrase carbônica na alcalinização do intestino médio

No segundo tipo de experimento, verificamos se a inibição da anidrase carbônica também impediria a alcalinização de soluções tamponadas de pH 5,0 até o pH 6,0. Assim

como no primeiro tipo de experimento as fêmeas (65 no total) foram divididas em dois grupos, sendo que um grupo foi alimentado com solução tampão MES (pKa 6,21) 160 mM; púrpura de bromocresol 0,1% pH 5,0 + acetazolamida em concentração final de 1,0mM, enquanto o outro grupo (controle) recebeu a mesma solução, mas sem o inibidor acetazolamida. O pH no intestino médio das fêmeas alimentadas com as soluções foi medido como descrito no **item 4.5.2**, comparando-se a cor observada no intestino com as soluções padrão do corante púrpura de bromocresol.

4.6.2 - Verificação do efeito da inibição da atividade da anidrase carbônica na acidificação do intestino médio

No primeiro tipo de experimento, verificamos se a inibição da atividade da anidrase carbônica impediria a acidificação de soluções tamponadas de pH 7,5 até o pH 6,0. Cinquenta e sete fêmeas foram divididas em dois grupos, sendo que um grupo foi alimentado com solução tampão HEPES (pKa 7,66) 160 mM; azul de bromotimol 0,1% pH 7,5 + acetazolamida em concentração final de 1,0mM, enquanto o outro grupo (controle) recebeu a mesma solução tampão, mas sem o inibidor acetazolamida. O pH no intestino médio das fêmeas alimentadas com as soluções foi medido como descrito no **item 4.5.2**, comparando-se a cor observada no intestino com as soluções padrão do corante azul de bromotimol.

Em ambos os experimentos citados nos itens **4.6.1** e **4.6.2**, os pHs medidos nos intestinos na presença e na ausência do inibidor foram comparados através do Teste de proporções de Fisher.

4.7 - Verificação da presença de atividade da anidrase carbônica no intestino médio de *L. longipalpis* durante a digestão do repasto sanguíneo

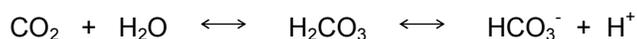
Para tentar detectar atividade de anidrase carbônica no intestino médio de *L. longipalpis*, fêmeas de 3 a 4 dias de idade fizeram o repasto sanguíneo em hamsters anestesiados com 0,3 mL de Thiopental®. Para evitar a contaminação das amostras com anidrase carbônica do sangue do hamster, os experimentos com os intestinos foram feitos 30 horas após o repasto sanguíneo, ao final da digestão, quando muito provavelmente as proteínas do sangue estavam mais degradadas, e não havia mais atividade de anidrase carbônica exógena que pudesse contaminar a amostra. Em cada experimento, os intestinos médios foram dissecados sob microscópio estereoscópico, lavados com solução salina (para retirar todo o conteúdo intestinal), e posteriormente transferidos para H₂O destilada (4 intestinos por amostra de 50 µL). Os intestinos em H₂O destilada foram rompidos por congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, e após homogeneização por agitação leve, as amostras foram testadas para a atividade de anidrase carbônica no espectrofotômetro. O mesmo procedimento foi realizado com intestinos de fêmeas alimentadas somente com sacarose, para fins de comparação. Como controle positivo, foi utilizado sangue humano 2,0% (no qual existe atividade de anidrase carbônica), e como controle negativo, H₂O destilada pura foi testada no lugar da amostra. O ensaio enzimático da anidrase carbônica foi feito adicionando os reagentes como indicado no quadro a seguir (**quadro 1**):

Quadro 1 - *Ensaio enzimático da anidrase carbônica* (adaptado do trabalho de Terra *et al.*, 1988)

| | Intestinos de fêmeas alimentadas com sangue | Intestinos de fêmeas alimentadas com sacarose | Controle negativo | Controle positivo |
|---|---|---|-------------------|-------------------|
| Tampão HEPES 16 mM + Azul de Bromotimol 0,003% pH 8,3 | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL |
| Amostra (4,0 intestinos) | 50 µL | 50 µL | - | - |
| H ₂ O destilada | - | - | 50 µL | - |
| Sangue humano 2,0% | - | - | - | 50 µL |
| H ₂ O saturada com CO ₂ | 500 µL | 500 µL | 500 µL | 500 µL |

A água saturada com gás carbônico utilizada nos experimentos foi obtida através da adição de uma pedra de gelo seco a uma pequena quantidade de água destilada, mantida em recipiente fechado.

As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 616nm na temperatura de 15 °C, de modo a medir a velocidade da seguinte reação, catalisada pela anidrase carbônica:



Esta reação ocorre quando adicionamos água saturada com gás carbônico à solução HEPES - azul de bromotimol, na presença das amostras. A acidificação gerada pela reação ocasiona uma mudança da cor da solução, uma vez que o indicador de pH azul de bromotimol é convertido da cor azul para a cor amarela. Quando havia anidrase carbônica catalisando a reação, a absorvância diminuía mais rapidamente do que quando a enzima não estava presente.

Após padronização da metodologia, foram feitos cinco ensaios, incluindo os ensaios com intestinos médios de fêmeas durante a digestão de sangue, e os de fêmeas sem repasto sanguíneo (que foram feitos separadamente). Para cada amostra, e cada controle destes ensaios, foram feitas 4 réplicas. As análises foram feitas comparando-se a velocidade de diminuição de absorvância entre as diferentes amostras e controles, através do teste t de Student.

4.8 - Verificação da ocorrência de expressão de genes para a anidrase carbônica nas células do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* sem repasto sanguíneo através de RT – PCR (“Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction”)

4.8.1 - Extração de RNA do intestino de *Lutzomyia longipalpis*

Foram dissecadas 25 fêmeas de quatro dias de idade alimentadas somente com sacarose. Os intestinos médios foram abertos e lavados em solução salina 0,9% e imediatamente transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5mL mantidos em gelo, na presença do tampão de eluição que contem tiocianato de guanidina acrescido de mercaptoetanol. A extração foi feita na coluna do “Kit” RNeasy Micro (Qiagen[®], USA) conforme o protocolo recomendado pelo fabricante.

Ao final da extração, o RNA obtido foi eluído em 16µL de água Milli-Q e estocado a -80°C por 24 horas. O “kit” RNeasy Micro foi escolhido porque é bastante eficiente na extração de RNA a partir de pequenas quantidades de tecido.

4.8.2 - Síntese de cDNA usando oligo dT

O cDNA foi sintetizado utilizando-se iniciadores oligo dT, porque estes, compostos de vários nucleotídeos de timina se alinham com a cauda “poli-A” presente exclusivamente no RNA mensageiro de eucariotos, e ausente no RNA de bactérias. Isso foi feito para evitar a síntese de DNA bacteriano, que poderia estar presente na amostra com os intestinos das fêmeas.

Num tubo de microcentrífuga de 0,5mL, foi adicionado 1,0µL do oligo dT à amostra de RNA (16 µL), e a mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos. Após adição da mistura contendo: 1,0µL da transcriptase reversa (M-MLV RT) (200 U/µL); 5,0µL de tampão para a enzima M-MLV RT e 2,0µL de DNTPs (10mM), a amostra foi incubada a 42°C por 60 minutos e a 70°C por 15 minutos. O cDNA obtido foi estocado a -20°C. Todos os reagentes utilizados na mistura são da Promega ®. Os 16 µL de solução contendo RNA utilizados foram suficientes para sintetizar a quantidade necessária de cDNA. A dosagem da quantidade exata de RNA não foi feita, para evitar o gasto e a manipulação excessiva do RNA obtido na extração.

4.8.3 - PCR (“Polimerase Chain Reaction”)

Como ainda não há no “Gene Bank”, nenhuma seqüência para anidrase carbônica de *L. longipalpis*, os iniciadores direto (5’ cag gac gag tac ttt agc tgc ga 3’) e reverso (5’cgc ccg tgt aga tat cga acc a 3’) utilizados neste trabalho foram desenhados a partir de uma seqüência desta enzima presente em *Anopheles gambiae* (nº de acesso: XM 563117) que

apresenta alta homologia com seqüências de anidrase carbônica de *Drosophila melanogaster*. Tal homologia foi verificada através do programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”).

A temperatura de anelamento para os iniciadores desenhados foi calculada em 57°C, utilizando o programa BioMath Calculators da Promega (<http://www.promega.com/biomath>)

Na reação de amplificação foram utilizados 0,8µL do par de iniciadores para a seqüência da anidrase carbônica (1,8 x 10⁻³ nanogramas do iniciador direto e 2,7 x 10⁻³ nanogramas do iniciador reverso), e 1,0µL do cDNA de *L. longipalpis*. Como controles positivos para a PCR, foram utilizados três pares de iniciadores (0,8µL de cada par) para as seqüências da Poly-ubiquitina e da β-actina, que são expressas constitutivamente na maioria dos insetos, e da Rp UGalt, um gene para proteína intracelular constitutiva, encontrado em *Rhodnius prolixus* por Ribeiro *et al.* (2004). Os outros reagentes da PCR (“Kit” para PCR, Phoneutria ®) foram utilizados nas seguintes quantidades:

-0,2µL de Taq polimerase

-2,0µL do tampão da enzima Taq polimerase

-2,0µL de MgCl₂ (50mM)

- 1,0µL de dNTP (10mM)

Quatro microtubos de 0,2 mL, cada um deles com um par de iniciadores, os reagentes do “kit” e a água Milli-Q (totalizando 20µL por microtubo) foram acondicionados no termociclador PTC-100 ®, MJ Research, programado para as seguintes

temperaturas: 94°C por 10 minutos, 35 ciclos de 94°C, 57°C e 72°C, e finalmente, 72°C por 7 minutos. Para a visualização dos resultados, 5,0µL dos materiais amplificados obtidos na PCR foram aplicados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, e corridos em eletroforese a 120 Volts. As bandas encontradas no gel foram comparadas com as bandas do padrão de peso molecular “100bp DNA marker” ®, Promega (4,0µL aplicados no gel).

4.8.4 - Controle positivo para os iniciadores do gene da anidrase carbônica e verificação da presença de seqüência(s) para a enzima no DNA de *Lutzomyia longipalpis*

Para nos certificarmos do funcionamento do par de iniciadores desenhados a partir da seqüência de *A. gambiae*, estes foram testados numa PCR com DNA do próprio *A. gambiae*, gentilmente cedido pelo Dr. Luciano A. Moreira do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ. Para saber se no DNA de *L. longipalpis* existia alguma seqüência para a anidrase carbônica (sendo expressa ou não), foi utilizado o DNA genômico de quatro fêmeas alimentadas somente com sacarose na mesma PCR. O DNA de *L. longipalpis* foi extraído destas fêmeas (após retirada da cabeça, das cerdas e das patas) com fenol-clorofórmio (TRIZOL ®, Invitrogen, USA) conforme recomendações do fabricante. A PCR com os DNAs de *A. gambiae* e *L. longipalpis* foi realizada nas mesmas condições citadas no **item 4.8.3** e os resultados foram visualizados através de eletroforese do material obtido em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio.

4.9 - Verificação do papel do transporte diferencial de fosfato na acidificação do pH no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem repasto sanguíneo

Em estudos preliminares, observamos que soluções fosfato de potássio pH 7,5 (em concentrações de 1,0 a 20mM) introduzidas no tubo digestivo de fêmeas de *L. longipalpis* sem repasto sanguíneo são prontamente acidificadas no intestino médio, alcançando pH 6,0 (dados não publicados).

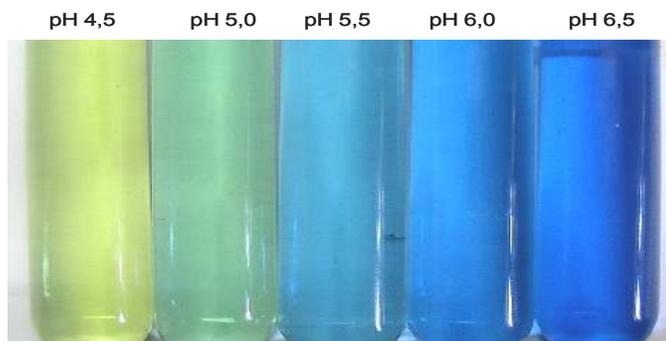
Para verificarmos se esta acidificação ocorria devido a um transporte diferencial de íons fosfato (transporte preferencial do íon HPO_4^{-2}), introduzimos no tubo digestivo das fêmeas, soluções de fosfato de potássio (pKa 7,2), ou HEPES (pKa 7,66) 40mM. Se a acidificação no intestino fosse dependente do transporte diferencial de íons fosfato, esperaríamos que a acidificação ocorresse somente nos insetos que ingerissem solução contendo íons fosfato.

Os experimentos foram conduzidos da seguinte forma: soluções de fosfato de potássio e HEPES, ambas a 40mM e com pH inicial 7,5 contendo o indicador de pH azul de bromotimol (pKa 7,0) 0,1% ou o indicador verde de bromocresol (pKa 4,6) 0,1% foram introduzidas no tubo digestivo de 26 fêmeas de 3 a 4 dias de idade mantidas sem nenhum tipo de alimento, através de alimentação forçada, descrita no **item 4.5.1**. Utilizamos dois corantes com pKas tão diferentes para garantir que as medidas de pH cobrissem uma ampla faixa de pH (pHs 4,5 a 8,5 fazendo-se a interseção dos dois corantes)

Cinco minutos após a alimentação forçada, o tubo digestivo de cada fêmea era dissecado sob microscópio estereoscópio. Os pHs alcançados no intestino médio, e também no divertículo esofágico foram medidos visualmente, comparando-se a cor adquirida pela

solução tampão ingerida, com as cores de soluções-padrão do azul de bromotimol (**figura 6.A**) e do verde de bromocresol em pHs conhecidos. As soluções-padrão para o verde de bromocresol são mostradas na **figura 8**.

Figura 8 - Cores das soluções padrão do verde de bromocresol em pHs conhecidos



As soluções-padrão do verde de bromocresol com pHs 4,0; 4,5 e 5,0 foram preparadas com o tampão acetato de sódio ($pK_a = 4,76$) a 0,05M e as soluções com pHs 5,5 e 6,0 continham o tampão MES ($pK_a 6,21$) à 0,05M. Estes tampões foram escolhidos de acordo com sua faixa de tamponamento, com o intuito de manter os pHs das soluções-padrão do corante sempre estável. Foram adicionados aproximadamente 0,5 miligramas do verde de bromocresol a estas soluções, quantidade suficiente para visualizar a cor adquirida pelo corante em cada pH. Depois de terem os pHs ajustados, as soluções-padrão foram acondicionadas em tubos de ensaio, receberam 3 gotas de clorofórmio para evitar o desenvolvimento de microorganismos, e foram lacradas com rolhas de borracha. Dessa forma, foi possível utilizar estas soluções como padrão para os corantes durante vários meses.

5 - RESULTADOS

5.1 - Medida do pH no intestino médio abdominal e no intestino médio torácico de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* com repasto sanguíneo

5.1.1 - Medida do pH do intestino médio abdominal em fêmeas com repasto sanguíneo

O **quadro 2** mostra um exemplo de como foram feitas as calibrações dos microeletrodos, medindo o pH de soluções padrão de pHs conhecidos. Estas calibrações eram realizadas antes e depois de cada uma das medidas de pH no intestino médio abdominal. Tais calibrações foram feitas para todas as medidas de pH realizadas (cerca de 50).

Quadro 2 - Calibrações feitas antes e depois da medida de pH no intestino médio abdominal de uma fêmea de *Lutzomyia longipalpis*

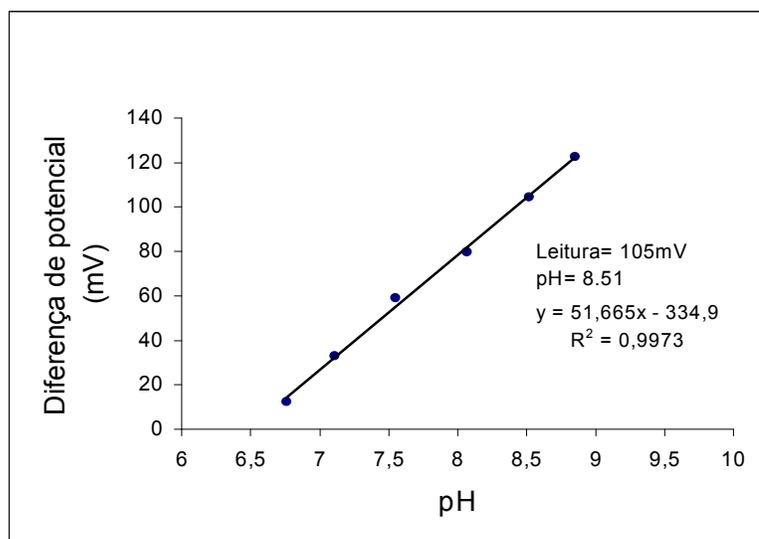
| pH da solução padrão | Calibração anterior à medida | | Calibração posterior à medida | |
|----------------------|--|---------------|--|---------------|
| | Medida correspondente em mV (média entre repetições) | Desvio padrão | Medidas correspondentes em mV (média entre repetições) | Desvio padrão |
| 6.76 | 12 | - | 13 | 1,4 |
| 7.11 | 33 | 2 | 32,8 | 1,8 |
| 7.55 | 58,8 | 1,8 | 59,3 | 3,2 |
| 8.07 | 80,3 | 1,8 | 79,5 | 0,5 |
| 8.52 | 105 | 2,1 | 104 | 1 |
| 8.85 | 124 | - | 121,2 | 1,8 |

Fazendo as médias das calibrações anterior e posterior à medida de pH no intestino (**quadro 2**), obtivemos os dados reunidos no **quadro 3** a seguir:

Quadro 3 - Médias entre as calibrações anterior e posterior à medida do pH no intestino médio abdominal de *Lutzomyia longipalpis*

| pH da solução padrão | Média das Medidas em mV | Desvio padrão |
|----------------------|-------------------------|---------------|
| 6.76 | 12,5 | 0,71 |
| 7.11 | 32,9 | 0,2 |
| 7.55 | 59 | 0,3 |
| 8.07 | 79,9 | 0,5 |
| 8.52 | 104,5 | 0,71 |
| 8.85 | 122,8 | 1,8 |

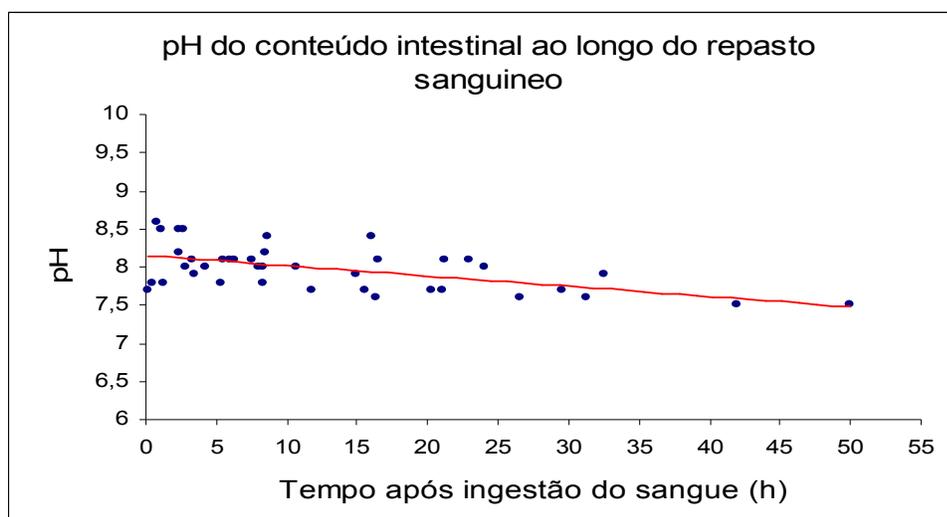
Figura 9 - Curva de calibração dos microeletrodos, relacionando a média das medidas em milivolts com o valor do pH das soluções padrão (**quadro 3**)



A leitura obtida com os microeletrodos no intestino da fêmea deste exemplo foi 105mV, 2 horas e 40 minutos após o repasto sanguíneo (**figura 9**). Esta medida foi convertida em unidades de pH através da equação obtida pela regressão linear mostrada na figura. O valor de pH encontrado neste exemplo foi de 8,51.

Foram realizadas medidas de pH como esta do exemplo em aproximadamente 50 fêmeas, em horários que variaram de 0 a 50 horas após o repasto sanguíneo. Isso foi feito para verificar o pH durante todo o processo de digestão do sangue, que dura aproximadamente 50 horas em *L. longipalpis*. Para uma maior confiabilidade das medidas obtidas, foram excluídos todos os experimentos nos quais a variação entre as calibrações dos microeletrodos antes e depois da introdução no intestino superou 5% (**quadro 2**). A partir dos resultados selecionados por este critério, construiu-se um gráfico que representa a variação do pH intestinal em fêmeas de flebotomíneos ao longo da digestão do sangue. A curva deste gráfico está representada na **figura 10**.

Figura 10 - pH do conteúdo do intestino médio abdominal de *Lutzomyia longipalpis* durante a digestão sanguínea



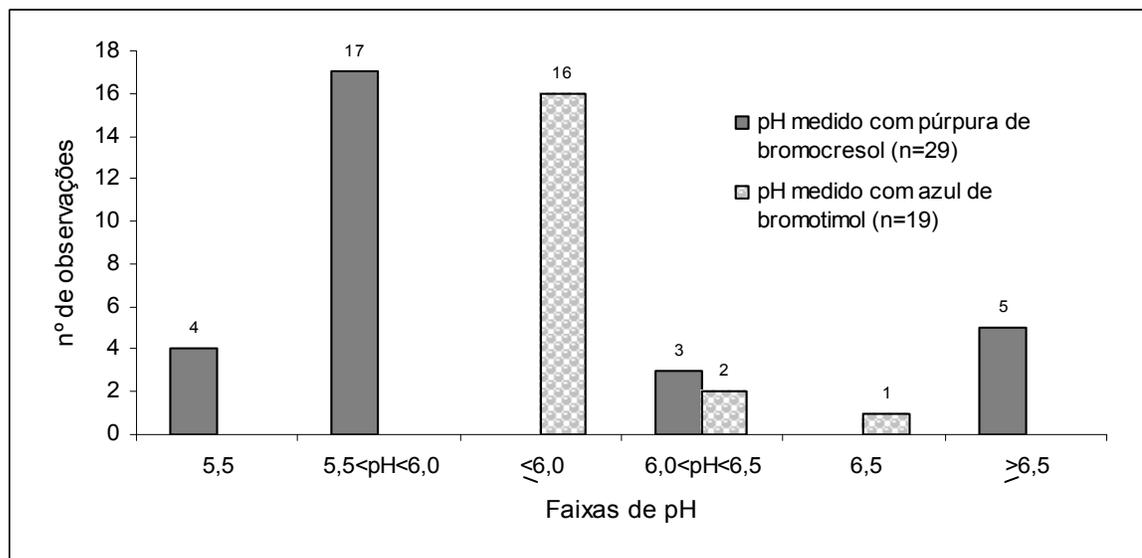
Na curva do gráfico da **figura 10**, cada ponto representa uma única medida de pH num determinado período após o repasto sanguíneo. A linha vermelha é a reta resultante da regressão linear (equação mostrada no gráfico), e permite o cálculo do pH médio em vários períodos após o repasto sanguíneo.

De acordo com estes resultados, nas primeiras horas após o repasto, o pH intestinal pode alcançar valores superiores a pH 8,0 e este valor tende a diminuir gradativamente, chegando até pH 7,5, a medida em que se aproxima o final da digestão.

5.1.2 - Medidas de pH no intestino médio torácico em fêmeas com repasto sanguíneo

Foram realizadas medidas de pH em 48 intestinos médios torácicos de fêmeas que haviam realizado o repasto sanguíneo, e se alimentaram com corantes vitais em solução de sacarose. As medidas obtidas estão resumidas na **figura 11**.

Figura 11 - pH no intestino médio torácico de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com sangue e sacarose entre 24 e 27 horas após repasto sanguíneo



Observando a faixa de pH mais freqüente com cada um dos corantes no gráfico da **figura 11**, inferimos que o pH do intestino médio torácico de fêmeas durante a digestão da sacarose e do repasto sanguíneo permanece entre 5,5 e 6,0.

5.2 - Distribuição da atividade da α -glicosidase no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem o repasto sanguíneo

Para verificar a distribuição da atividade da α -glicosidase no intestino médio, as duas porções (torácica e abdominal) de cada intestino foram ensaiadas, par a par, com um substrato sintético da enzima, e foram feitas leituras das absorvâncias no espectrofotômetro.

O **quadro 4** mostra as atividades da enzima α -glicosidase na porção torácica e na porção abdominal de cada uma das fêmeas investigadas.

Quadro 4 - Atividade da α - glicosidase em intestino médio torácico e intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* não alimentadas com sangue

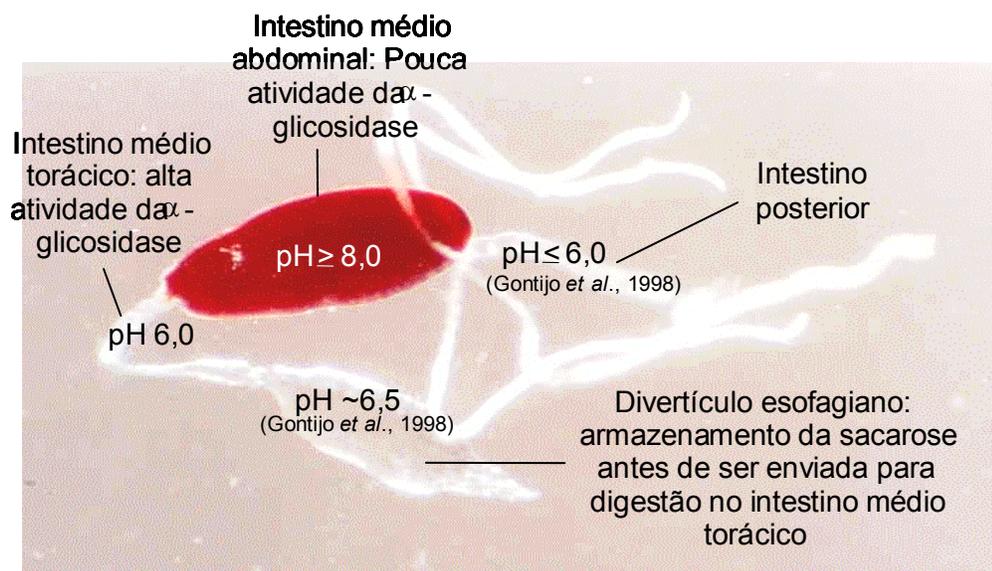
| Fêmea | Atividade nos intestinos médios torácicos * | Atividade nos intestinos médios abdominais * |
|---|---|--|
| 1 | 1.675 | 0.708 |
| 2 | 1.260 | 0.610 |
| 3 | 2.765 | 1.062 |
| 4 | 1.945 | 0.440 |
| 5 | 2.065 | 0.536 |
| 6 | 1.375 | 0.424 |
| 7 | 1.090 | 0.182 |
| 8 | 2.060 | 0.460 |
| 9 | 0.730 | 1.386 |
| 10 | 1.955 | 0.426 |
| 11 | 2.495 | 0.762 |
| 12 | 2.300 | 0.636 |
| 13 | 1.670 | 0.450 |
| 14 | 1.690 | 0.346 |
| 15 | 2.020 | 0.790 |
| Média \pm desvio padrão | 1,806 \pm 0,532 | 0,610 \pm 0,301 |

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

Comparando-se a média das atividades da α - glicosidase no **quadro 4**, verificou-se que a atividade desta enzima no intestino médio torácico foi 2,93 vezes maior do que a atividade no intestino médio abdominal ($p < 0,001$, teste t de Student). Sabendo-se que a α -glicosidase é uma enzima de membrana (está ligada às células do intestino), e considerando-se que a área do intestino médio abdominal é pelo menos 4,8 vezes maior do que a área do intestino médio torácico, essa diferença de atividade se torna mais acentuada. Ou seja, a atividade da α - glicosidase no intestino médio torácico é aproximadamente 14 vezes (2,93 x 4,8) maior (por unidade de área) do que no intestino médio abdominal.

A **figura 12** resume a relação existente entre os pHs observados no intestino médio com a distribuição da atividade da α -glicosidase, que tem pH ótimo próximo a 6,0.

Figura 12 - pHs e distribuição da enzima α -glicosidase nas porções torácica e abdominal do intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* após repasto sanguíneo.



5.3 - Papel da volatilização do dióxido de carbono (CO_2) no processo de alcalinização do intestino médio abdominal de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com sangue

As medidas de pH no intestino de fêmeas alimentadas com sangue degaseificado (pobre em CO_2) foram feitas entre zero e 5 horas (4 medidas), ou entre 21 e 26 horas após o repasto sanguíneo (3 medidas). Buscamos fazer tais medidas nas primeiras horas de digestão do repasto sanguíneo, porque esse é o período no qual o pH do sangue normal, rico em CO_2 , alcança os valores mais altos no intestino do inseto. Também realizamos medidas de pH numa fase mais avançada da digestão do sangue, na qual o pH do conteúdo intestinal tende a diminuir um pouco (ver **figura 10**) a fim de compararmos os dados nestas duas condições.

A **tabela 1** mostra os pHs do sangue degaseificado (pobre em CO₂) antes de ser ingerido e os pHs alcançados por este mesmo sangue no intestino dos flebotomíneos, e a variação de pH observada.

Tabela 1 - *pHs alcançados pelo sangue pobre em CO₂ no intestino médio abdominal de fêmeas de Lutzomyia longipalpis*

| Intervalo de tempo após ingestão do sangue | pH inicial do sangue pobre em CO₂ (valor ajustado com adição de ácido) | pH alcançado pelo sangue no intestino | Δ pH (pH no intestino - pH inicial) |
|---|--|--|--|
| 0 a 5h após a ingestão do sangue | 6,64 | 7,15 | 0,51 |
| | 6,57 | 7,3 | 0,73 |
| | 7,0 | 7,7 | 0,70 |
| | 6,72 | 7,57 | 0,85 |
| média ± desvio padrão (n = 4) | 6,73 ± 0,16 | 7,43 ± 0,21 | 0,70 ± 0,12 |
| 21 a 26h após a ingestão do sangue | 6,57 | 7,54 | 0,97 |
| | 7,0 | 7,86 | 0,86 |
| | 7,0 | 7,62 | 0,62 |
| média ± desvio padrão (n = 3) | 6,86 ± 0,2 | 7,67 ± 0,14 | 0,82 ± 0,15 |

Quando as fêmeas se alimentam diretamente no hamster, o sangue ingerido é rico em CO₂ e tem um pH inicial igual a pH 7,4. A partir dos dados brutos de monitoramento de pH (**figura 10**), foram feitas médias dos pHs alcançados pelo sangue rico em CO₂ (sangue normal) no intestino médio, e também médias das variações de pH sofridas pelo sangue no

interior do intestino (entre zero e 5 horas - 9 medidas, ou entre 21 e 26 após o repasto sanguíneo - 3 medidas). Os dados obtidos estão reunidos na **tabela 2**, a seguir:

Tabela 2 - *pHs alcançados pelo sangue rico em CO₂ no intestino médio abdominal de fêmeas de Lutzomyia longipalpis*

| Intervalo de tempo após ingestão do sangue | pH inicial do sangue rico em CO ₂ | pH alcançado pelo sangue no intestino | Δ pH (pH no intestino - pH inicial) |
|--|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 0 a 5h após o a ingestão do sangue | - | 8,5 | 1,1 |
| | - | 7,8 | 0,7 |
| | - | 8,5 | 1,1 |
| | - | 8,2 | 0,8 |
| | 7,4* | 8,5 | 1,1 |
| | - | 8,0 | 0,6 |
| | - | 8,1 | 0,7 |
| | - | 7,9 | 0,5 |
| | - | 8,0 | 0,6 |
| média ± desvio padrão (n = 9) | - | 8,16 ± 0,26 | 0,80 ± 0,23 |
| 21 a 26h após ingestão do sangue | - | 8,1 | 0,7 |
| | 7,4* | 8,1 | 0,7 |
| | - | 8,0 | 0,6 |
| (média ± desvio padrão) (n = 3) | - | pH 8,07 ± 0,047 | 0,66 ± 0,05 |

* pH fisiológico do sangue de mamíferos considerado (não medido)

Quando analisamos a **tabela 1** observamos que o sangue pobre em CO₂ partiu de um pH $6,73 \pm 0,16$ e foi alcalinizado para pH $7,43 \pm 0,21$ nas primeiras 5 horas após a ingestão do sangue. Entre 21 e 26 horas após o repasto, o pH aumentou de pH $6,86 \pm 0,2$ para pH $7,67 \pm 0,14$. Já o sangue rico em CO₂ que partia sempre do pH 7,4 sofreu alcalinização para pH $8,16 \pm 0,26$ nas primeiras cinco horas, e foi para pH $8,07 \pm 0,047$ entre 21 e 26 horas após o repasto sanguíneo (**tabela 2**).

Comparando os aumentos de pH nos dois casos, podemos ver que a amplitude destas variações de pH (Δ pH), tanto entre zero e 5 horas, como também entre 21 e 26 horas após a ingestão do sangue não apresentou diferenças significativas ($p = 0,32$ e $p = 0,23$, respectivamente, teste t de Student).

O pH do sangue degaseificado que ficou exposto ao ar, medido no mesmo momento em que foi feita a medida dentro do intestino, sofreu variação mínima (aumentou $0,074 \pm 0,03$ unidades de pH), variação esta, muito menor do que a observada no intestino médio ($0,75 \pm 0,16$ unidades de pH), com $p = 0,0001$ (teste t de Student). Isso foi feito para podermos comparar o comportamento do sangue pobre em CO₂ dentro e fora do intestino do flebotômico.

5.4 - Ocorrência de manutenção ativa do pH 6,0 no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem o repasto sanguíneo

As **figuras 13** e **14** mostram os pHs alcançados pelas soluções tampão MES e HEPES, em diferentes concentrações no interior do intestino médio e no divertículo das fêmeas examinadas. Foram examinadas 40 fêmeas que ingeriram o MES e 17 fêmeas que

ingeriram o HEPES. Calculando-se os percentuais de ocorrência das faixas de pH com os dois tampões, notamos que não houve diferença na distribuição dos percentuais ao longo das faixas de pH quando aumentamos as concentrações do HEPES e do MES de 40 para 80mM. Assim, os dados para as duas concentrações dos tampões foram todos reunidos indistintamente nos gráficos das figuras.

Figura 13 - *Freqüência de pHs observada no tubo digestivo de fêmeas de Lutzomyia longipalpis após a ingestão forçada do tampão MES a 40mM ou 80mM pH 5,0*

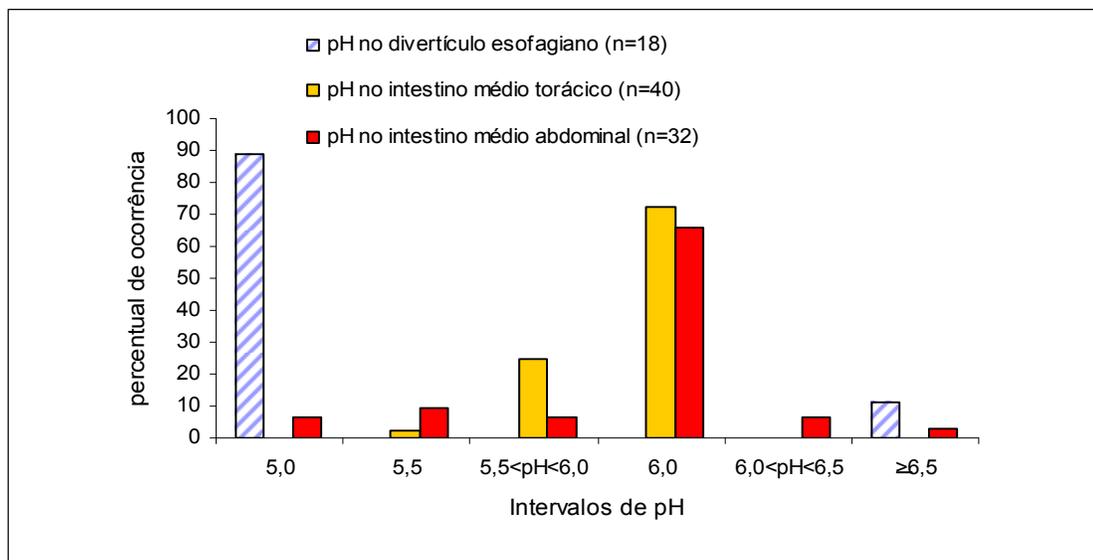
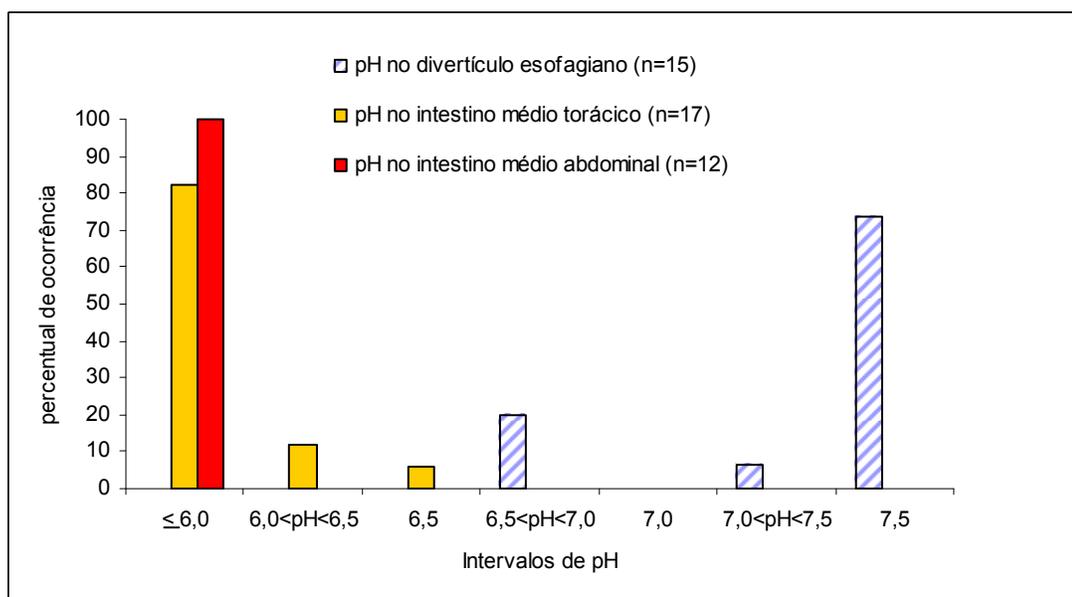


Figura 14 - *Freqüência de pHs observada no tubo digestivo de fêmeas de Lutzomyia longipalpis após a ingestão forçada do tampão HEPES a 40mM ou 80mM pH 7,5*



Observando os gráficos das **figuras 13 e 14**, fica evidente que as soluções MES e HEPES, mesmo tamponadas, sofreram intensa alcalinização e acidificação, respectivamente, alcançando o pH 6,0. Tal ajuste do pH inicial para pH 6,0 foi observado na maioria dos intestinos médios examinados, tanto na porção torácica quanto na porção abdominal. O ajuste de pH 7,5 para pH 6,0 se mostrou mais eficiente do que o ajuste de pH 5,0 para pH 6,0.

No divertículo esofágico, a solução MES manteve o pH 5,0, e a solução HEPES manteve o pH 7,5 em quase todas as fêmeas examinadas, ou seja, as soluções-tampão praticamente não sofreram alteração do pH inicial neste local.

5.5 - Efeito da acetazolamida, inibidor da atividade da anidrase carbônica, no mecanismo ativo de controle do pH do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem o repasto sanguíneo

Foi testado se a inibição da anidrase carbônica pela acetazolamida era capaz de impedir ou de diminuir a alcalinização de soluções altamente tamponadas no intestino médio. Foram feitas várias medidas dos pHs alcançados por estas soluções nas diferentes partes do tubo digestivo. As **figuras 15 e 16** mostram os valores de pH encontrados no divertículo, no intestino médio torácico e no intestino médio abdominal de 57 fêmeas alimentadas com tampão MES pH 5,0. Destas, 35 receberam a solução MES somente com o corante, e 22 fêmeas receberam a solução MES com corante e com o inibidor acetazolamida.

Figura 15 - *Freqüência de pHs observada no intestino médio torácico e no divertículo esofágico de fêmeas de Lutzomyia longipalpis após a ingestão forçada de tampão MES 160mM pH 5,0 com e sem acetazolamida*

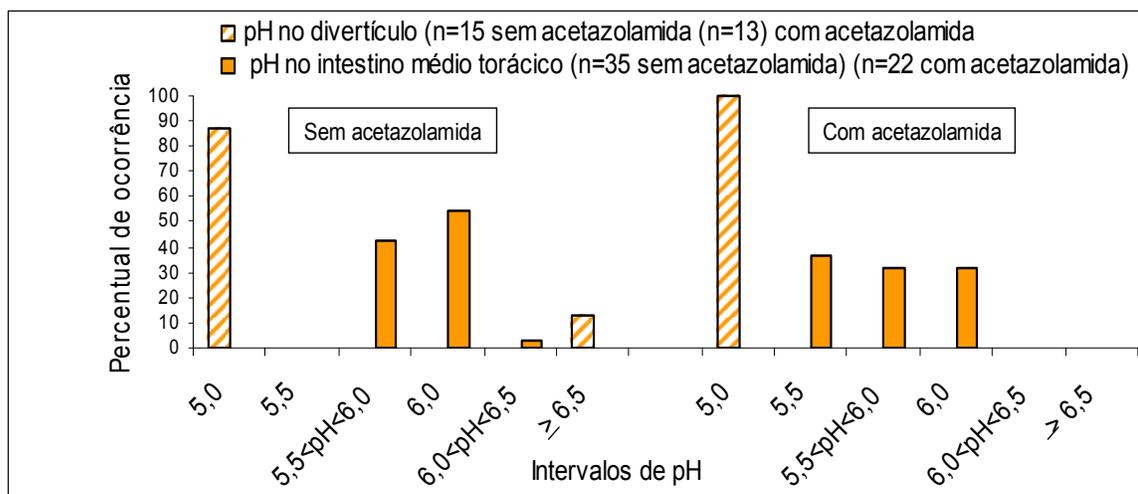
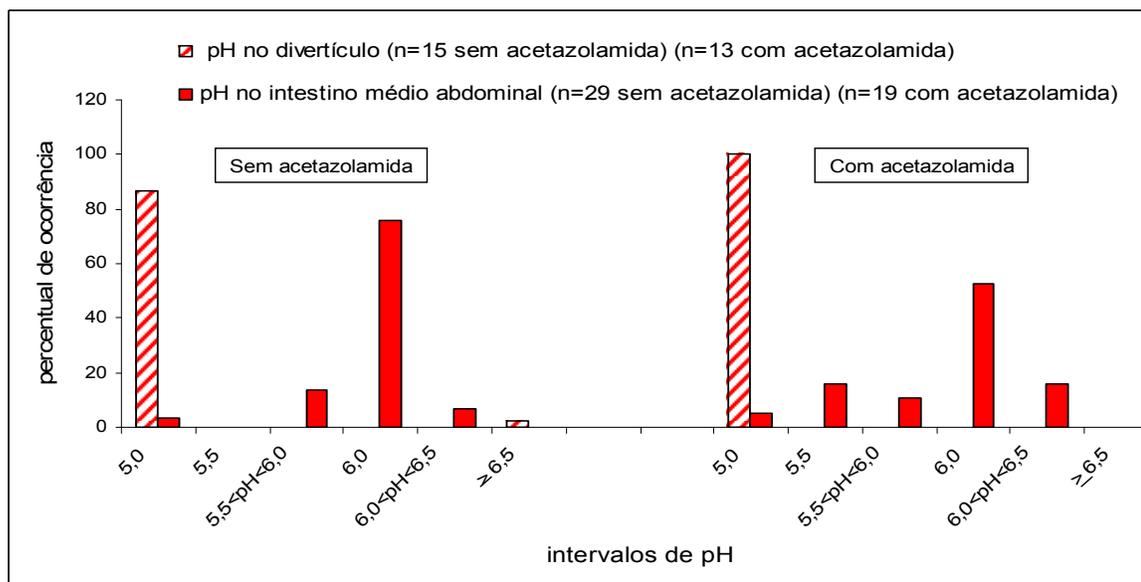


Figura 16 - *Freqüência de pHs observada no intestino médio abdominal e no divertículo esofágico de fêmeas de Lutzomyia longipalpis após a ingestão forçada de tampão MES 160mM pH 5,0 com e sem acetazolamida*



A **figura 15** mostra que os insetos tratados com acetazolamida alcalinizam o pH 5,0 do MES para pHs menores que 6,0 (alcalinização incompleta) no intestino médio torácico, na mesma proporção que os não tratados ($p = 0,101$, teste de Fisher). O mesmo comportamento foi observado no intestino médio abdominal ($p = 0,307$, teste de Fisher) (**Figura 16**). Parece que a inibição da anidrase carbônica tem pouca ou nenhuma influência na capacidade do intestino médio de alcalinizar a solução tampão MES. O pH da solução no divertículo esofágico se manteve em 5,0, na grande maioria dos casos, e na mesma proporção quando comparamos os controles (sem acetazolamida) e os testes (com acetazolamida), com $p = 1,000$ no teste de Fisher.

Foi testado também, se a inibição da anidrase carbônica pela acetazolamida era capaz de impedir ou de diminuir a acidificação de soluções altamente tamponadas no intestino médio. As **figuras 17 e 18** mostram os valores de pH no tubo digestivo de 65 fêmeas alimentadas com tampão HEPES pH 7,5. Destas, 37 foram alimentadas com solução tampão HEPES contendo somente o corante azul de bromotimol, e 28 com a solução HEPES contendo o corante mais o inibidor acetazolamida.

Figura 17 - *Frequência de pHs observada no intestino médio torácico e no divertículo de fêmeas de Lutzomyia longipalpis após a ingestão forçada de tampão HEPES 160mM pH 7,5 com e sem acetazolamida*

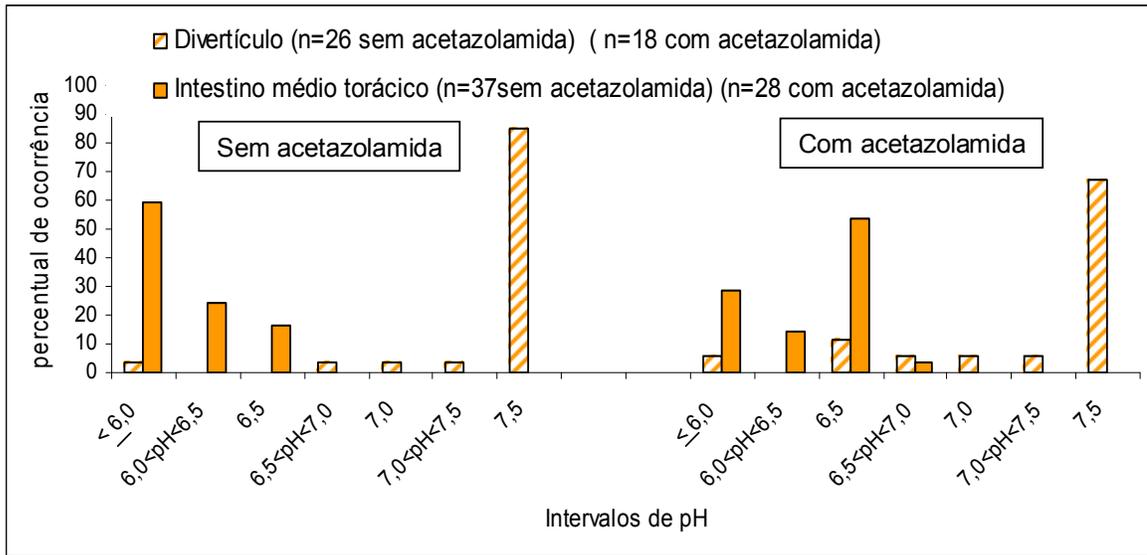
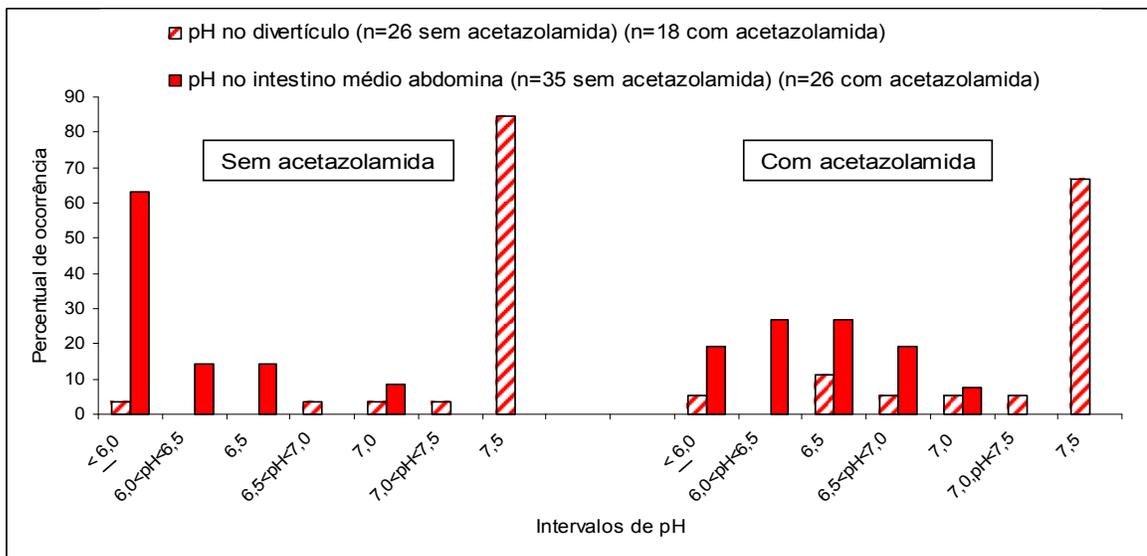


Figura 18 - *Frequência de pHs observada no intestino médio abdominal e no divertículo de fêmeas de Lutzomyia longipalpis após a ingestão forçada de tampão HEPES 160mM pH 7,5 com e sem acetazolamida*



Analisando os dados das **figuras 17 e 18**, notamos que a acidificação das soluções para pHs acima de 6,0 (acidificação incompleta) ocorre em maior proporção na presença da acetazolamida, do que quando o inibidor está ausente, tanto no intestino médio torácico quanto no intestino médio abdominal ($p = 0,023$ e $p = 0,0002$, respectivamente, teste de Fisher). Os pHs nas porções torácica e abdominal tendem a ficar mais próximos de 6,5 nos insetos tratados com o inibidor, e próximos de 6,0, no grupo controle. Ou seja, parece que a inibição da atividade da anidrase carbônica dificulta uma acidificação eficiente, capaz de diminuir o pH para 6,0, valor normalmente encontrado no intestino médio de fêmeas sem o repasto sanguíneo.

O pH da solução HEPES no divertículo esofágico se manteve próximo ao pH inicial (7,5) na grande maioria dos casos, e na mesma proporção quando comparamos os controles (sem acetazolamida) e os testes (com acetazolamida), com $p = 0,2726$, no teste de Fisher.

5.6 - Verificação da presença de atividade da anidrase carbônica no intestino médio de fêmeas *Lutzomyia longipalpis* durante a digestão do repasto sanguíneo

Uma vez que a inibição da anidrase carbônica parece provocar alterações na manutenção do pH intestinal de fêmeas sem o repasto sanguíneo, buscamos verificar se ocorre atividade desta enzima (responsável pela catálise na reação de formação do ácido carbônico) no intestino de fêmeas alimentadas e de fêmeas não alimentadas com sangue. A atividade da anidrase carbônica foi medida com quatro réplicas para cada tipo de amostra. Os resultados foram reunidos nos **quadros 5 e 6**.

Quadro 5 - Atividade da enzima anidrase carbônica no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas com sangue.

| Amostra | Velocidade de queda da absorvância (A . seg ⁻¹) | Desvio padrão (n = 4) (A . seg ⁻¹) |
|--|---|--|
| Água destilada (controle negativo) | -0.0037 | -0.00032 |
| Intestino de fêmeas alimentadas com sangue | -0.0038 | -0.00064 |
| Sangue humano 2% (controle positivo) | -0.0200 | -0.0042 |

Quadro 6 - Atividade da enzima anidrase carbônica no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* não alimentadas com sangue.

| Amostra | Velocidade de queda da absorvância (A . seg ⁻¹) | Desvio padrão (n = 4) (A . seg ⁻¹) |
|---|---|--|
| Intestino de fêmeas <u>não</u> alimentadas com sangue | -0.00556 | -0.00033 |
| Água destilada (controle negativo) | -0.00538 | -0.00060 |

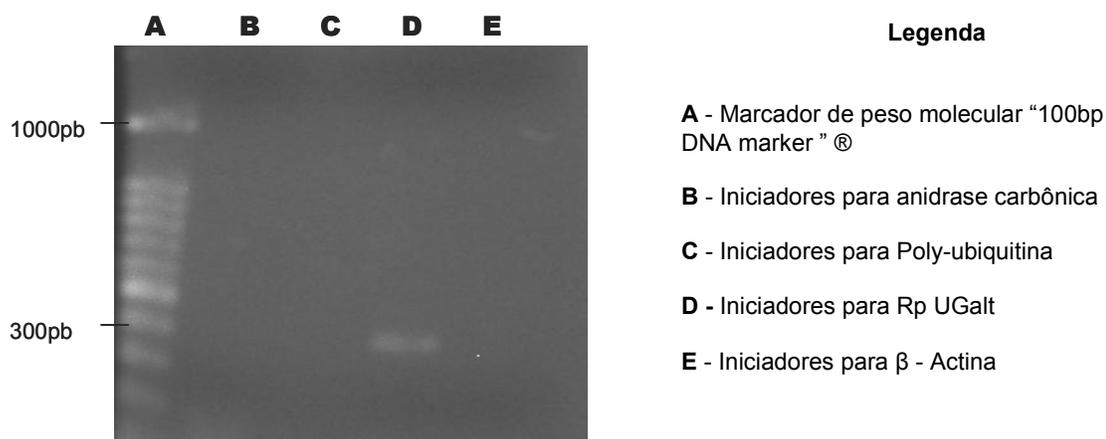
No **quadro 5**, as amostras com intestinos de fêmeas alimentadas com sangue mostraram taxa de queda da absorvância semelhante à taxa encontrada no controle negativo - água destilada ($p = 0,26$, teste t de Student), ou seja, não foi detectada atividade da anidrase carbônica no tubo digestivo das fêmeas por meio desta metodologia. O controle positivo mostra atividade de anidrase carbônica (queda mais rápida da absorvância). O

quadro 6 mostra que no intestino médio de fêmeas sem o repasto sanguíneo também não foi detectada a atividade da enzima, uma vez que as amostras com intestino apresentaram taxas de queda da absorvância muito semelhantes ao controle negativo ($p = 0,53$, teste t de Student).

5. 7- Verificação da expressão de anidrase carbônica nas células do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem repasto sanguíneo através de RT-PCR (“Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction”)

Como não foi possível detectar a atividade da anidrase carbônica através de espectrofotometria, uma outra metodologia foi utilizada na tentativa de detectar a presença da enzima. Foram desenhados iniciadores para tentar verificar, por meio de RT-PCR, a expressão de genes dessa enzima no intestino médio de fêmeas não alimentadas com sangue. O tamanho esperado para o produto da RT-PCR era de 451 pb.

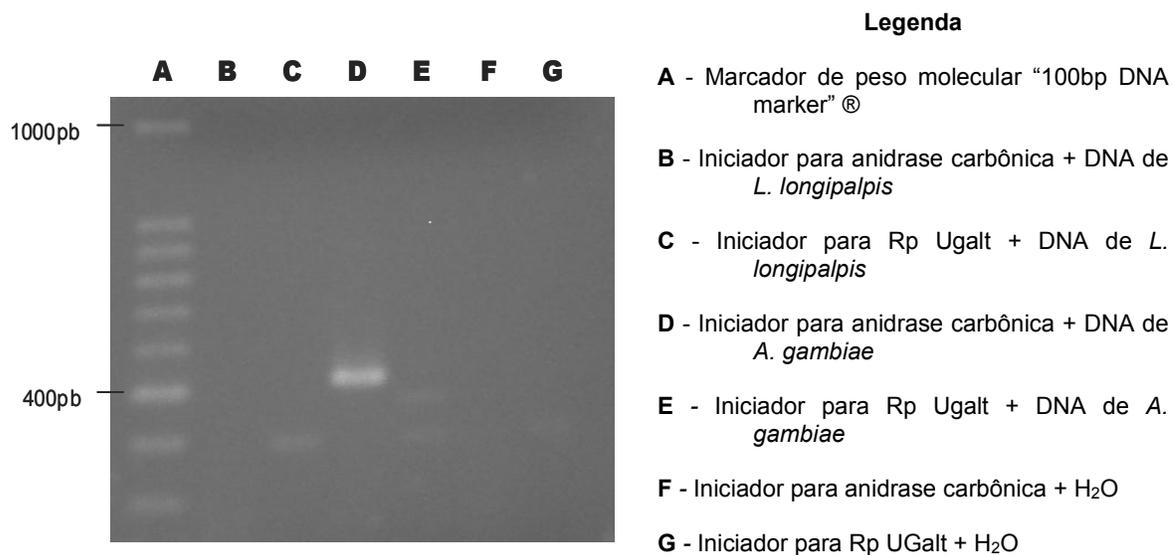
Figura 19 - *Produtos da RT-PCR com intestino de fêmeas de Lutzomyia longipalpis sem repasto sanguíneo, utilizando os iniciadores para anidrase carbônica de Anopheles gambiae*



Observando a fotografia do gel da **figura 19**, notamos que só houve amplificação do gene para Rp-UGalt (coluna D), que tem aproximadamente 350 pb. O iniciador para anidrase carbônica de *A. gambiae* não funcionou em *L. longipalpis*, provavelmente porque não há homologia suficiente entre as seqüências dos genes para a enzima dos dois insetos.

Para verificar o funcionamento do iniciador desenhado foi feito um controle, utilizando tal iniciador para tentar amplificar seqüências de DNA de *A. gambiae* e *L. longipalpis*, como mostra a **figura 20**, a seguir.

Figura 20 - Produtos da PCR com DNA de *Anopheles gambiae* e *Lutzomyia longipalpis* utilizando os iniciadores desenhados a partir de seqüências de anidrase carbônica de *A. gambiae*



O gel da **figura 20** mostra que houve amplificação do gene para a anidrase carbônica somente em *A. gambiae*, o que já era esperado, pois os iniciadores utilizados foram desenhados a partir de uma seqüência do DNA deste mosquito (coluna D). Entretanto, não ocorreu amplificação do gene para a enzima em *L. longipalpis* (coluna B),

mostrando que o DNA do flebotomíneo realmente não possui nenhuma seqüência homóloga à seqüência da anidrase carbônica de *A. gambiae*. Podemos notar que houve alguma amplificação para o gene Rp-UGalt em *L. longipalpis* (banda fraca na coluna C) o que serviu como controle positivo para funcionamento da PCR, uma vez que a expressão deste gene já havia sido observada no flebotomíneo através da RT-PCR (ver **figura 19**).

5.8 - Verificação do papel do transporte diferencial de um dos íons fosfato na acidificação do pH no intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sem repasto sanguíneo

Em testes preliminares, havíamos observado que soluções tamponadas com pHs próximos a pH 7,0 contendo fosfato de potássio eram prontamente acidificadas no intestino médio, alcançando pH 6,0. Para verificarmos se esta acidificação era devido a presença do fosfato, alimentamos um grupo de fêmeas com solução tampão fosfato de potássio 40mM pH 7,5, e como controle, alimentamos fêmeas com solução tampão HEPES 40mM pH 7,5 (ou seja, um outro tampão que não o fosfato). Os pHs alcançados pela solução fosfato são mostrados na **figura 21**, e os pHs alcançados pela solução HEPES, estão representados na **figura 22**.

Figura 21 – pHs no tubo digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após a ingestão forçada do fosfato de potássio a 40mM pH 7,5

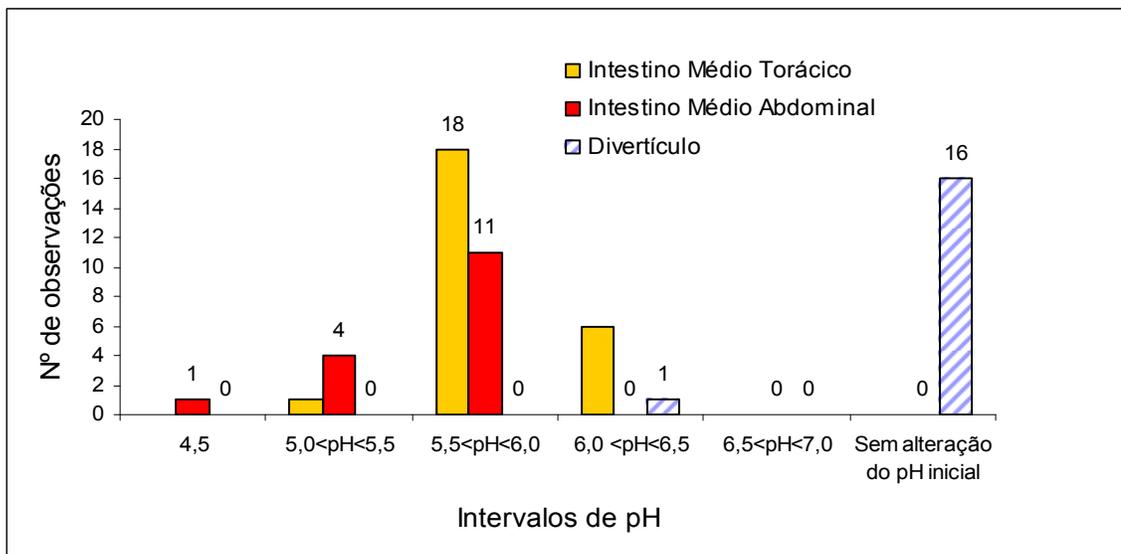
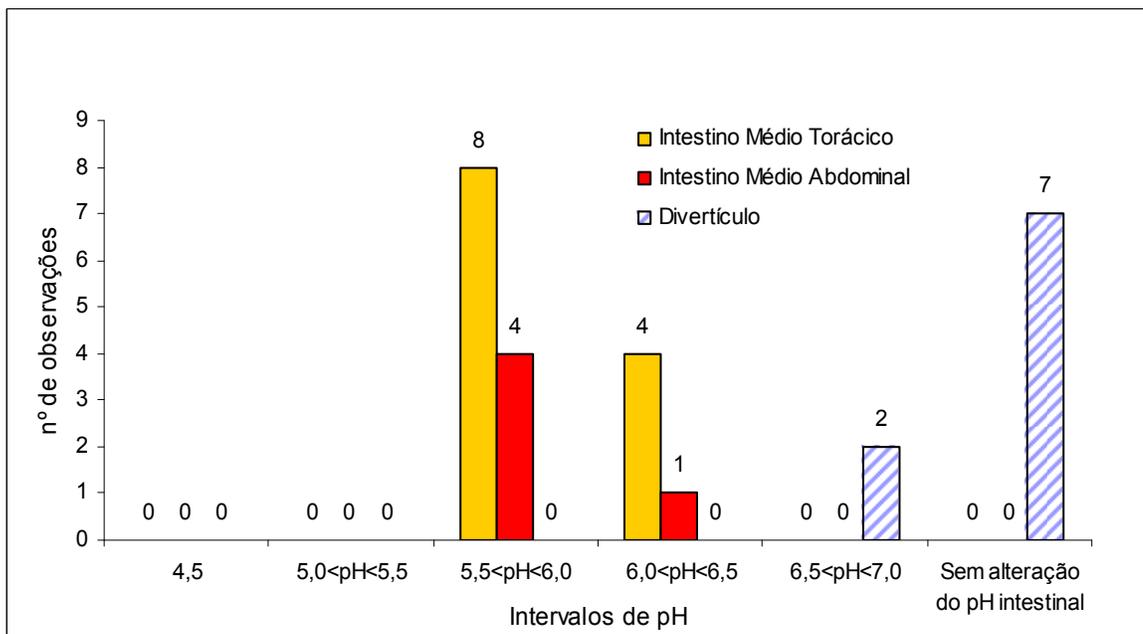


Figura 22 – pHs no tubo digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* após a ingestão forçada do tampão HEPES a 40mM pH 7,5



Os intervalos de pHs mostrados nos gráficos das **figuras 21 e 22** representam a união das faixas de pH observadas com os corantes azul de bromotimol e verde de bromocresol. Foram examinadas 26 fêmeas que ingeriram ou o tampão fosfato ou o tampão HEPES, ambos com pH inicial 7,5. Os gráficos mostram que as soluções dos dois tampões sofreram intensa acidificação no intestino médio abdominal e no intestino médio torácico, alcançando pHs entre 5,5 e 6,0 na grande maioria dos casos. Já no divertículo, não foi observada quase nenhuma alteração do pH inicial, nem com o fosfato, nem com o HEPES.

6 - DISCUSSÃO

Da literatura, pode-se citar alguns trabalhos a respeito de fatores que influenciam a reprodução e a diferenciação de *Leishmania* sp.: Melo (1982) e também Sacks e Perkins (1985) observaram que formas promastigotas de *Leishmania* sp. se multiplicam mais em pH neutro ou ligeiramente alcalino. Por outro lado, ocorre maior diferenciação das promastigotas em formas metacíclicas quando o cultivo é feito no pH 5,5 (Bates e Tetley, 1993; Zakai *et al.*, 1998). A acidificação do meio de cultura parece ser um dos principais estímulos que determinam a diferenciação de *Leishmania* sp. em cultivo (Bates e Tetley, 1993). Outro estímulo para a diferenciação do protozoário *in vitro*, que muito provavelmente deve ter um papel *in vivo*, é o esgotamento de nutrientes. Quando uma cultura “envelhece”, isto é, passa da fase logarítmica de crescimento para a fase estacionária, o número de formas metacíclicas também aumenta (Giannini, 1974). A presença de hemoglobina e/ou hemina, no meio de cultura, inibe a metaciclogênese de *Leishmania* sp. (Schlein e Jacobson, 1994; Charlab e Ribeiro, 1993; Charlab *et al.*, 1995). Muito provavelmente, estas substâncias que também são encontradas no sangue em digestão, têm um papel no controle da diferenciação do protozoário no tubo digestivo dos flebotomíneos.

Além dos estudos envolvendo os estímulos determinantes da metaciclogênese, têm sido feitos também alguns estudos relacionados aos processos digestivos que ocorrem no intestino médio de fêmeas de flebotomíneos, que se alimentam do sangue de vertebrados, e também de soluções açucaradas disponíveis na natureza. Para a digestão dos diversos tipos de proteínas presentes no repasto sanguíneo, o flebotomíneo necessita da atividade de

enzimas proteolíticas. A atividade de proteases já foi observada no intestino de flebotomíneos, e estas enzimas têm pHs ótimos de atividade entre pH 8,0 e pH 9,0 (Borovsky e Schlein, 1987; Mahmood e Borovsky, 1992; Mahmood e Borovsky, 1993; Dillon e Lane, 1993a). Com relação à digestão de açúcares, a presença de glicosidases digestivas em flebotomíneos já foi demonstrada em *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia youngi* (Samie *et al.*, 1990; Anez *et al.* 1994). Mais recentemente, Gontijo *et al.* (1998) demonstraram e caracterizaram a atividade da enzima α -glicosidase no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* sem repasto sanguíneo e não infectadas. A α -glicosidase é uma enzima ligada à membrana das células intestinais, que tem pH ótimo de atividade próximo a 6,0. De maneira geral, a presença da atividade desta enzima no intestino médio é um forte indício de que o pH neste local se mantém próximo a pH 6,0. De fato, Gontijo *et al.*, 1998 verificaram que o pH nas duas porções do intestino médio se mantém entre 5,5 e 6,0, em fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue.

Esses trabalhos a respeito do ciclo intravetorial de *Leishmania* sp. e dos processos digestivos no intestino de flebotomíneos (citados nos parágrafos anteriores), levam a refletir sobre algumas questões intrigantes: (1) Como se comportaria o pH no intestino médio das fêmeas de *L. longipalpis* na presença do repasto sanguíneo e dos açúcares ingeridos, sendo que as enzimas que digerem proteínas e carboidratos requerem pHs diferentes? (2) Como poderiam ocorrer os processos de multiplicação e diferenciação do parasito num mesmo espaço físico (intestino médio), sendo que os dois processos ocorrem mais eficientemente em diferentes pHs?

Esta aparente contradição poderia ser explicada pela hipótese proposta por Gontijo *et al.* (1998): o pH alcalino e a disponibilidade de nutrientes durante a digestão de proteínas logo após o repasto sanguíneo favoreceriam a multiplicação de *Leishmania* sp. Durante esta fase, o pH mais alto e a presença de hemoglobina e/ou hemina estariam inibindo a diferenciação das promastigotas procíclicas em promastigotas metacíclicas (Schlein e Jacobson, 1994; Charlab e Ribeiro, 1993; Charlab *et al.*, 1995). Com o final da digestão das proteínas, hemina e/ou hemoglobina seriam defecadas juntamente com os restos não aproveitáveis do sangue digerido, e o pH cairia, tornando-se um estímulo para a metaciclogênese (Gontijo *et al.* 1998). A queda do pH favoreceria também a atividade das glicosidases digestivas, tanto dos flebotomíneos, quanto das formas promastigotas de *Leishmania* sp., já que ambas funcionam bem em pH ácido (Gontijo *et al.* 1996; Gontijo *et al.* 1998).

No presente trabalho, foi demonstrado que o pH no intestino médio abdominal de *L. longipalpis* pode alcançar valores superiores a pH 8,0 logo após o repasto sanguíneo. Este pH se mantém relativamente alcalino durante a maior parte da digestão do sangue, alcançando pHs próximos a 7,5 numa fase mais avançada da digestão do sangue (**figura 10**). Com a eliminação do bolo fecal, é muito provável que o pH no intestino médio abdominal retorne a 6,0, valor normal para fêmeas não alimentadas com sangue (Gontijo *et al.*, 1998). Um fato interessante em nossos resultados, é que mesmo durante a digestão do sangue, o intestino médio torácico apresentou valores de pH entre 5,5 e 6,0 (**figura 11**), período no qual o intestino abdominal mantém um pH alcalino. Nos estudos realizados com a α -glicosidase digestiva de *L. longipalpis* (enzima que tem pH ótimo igual a pH 6,0) foi

verificado que esta enzima tem atividade 14 vezes maior no intestino médio torácico do que no intestino médio abdominal em fêmeas alimentadas somente com sacarose (**quadro 4**). Interessantemente, ao contrário da α -glicosidase que predomina no intestino médio torácico, a atividade de aminopeptidases ligadas à membrana do intestino médio de *L. longipalpis*, se mostrou maior no intestino médio abdominal onde o pH é alcalino durante a digestão do sangue. Como era de se esperar, o pH ótimo das aminopeptidases fica entre pH 8,0 e pH 8,5 (dados não publicados).

Apesar dos estudos de distribuição da α -glicosidase terem sido feitos em fêmeas de *L. longipalpis* sem o repasto sanguíneo, os resultados de distribuição desta enzima aliados aos pHs observados durante a digestão do repasto sanguíneo, indicam que em insetos alimentados com sangue e açúcares, a digestão de sacarose pela α -glicosidase acontece ao mesmo tempo em que ocorre a digestão do sangue, só que em lugares diferentes e com pHs diferentes (digestão compartimentalizada). Desta maneira, os carboidratos (principalmente a sacarose clivada pela α -glicosidase) são digeridos no intestino médio torácico, onde o pH se mantém ácido (pH~6,0), e as proteínas são digeridas no intestino médio abdominal em meio alcalino (pH \geq 8,0) (ver **figura 12**).

Além disso, os resultados que mostraram pHs acima de 8,0 no intestino médio abdominal e pHs próximos a 6,0 no intestino médio torácico em fêmeas com repasto sanguíneo, corroboram a hipótese sugerida por Gontijo *et al.* (1998). No início da digestão, o pH alcalino observado favorece as proteases ativas na digestão do repasto sanguíneo, bem como a multiplicação de *Leishmania* sp., no caso do inseto estar infectado. A acidificação do meio, a escassez de nutrientes e a ausência de hemina e/ou hemoglobina, ao final da

digestão sanguínea, funcionariam como sinalizadores para o início da metacicloênese das formas promastigotas de *Leishmania* sp.

Essas variações de pH que ocorrem no intestino quando o flebotomíneo muda o “status” nutricional, ou quando se trata de locais diferentes do tubo digestivo, nos levou a investigar a existência de um ou mais mecanismos de regulação de pH no intestino do inseto. Estes mecanismos atuariam no controle e manutenção do pH ao longo do intestino médio, de acordo com a necessidade do inseto.

Sabe-se que no meio externo, a volatilização do CO₂ é efetivamente capaz de alcalinizar o pH do sangue de mamíferos. Billker *et al.* (2000) mostraram que uma gota de sangue da cauda de camundongo exposta ao ar sofre um aumento de pH 7,4 para pH 8,0 em apenas 10 minutos. Assim, decidimos verificar se a volatilização do CO₂ teria um papel semelhante na alcalinização do intestino médio abdominal de fêmeas de *L. longipalpis* durante a digestão do repasto sanguíneo.

Se a volatilização do CO₂ fosse o único mecanismo envolvido no aumento do pH, era de se esperar que não ocorresse alcalinização no intestino dos insetos que se alimentassem de sangue degaseificado.

Entretanto, o presente trabalho mostrou que as variações de pH (alcalinização) do sangue rico em CO₂ e do sangue degaseificado (pobre em CO₂) foram semelhantes no intestino médio abdominal das fêmeas testadas (**tabelas 1 e 2**). Ou seja, mesmo na ausência do CO₂, o pH do sangue, que é uma solução naturalmente tamponada, aumentou de pH 6,78 para 7,53, em média ($p < 0,0001$, teste t de Student) (**tabela 1**). Estes resultados são

fortes indícios de que outro(s) mecanismo(s), além da saída do CO₂ do sangue ingerido explica(m) a alcalinização observada no intestino durante a digestão sanguínea.

Infelizmente, esses dados obtidos são de difícil interpretação, devido a duas questões relacionadas à metodologia utilizada:

- A primeira questão, que só foi percebida recentemente, é que a metodologia de degaseificação em ambiente de vácuo não estava sendo completamente eficiente. Este fato foi evidenciado, quando foi feita a comparação do pH alcançado pelo sangue degaseificado no vácuo, com o pH do sangue degaseificado ao ar livre. O aumento do pH devido à retirada do CO₂ no vácuo foi de apenas $0,33 \pm 0,06$ unidades de pH, enquanto que no sangue degaseificado ao ar livre, o pH aumentou em $0,6 \pm 0,02$ unidades, uma diferença muito significativa ($p < 0,001$, teste t de Student). Uma vez que não se estava retirando todo o CO₂ do sangue, tornou-se difícil determinar qual a real influência desta molécula na alcalinização do intestino médio abdominal.

- A segunda questão é que, os pHs iniciais das amostras de sangue rico e pobre em CO₂ eram diferentes, antes de entrarem em contato com o intestino das fêmeas. O sangue rico em CO₂ partiu de um pH 7,4 e alcançou pH $8,16 \pm 0,26$ dentro do intestino (nas primeiras 5 horas após o repasto sanguíneo) (**tabela 2**). Já o sangue pobre em CO₂, partiu de um pH $6,73 \pm 0,16$, e alcançou em média, pH $7,43 \pm 0,21$ também nas primeiras 5 horas após a ingestão (**tabela 1**). Ou seja, as amostras de sangue normal e degaseificado partiram de concentrações de íons H⁺ diferentes. É bem provável que se o pH do sangue degaseificado tivesse sido ajustado para 7,4, a contribuição de outro(s) mecanismo(s) no controle do pH ficasse mais evidente.

Assim, seriam necessários novos experimentos, degaseificando o sangue eficientemente ao ar livre e ajustando seu pH para 7,4 antes de oferecê-lo as fêmeas, para determinar-se a participação do CO₂ na alcalinização do pH intestinal.

Há outro indício de que existem outros mecanismos além da volatilização do CO₂ atuando na alcalinização do tubo digestivo durante a digestão do sangue. Quando 5,0 mL de sangue humano foram expostos ao ar sob agitação constante durante uma hora (neste caso a saída do CO₂ foi realmente eficiente), observou-se que o pH inicial de 7,4, aumenta para pH 8,0 (dados não mostrados). Já no interior do intestino médio abdominal de *L. longipalpis*, foi visto que o sangue ingerido com pH inicial 7,4, sofre alcalinização até pH $8,16 \pm 0,26$ nas primeiras 5 horas após ingestão (**tabela 2**). Embora a diferença entre a alcalinização do sangue no interior do inseto ($0,80 \pm 0,23$ unidades de pH) e a alcalinização do sangue no meio externo ($0,61 \pm 0,02$ unidades de pH) não seja completamente significativa ($p=0,07$, teste de Student), ela mostra uma tendência nesse sentido.

Todavia, o pH alcançado no intestino médio de *L. longipalpis* pelo sangue rico em CO₂ é maior do que o pH alcançado pelo sangue nas mesmas condições (medido com microeletrodos) no interior do tubo digestivo de *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti* que chegam, em média, a pH 7,82 e pH 7,43, respectivamente (Billker *et al.* 2000). Nesses casos, os autores atribuem a alcalinização intestinal apenas ao mecanismo de saída do CO₂.

Em fêmeas de *L. longipalpis* sem repasto sanguíneo foi observado que soluções tamponadas de HEPES e MES com pHs 7,5 e 5,0, sofrem intensa acidificação ou alcalinização, respectivamente, e têm os pHs ajustados para pH 6,0 quando em contato com o intestino médio das fêmeas (**figuras 13 e 14**). Estes resultados comprovam a existência de

um mecanismo ativo de tamponamento do pH intestinal, que é capaz de manter o pH sempre próximo de 6,0, valor normalmente encontrado no intestino médio das fêmeas sem repasto sanguíneo.

O pH no divertículo esofágico de fêmeas de *L. longipalpis* sem o repasto sanguíneo normalmente se mantém próximo a pH 6,5 (Gontijo *et al.*, 1998). Não foi observado mecanismo de tamponamento de pH no divertículo, pois as soluções-tampão MES e HEPES (pHs 5,0 e 7,5) não sofreram ajuste para pH 6,5 neste local. Isso já era esperado, uma vez que o divertículo esofágico tem o epitélio inerte no que diz respeito ao transporte de íons. Este resultado nos faz crer que a regulação do pH em flebotomíneos é um fenômeno exclusivo do intestino médio.

Para analisar os mecanismos que podem estar envolvidos no controle do pH intestinal é relevante levar em conta que em fêmeas alimentadas com sangue, o pH no intestino médio abdominal permanece alcalino enquanto que o pH no intestino médio torácico se mantém ácido. Isto indica que o estímulo que faz com que o pH mude de ácido para alcalino tem ação localizada, e não sistêmica. É como se as células que estão “em contato com o sangue”, e somente elas, recebessem ordem para parar de manter o pH ácido e ao mesmo tempo mudassem o ajuste do controle de pH de modo a levar o ambiente a alcalinização.

Analisado a morfologia do tubo digestivo de *L. longipalpis*, Leite e Evangelista (2001) observaram que este inseto possui dois tipos de células endócrinas dispersas na monocamada do epitélio do intestino médio. O primeiro tipo produz grânulos ativos que parecem ser enviados para a hemolinfa via membrana celular, e o segundo se abre para o

lúmen secretando seus produtos através das microvilosidades. Estes tipos celulares, presentes exclusivamente no intestino médio, devem estar envolvidos no controle dos processos digestivos, e provavelmente, são responsáveis pelo comportamento do controle de pH descrito no parágrafo anterior. É possível que a presença de proteínas e/ou aminoácidos seja o fator que desencadeia o processo de alcalinização.

Os mecanismos de regulação de pH no intestino médio de *L. longipalpis* provavelmente envolvem o transporte vários íons, dentre eles, o HCO_3^- e o H^+ , cuja reação de formação é catalisada pela enzima anidrase carbônica no interior das células do intestino médio.

Para testar se a atividade da anidrase carbônica teria alguma influência sobre a manutenção do pH 6,0 no intestino médio de fêmeas sem o repasto sanguíneo, foi utilizada a acetazolamida, um inibidor da atividade da enzima anidrase carbônica.

A anidrase carbônica atua na catalisação de uma reação que produz íons que podem tanto alcalinizar (HCO_3^-) quanto acidificar (H^+) o ambiente do lúmen intestinal. A escolha entre alcalinizar ou acidificar o intestino depende da maneira como os íons HCO_3^- e H^+ estão sendo transportados pelas células intestinais de cada inseto. Em ambos os casos, a atividade da anidrase carbônica pode ajudar no processo.

Em nossos experimentos, foi observado pouco efeito da acetazolamida na alcalinização do intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis*. Tanto na presença quanto na ausência do inibidor, ocorreu alcalinização do pH 5,0 para o pH 6,0 (**figuras 15 e 16**). Estes resultados diferem daqueles encontrados por Boudko *et al.* (2001b), e Corena *et al.* (2002),

que mostraram que a inibição da anidrase carbônica impede o processo de alcalinização do lúmen intestinal de larvas de *A. aegypti*. Contudo, neste caso o pH da luz intestinal da larva de mosquito é muito maior (pH~11 na porção inicial do intestino médio) e poderia, portanto, ser mais facilmente afetado pelo inibidor.

Por outro lado foi observado que mesmo com a inibição da atividade da anidrase carbônica, ocorre acidificação do pH 7,5 para pHs próximos a pH 6,5 no intestino médio de *L. longipalpis* (**figuras 17 e 18**). Contudo, esta acidificação não foi suficiente para abaixar o pH até pH 6,0, valor normalmente encontrado no intestino médio sem o repasto sanguíneo. Portanto, estes dados indicam que a anidrase carbônica esta envolvida na acidificação do pH intestinal do flebotomíneo. Nos casos em que houve acidificação completa do pH (até pH 6,0), mesmo com a utilização da acetazolamida, pode ser que o inibidor não tenha funcionado devido a uma penetração insuficiente no citoplasma das células intestinais. Ou ainda, pode não ter havido tempo suficiente para a acetazolamida se difundir pelas células do intestino a ponto de inibir todas as moléculas da anidrase, uma vez que o pH era medido quase que imediatamente após a ingestão forçada da solução contendo o inibidor. Desta forma, acredita-se que a anidrase carbônica esteja sim, envolvida no processo de acidificação do intestino médio de *L. longipalpis*, assim como foi proposto por Terra e Regel (1995), para a acidificação do intestino médio de *Musca domestica*.

Apesar de ter sido observado efeito do inibidor da anidrase na acidificação do intestino médio de *L. longipalpis* sem o repasto sanguíneo, no presente trabalho não foi possível detectar atividade desta enzima em fêmeas com e sem repasto sanguíneo (**quadros 5 e 6**). Talvez a anidrase carbônica não esteja ativa na ausência do repasto sanguíneo, e nem

quando a digestão do repasto sanguíneo se aproxima do fim (estas foram as condições testadas em nossos experimentos). Provavelmente por isso, não tenha sido possível a detecção da atividade da enzima em *L. longipalpis*. Diferentemente, Terra *et al.* (1988) detectaram atividade da anidrase carbônica em células do intestino médio de *M. domestica*, através de uma metodologia que se baseia no mesmo princípio que a metodologia utilizada em nosso trabalho.

A anidrase carbônica já foi clonada a partir de amostras de cDNA de intestino médio de larvas de *A. aegypti*, e detectada no tecido intestinal através de hibridização *in situ* e testes histoquímicos por Corena *et al.* (2002). Apesar de genes para esta enzima já terem sido encontrados em outros insetos como *A. gambiae* (Seron *et al.*, 2004), não foi possível verificar a expressão de genes para a anidrase carbônica no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* sem repasto sanguíneo, e nem mesmo a presença de seqüências homólogas à enzima no DNA genômico do flebotomíneo (**figuras 19 e 20**). Provavelmente, a seqüência do gene que codifica para esta enzima em *L. longipalpis* é bastante diferente do que aquelas encontradas nos outros dípteros, e daí a impossibilidade de verificar a sua expressão utilizando iniciadores desenhados a partir da seqüência de *A. gambiae*. Ainda assim, acredita-se que exista a expressão ou atividade de anidrase carbônica em flebotomíneos, mesmo que a(s) seqüência(s) da enzima nestes insetos seja diferente daquelas encontradas em outros dípteros.

Tanto a atividade da anidrase carbônica, quanto o transporte de íons de uma maneira geral, devem ter influência na manutenção do pH intestinal de *L. longipalpis*, inclusive atuando em conjunto. Em larvas de *A. aegypti* íons HCO_3^- e Cl^- são transportados entre o

lúmen do intestino e a hemolinfa (antiporte), de modo a se alcançar altas concentrações do HCO_3^- (ânion fraco) no interior do lúmen, alcalinizando este local (Boudko *et al.* 2001b).

Para testar se o transporte de ânions influencia na manutenção do pH intestinal de *L. longipalpis*, já foram iniciados experimentos utilizando o DIDS (Di-Isothiocyanatostilbene-2,2'-Di-Sulfonic acid) um inibidor seletivo do transporte de ânions. Os resultados preliminares têm dado indícios de que a inibição do transporte de ânions, assim como a inibição da anidrase carbônica dificulta a acidificação do intestino médio de fêmeas sem repasto sanguíneo. Mais testes serão realizados, para saber qual a importância, e como o transporte de íons atua no controle do pH intestinal de *L. longipalpis*.

Um outro mecanismo que poderia estar envolvido no controle do pH intestinal de *L. longipalpis*, é o transporte diferencial de fosfato. Sabe-se que o fosfato está presente no sangue de vertebrados, uma das fontes de alimentação dos insetos hematófagos. O transporte preferencial de um dos íons fosfato do lúmen intestinal para a hemolinfa do flebotomíneo poderia deslocar o equilíbrio da equação $\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$ de maneira a alterar o pH intestinal. Se o íon H_2PO_4^- fosse a forma predominantemente transportada através das células intestinais, em detrimento do íon HPO_4^{2-} , o equilíbrio químico resultante levaria a uma alcalinização do tubo digestivo. Caso contrário, se o íon preferencialmente transportado fosse o HPO_4^{2-} , então haveria uma acidificação do intestino.

A fim de verificar se a presença do fosfato seria responsável pela manutenção do pH intestinal em *L. longipalpis*, foram realizados experimentos alimentando fêmeas sem repasto sanguíneo com soluções de fosfato de potássio de pHs próximos a 7,5 (em concentrações de 1,0 a 20mM). Foi verificado que estas soluções são prontamente acidificadas no

intestino médio, alcançando pH 6,0 (dados não mostrados). Para saber se tal acidificação estava relacionada diretamente com o transporte de íons fosfato, havia a necessidade de realizar experimentos-controle, utilizando uma substância que normalmente não é transportada em sistemas biológicos. A substância escolhida para os experimentos-controle foi o HEPES, por ser um tampão inerte no que diz respeito ao transporte de seus íons através das membranas do tubo digestivo.

O tampão HEPES sofreu acidificação semelhante a do fosfato quando colocado em contato com o intestino médio sem o repasto sanguíneo (**figuras 21 e 22**). Estes resultados indicam que o transporte diferencial de fosfato, ou mecanismos que envolvam a presença de fosfato, não ocorrem em insetos não alimentados com sangue. Em princípio, o objetivo destes experimentos com o fosfato, era saber se a presença de íons fosfato, por si só, dispararia algum mecanismo de controle do pH intestinal mesmo em fêmeas sem o repasto sanguíneo. Assim, o fato de não ter sido verificada influência do transporte diferencial de íons fosfato na manutenção do pH do intestino sem sangue, não exclui necessariamente a participação do fosfato no controle do pH durante a digestão do repasto sanguíneo.

Vale ressaltar que todos os experimentos de medidas de pH, e testes dos possíveis mecanismos de controle do pH intestinal em *L. longipalpis* (com ou sem o repasto sanguíneo) foram feitos em fêmeas não infectadas com *Leishmania* sp. Assim, não se pode afirmar que em fêmeas infectadas, o pH ou seus mecanismos de controle se comportem da mesma forma observada nos experimentos já realizados até o momento. A própria presença do parasito e de seus metabólitos poderia influenciar na manutenção do pH no ambiente intestinal (Darling *et al.*, 1987).

O bombeamento de prótons através de V-ATPases ao nível das membranas celulares é sabidamente, um processo envolvido no controle de pH em insetos. Este tipo de bomba transportadora de H^+ é comumente observado em tecidos transportadores de vários insetos. Nos artrópodes, as H^+ V-ATPases são consideradas energizadoras de membranas celulares, e o potencial transmembrana criado por elas possibilita vários processos como, o transporte ativo de aminoácidos pelas células intestinais, a excreção de líquidos e catabólitos pelos túbulos de Malpighi, e em alguns casos, a alcalinização do intestino médio de larvas de lepidópteros (Harvey *et al.*, 1998; Wiczorek *et al.* 2000; Beyenbach e Wiczorek, 2006).

Larvas de mosquitos (Culicidae) apresentam um pH próximo de 11 no intestino médio anterior (Dadd, 1975; Boudko *et al.*, 2001a; Boudko *et al.*, 2001b). Nestes insetos, já foi evidenciada a presença de H^+ V-ATPases na membrana basal das células epiteliais (Zhuang *et al.*, 1999) do intestino. A influência desse sistema de transporte na manutenção do pH alcalino em várias espécies do gênero *Aedes* foi evidenciada pelo uso da Balifominina A1. Este inibidor seletivo de H^+ V-ATPases foi capaz de eliminar gradientes de íons H^+ na região anterior do intestino médio, o que não foi observado na região posterior e no ceco gástrico do culicídeo (Boudko *et al.*, 2001a). Em larvas de *Manduca sexta* (Lepdoptera), a manutenção de um pH muito alcalino (pH 12) no lúmen intestinal também está envolvida com a energização das membranas das células intestinais, sendo as H^+ V-ATPases, responsáveis pelo bombeamento de H^+ que possibilita tal energização (Harvey *et al.*, 1983; Dow e Harvey, 1988; Giordana *et al.*, 1989; Dow e O'Donnell, 1990; Wiczorek *et al.*, 1991).

Muito provavelmente, *L. longipalpis* tem seus mecanismos de regulação de pH intestinal acoplados à atividade de H⁺ V-ATPases, uma vez que a expressão de uma das subunidades desta enzima já foi observada por Ramalho-Ortigão *et al.* (2001) no intestino de fêmeas com e sem o repasto sanguíneo

7 - PERSPECTIVAS

Pode-se concluir que realmente existem mecanismos de regulação do pH no intestino médio de *L. longipalpis*, e que tais mecanismos provavelmente têm um controle complexo e refinado. O presente trabalho apenas iniciou o estudo destes mecanismos em flebotomíneos, e temos consciência de que ainda restam vários pontos a serem esclarecidos, e muitas descobertas a serem feitas a respeito deste assunto. A fim de esclarecer melhor os mecanismos de controle do pH intestinal em *L. longipalpis*, pretende-se ainda:

- Testar o efeito da bafilomicina A1, um inibidor específico de V-ATPases bombeadoras de H^+ , no pH do tubo digestivo de fêmeas alimentadas e não alimentadas com sangue.
- Testar o efeito do DIDS, um inibidor do transporte de ânions através das células, no controle de pH intestinal de fêmeas sem o repasto sanguíneo.
- Refazer os testes do efeito da volatilização do CO_2 utilizando um processo de degaseificação do sangue mais eficiente do que o utilizado nas medidas inicialmente obtidas. O pH do sangue após a retirada do CO_2 será ajustado para 7,4 antes de ser oferecido às fêmeas.
- Investigar se a presença de proteínas e/ou aminoácidos pode disparar o processo de alcalinização em fêmeas alimentadas.
- Conseguir junto a grupos de pesquisa que disponham de seqüências de proteínas expressas no tubo digestivo de *L. longipalpis*, a seqüência de alguma possível anidrase carbônica, com o fim de testar a identificação desta enzima por RT-PCR.

Assim será possível obter informações importantes e até mesmo propor modelos para tentar explicar os mecanismos envolvidos no controle do pH intestinal de *L. longipalpis*.

8 - CONCLUSÕES

Durante a digestão do repasto sanguíneo, o pH é $\geq 8,0$ no intestino médio abdominal e próximo a 6,0 no intestino médio torácico em fêmeas de *L. longipalpis*.

A enzima digestiva α -glicosidase tem atividade cerca de 14 vezes maior no intestino médio torácico do que no intestino médio abdominal de *L. longipalpis*.

pHs acima de 8,0 na porção abdominal, e pHs próximos a pH 6,0 na porção torácica do intestino médio indicam que a digestão de proteínas e carboidratos é compartimentalizada em fêmeas de *L. longipalpis*: os açúcares são digeridos em meio ácido no intestino médio torácico, enquanto que as proteínas do sangue ingerido são clivadas em meio alcalino no intestino médio abdominal.

Em fêmeas de *L. longipalpis* não alimentadas com sangue ocorre uma manutenção ativa do pH 6,0, no intestino médio, fato este que não foi observado no divertículo esofágico.

Um dos fatores de controle do pH intestinal em fêmeas de *L. longipalpis* sem o repasto sanguíneo, é a atividade da enzima anidrase carbônica, que influencia na acidificação do intestino médio.

Não foi possível detectar a expressão de anidrase carbônica em *L. longipalpis*. Se realmente o flebotômico produz esta enzima, o(s) gene(s) para a anidrase deste inseto não apresenta(m) homologia com o gene para a anidrase carbônica de *Anopheles gambiae*.

Utilizando espectrofotometria, não foi possível detectar atividade de anidrase carbônica no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* com e sem o repasto sanguíneo.

Íons fosfato aparentemente não estão envolvidos diretamente na manutenção do pH no intestino médio de fêmeas de *L. longipalpis* sem o repasto sanguíneo.

Provavelmente a volatilização do CO₂ não é o único mecanismo responsável pela alcalinização e manutenção do pH intestinal durante a digestão do repasto sanguíneo em fêmeas de *L. longipalpis*.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S. 1964. *Leishmania*. *Adv Parasitol.* n. 2, p.35-91

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

ANEZ, N.; LUGO, A.; NIEVES, E.; OROZCO, J. 1994. Sugars in alimentary canal of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae). *Med Vet Entomol.* n. 8, p. 381-442.

ANEZ, N.; TANG, Y.; KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M. 1997. The use of a microcapillary feeding system to determine the fate of a meal on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Bol Direccion Malariaologia y San Amb.* n. 37, p. 1-6.

AUCLAIR, J.L. 1963. Aphid feeding and nutrition. *Ann Rev Entomol.* n. 8, p. 439-490.

BALDWIN, K.M.; HAKIM, R.S.; LOEB, M.J.; SADRUD-DIN, S.Y. 1996. Midgut development. In: Billingsley, P. F.; Lehane, M.J. (eds.), *Biology of the insect midgut*, Chapman & Hall, London, p. 31-54.

BARROS, V.C.; OLIVEIRA, J.S.; MELO, M.N.; GONTIJO, N.F. 2006. *Leishmania amazonensis*: chemotaxic and osmotaxic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut. *Exp Parasitol.* v.12, n. 3, p. 152-157.

BATES, P.A.; 1994. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitol.* n. 108, p. 1-9.

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

- BATES, P.A.; TETLEY, L. 1993. *Leishmania mexicana*: Induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acid pH. *Exp Parasitol.* n. 76, p. 412-423.
- BEYENBACH, K.W.; WIECZOREK, H. 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Bio.* n. 209, p. 577-589.
- BILLKER, O.; MILLER, A.J.; SINDEN, R.E. 2000. Determination of mosquito bloodmeal pH *in situ* by ion-selective microelectrode measurement: implications for de regulation of malarial gametogenesis. *Parasitol.* n.120, p. 547-551.
- BILLINGSLEY, P.F.; LEHANE, M.J. 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Billingsley, P. F.; Lehane, M.J. (eds.), *Biology of the insect midgut*. Chapman & Hall, London, p. 3-30.
- BOROVSKY, D.; SCHLEIN, Y. 1987. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol.* v. 1, n. 3, p. 235-242.
- BOUDKO, D.Y.; MOROZ, L.L.; LINSER, P.J.; TRIMARCHI, J.R.; SMITH, P.J. HARVEY, W.R. 2001 a. In situ analysis of pH gradients in mosquito larvae using non-invasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes. *J Exp Biol.* v. 204, n. 4, p. 691-699.
- BOUDKO, D.Y.; MOROZ, L.L.; HARVEY, W.R.; LINSER, P.J. 2001b. Alkalinization by chloride / bicarbonate pathway in larval mosquito midgut. *Proc Natl Acad Sci.* v. 98, n. 26, p. 15354-15359.
- CAVALCANTE, R.R.; PEREIRA, M.H.; FREITAS, J.M.; GONTIJO, N.F. 2006. Ingestion of saliva during carbohydrate feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 101, n. 1, p. 85-87.
- CAVALCANTE, R.R.; PEREIRA, M.H.; GONTIJO, N.F. 2003. Anti-complement activity in saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology.* n. 127, p. 87-93.

CHAGAS, E. 1936. Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil. *Bras-Méd.* n. 50, p. 221-222.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; FERREIRA, L.C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F.N.; PAUMGARTTEN, M.J.; SÁ, B. 1938. Leishmaniose visceral americana (Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* n. 33, p. 189-229.

CHANIOTIS, B.N. 1974. Sugar-feeding behaviour of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Med Entomol.* n. 11, p. 73-79

CHAPMAN, R.F. 1998. The Insects: Structure and function. 4^a edição, Cambridge University Press, p. 38-68.

CHARLAB, R.; RIBEIRO, J.M. 1993. Cytostatic effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenates on *Leishmania* parasites. *Am J Trop Med Hyg.* v. 48, n. 6, p. 831-838.

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

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. *J Exp Biol.* v. 205, n. 5, p. 591-602.

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

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. Jr.; MOMEN, H. 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* n. 50, p. 296-311.

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

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

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

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

DILLON, R.J.; LANE, R.P. 1993 b. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitol Res.* v. 79, n. 6, p. 4492-4966.

DOW, J.A.T.; HARVEY, W.R. 1988. Role of midgut electrogenic K⁺-pump potential difference in regulating lumen K⁺ and pH in larval lepidoptera. *J exp Biol.* v. 140, p. 455-463.

DOW, J.A.T.; O'DONNELL, M. J. 1990. Reversible alkalization by *Manduca sexta* midgut. *J exp Biol.* v. 150, p. 247-256.

FELLE, H. 1987. Proton transport and pH control in *Sinapis abba* root hairs: A study carried out with doubled-barrelled microelectrodes. *J Exp Bot.* v. 38, n. 187, p. 340-354.

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

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

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

GIORDANA, B.; SACCHI, V.F.; PARENTI, P; HANOZET, G.M. 1989. Amino acid transport systems in intestinal brush-border membranes. *Am J Physiol.* n. 257, p. 494-500.

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

GONTIJO, N.F.; MELO, M.N.; RIANI, E.B.; ALMEIDA-SILVA, S.; MARES-GUIA, M. L. 1996. Glycosidases in *Leishmania* and their importance for *Leishmania* in phlebotomine sandflies with special reference to purification and characterization of a sucrase. *Exp Parasitol.* v. 83, p. 117-124.

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

HARRISON, J.F. 2001. Insect acid - base physiology. *Annu Rev Entomol.* n. 46, p. 221-250.

HARVEY, W.R.; CIOFFI, M.; WOLFERSBERGER, M.G. 1983. Potassium ion transport ATPase in insect epithelia. *J exp Biol.* n. 106, p. 91-117.

HARVEY, W.R.; MADDRELL, S.H.P.; TELFER, W.H.; WIECZOREK, H. 1998. H⁺ V-ATPases energize animal plasma membranes for secretion and absorption of ions and fluids. *Am Zool.* n. 38, p. 426-441.

HERTIG, A.T.; HERTIG, M.A. 1927. Technique for artificial feeding of sand flies with (*Phlebotomus*) and mosquitoes. *Science.* n. 65, p. 328-329.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- LAINSON, R.; WARD, R.D.; SHAW, J.J. 1977. Experimental transmission of *Leishmania chagasi* causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*. n. 266, p. 628-630.
- LANG, T.; WARBURG, A.; SACKS, D.L.; CROFT, S.L.; LANE, R.P.; BLACKWELL, J.M. 1991. Transmission and scanning EM-immunogold labeling of *Leishmania major* lipophosphoglycan in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Eur J Cell Biol*. v. 55, n. 2, p. 362-372.
- LEITE, A.C.; EVANGELISTA, L.G. 2001. Ultrastructure of endocrine cells from the abdominal midgut epithelium of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. v. 38, n. 5, p. 749-752.
- MAHMOOD, F.; BOROVSKY, D. 1992. Biosynthesis of trypsinlike and chymotrypsinlike enzymes in immature *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. v. 29, n. 3, p. 489-495.
- MAHMOOD, F.; BOROVSKY, D. 1993. Biosynthesis of serine proteases in *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, n. 30, p. 683-688.
- MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. 2000. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. v. 16, n. 5, p. 188-189.
- MCCONVILLE, M.J.; TURCO, S.J.; FERGUSON, M.A.; SACKS, D. L. 1992. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J*. v.11, n.10, p. 3593-3600.
- MELO, M.N. 1982. Cultivo de *Leishmania* em meio definido. Estudos de suas exigências nutricionais. Tese de Doutorado, Departamento de Parasitologia - ICB - UFMG.
- MODI, G.B.; TESH, R.B. 1983. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol*. n. 20, p. 568-569.

MOLYNEUX, D.H.; KILLICK-KENDRICK, R. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: Peters, W. (ed). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, p. 121-176.

MOLYNEUX, D.H.; MOORE, J.; MAROLI, M. 1991. Sugars in sand flies. *Parasitol.* v. 33 (Suppl.1), p. 431-436.

OLIVEIRA, J.S.; MELO, M.N.; GONTIJO, N.F. 2000. A sensitive method for assaying chemotaxic responses of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.* v. 96, n. 3, p. 187-189.

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

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

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

PINTO-DA-SILVA, L.H.; CAMURATE, M.; COSTA, K.A.; OLIVEIRA, S.M.; DA CUNHA-E-SILVA, N.L.; SARAIVA, E.M. 2002. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *Int J Parasitol.* v. 32, n. 11, p.1371-1377.

PLANELLES, G.; DISCALA, F.; ANAGNOSTOPOULOS, T. 1992. Luminal pH in the amphibian distal tubule: effects of carbonic anhydrase and carbonic anhydrase inhibitors. *Am J Physiol.* v. 263, n. 6, p. 1254-1259.

RAMALHO-ORTIGÃO, J.M.; TEMPORAL, P.; OLIVEIRA, S.M.P. ; BARBOSA, A.F.; VILELA, M.L.; RANGEL, E.F.; BRAZIL, R.P.; TRAUB-CSEKO, Y.M. 2001.

Characterization of Constitutive and Putative Differentially Expressed mRNAs by Means of Expressed Sequence Tags, Differential Display reverse transcriptase-PCR and randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR from Sand Fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mem Inst Oswaldo cruz.* v. 96, n. 1, p. 105-111.

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

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

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

RIBEIRO, J.M.; ANDERSEN, J.; SILVA-NETO, M.A.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; VALENZUELA, J. G. 2004. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol.* v. 34, n.1, p.61-79.

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

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

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

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

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

SACKS, D.L.; KAMHAWI, S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* n. 55, p. 453-483.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SERON, T.J.; HILL, J.; LINSER, P.J. 2004. A GPI-linked carbonic anhydrase expressed in the larval mosquito midgut. *J Exp Biol.* v. 207, n. 26, p. 4559-4572.

SHERLOCK, I.A.; SHERLOCK, V.I. 1961. Sobre a infecção experimental de *Phlebotomus longipalpis* pela *Leishmania donovani*. *Rev Bra Biol.* n. 21, p. 409-418.

SMITH, R.O. A.; HAUDER, K.C.; AHMED, I. 1941. Further investigations on the transmission of kala-azar: Part VI – A second series of transmission of *L. donovani* by *P. argentipes*. *Indian J Med Res.* n. 29, p. 799-802.

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

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

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. *J Insect Physiol.* v. 35, n. 6, p. 463-472.

TERRA, W.R.; REGEL, R. 1995. pH buffering in *Musca domestica* midguts. *Comp biochem Physiol.* v. 112A, p. 559-564.

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

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

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

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

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

WIECZOREK, H.; PUTZENLECHNER, M.; ZEISKE, W.; KLEIN, U. 1991. A vacuolar-type proton pump energizes H⁺/K⁺-antiport in an animal plasma membrane. *J Biol Chem.* v. 266, p. 15340 -15347.

WYATT, G.R. The biochemistry of insect hemolymph. 1961. *Annu Rev Entomol.* n. 6, p.75-102.

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

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

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

ZIEGLER, H. 1975. Transport in Plants I, Nature of transported substances, vol. 1, cap. 3. *In: Zimmermann, M.H.; Milburn, J.A. (eds). Enciclopedia of Plant Fisiology.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. p. 59-94.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. <http://portalweb02.saude.gov.br/portal/saude/>. Acesso

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE.

http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html. Acesso