INPA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
Ministério da Ciência e Tecnologia

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS, HISTOQUÍMICOS E PROTEICOS DO INTESTINO MÉDIO DE *LUTZOMYIA (NYSSOMYIA) UMBRATILIS* WARD E FRAIHA, 1977.

LUÍS HENRIQUE MONTEIRO GOMES

Manaus

2012

LUÍS HENRIQUE MONTEIRO GOMES

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS, HISTOQUÍMICOS E PROTEICOS DO INTESTINO MÉDIO DE *LUTZOMYIA (NYSSOMYIA) UMBRATILIS* WARD E FRAIHA, 1977.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

ORIENTAÇÃO: Dr^{a}. ANTONIA MARIA RAMOS FRANCO

CO-ORIENTAÇÃO: Dr^{a}. LILIANE COELHO DA ROCHA

Manaus

2012

LUÍS HENRIQUE MONTEIRO GOMES

Tese:

Aspectos Ultraestruturais, Histoquímicos e Proteicos do intestino médio de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward e Fraiha, 1977.

Orientação: Dr[a]. Antonia Maria Ramos Franco

Co-orientação: Dr[a]. Liliane Coelho da Rocha

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

APROVADA em 21 de setembro de 2012.

(Cópia da Ata de defesa pública em anexo)

BANCA JULGADORA

Dr. Jorge Luis López-Lozano/FMT-AM

Dr[a]. Sônia Rolim Reis /INPA

Dr[a]**.** Ormezinda Celeste Cristo Fernandes/INPA

Dr. Felipe Arley Costa Pessoa/FIOCRUZ

Dr[a]. Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira/UFAM

FICHA CATALOGRÁFICA

N000 Gomes, Luís Henrique Monteiro.

Aspectos Ultraestruturais, Histoquímicos e Proteicos do intestino médio de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward e Fraiha, 1977. 2012. xiv, 85 f.: il. (al. col.).

Tese (Doutorado) – INPA, Manaus, 2012.

Orintador(a): Dra. Antonia Maria Ramos Franco

Co-orientador(a): Dra. Liliane Coelho da Rocha

Área de concentração: Entomologia

1. Matriz Peritrófica. 2. Microscopia. 3. Proteínas. 4. Gel Bidimensional.

CDD 19. ed. 595.77

Sinopse:

Doenças transmitidas por insetos hematófagos têm a ingestão do sangue infectado do hospedeiro como um ponto de partida para que a infecção ocorra. Portanto, o estudo da estrutura e fisiologia do processo de digestão é crucial para a compreensão da transmissão de patógenos por insetos vetores. O estudo da matriz peritrófica (MP) de flebotomíneos é extremamente importante, pois a eficácia da colonização no vetor pelas leishmânias é diretamente dependente da formação desta matriz. A MP pode atuar como uma barreira que pode influenciar a competência vetorial, a especificidade para as espécies de parasitos e pode promover a sobrevivência do parasito por escapar do ataque das enzimas digestivas e, finalmente, poderá também, favorecer a produção de enzimas (por exemplo, quitinase) que promovam a destruição da MP, permitindo ao parasito escapar e colonizar o intestino do inseto. O objetivo do presente estudo consiste em fornecer novos detalhes estruturais e componentes químicos da MP de *Lutzomyia umbratilis* (principal vetor da *Leishmania guyanensis* na Amazônia) em microescala que são de importância para uma maior compreensão das interações vetor-patógeno. Novos detalhes estruturais e ocorrência de algumas proteínas da MP podem ser utilizados como um modelo para o estudo destas interações, proporcionando, assim, uma das ferramentas essenciais para combater as doenças transmissíveis negligenciáveis (DTNs) por insetos vetores.

Palavras-chave: Matriz Peritrófica, Microscopia, Proteínas, Gel bidimensional.

DEDICATÓRIA...

"À minha mãe, Miriam, por tantas renúncias e dedicação durante todos estes anos pela minha felicidade".

Sua bênção.

AGRADECIMENTOS

- ✓ À DEUS, minha maior fonte de energia espiritual;

- ✓ Aos meus familiares que de uma forma direta ou indireta contribuíram no alicerce de minha educação me dando suporte pra chegar até aqui;

- ✓ À Dra. Antônia Franco pela oportunidade, orientação, ensinamentos, conselhos, e ao seu mais precioso dom de amizade e compreensão que me fizeram crescer, lutar e vencer este desafio;

- ✓ À minha amiga Liliane Rocha que me co-orientou contribuindo diretamente com seus conhecimentos em técnicas proteômicas e nas revisões literárias;

- ✓ Aos autores do Instituto Evandro Chagas (Belém-PA): Dra. Elisabeth Conceição de Oliveira Santos**,** pela disponibilidade de alojamento e realização das atividades no Instituto; Dra. Rosely que intermediou o contato com setores responsáveis para realização das atividades; Dr. Manoel Soares que viabilizou estas atividades no laboratório de microscopia eletrônica; Dr. José Antonio Diniz pela paciência, orientação e micrografias da microscopia eletrônica de transmissão; Ao bolsista Eduardo (IEC, Belém-PA) que me auxiliou nos procedimentos técnicos de preparação do material biológico para microscopia;

- ✓ Ao técnico Wilson Meireles do laboratório de microscopia eletrônica do INPA pelo auxílio nas atividades técnicas de microscopia eletrônica de varredura;

- ✓ Ao biólogo Dr. Walice Paxiuba Duncan do laboratório de histologia da UFAM pelo auxílio nas técnicas histoquímicas;

- ✓ Ao técnico do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas Artêmio Coelho pelo auxílio nas coletas em campo e, que sempre se mostrou humilde e disposto a ajudar em qualquer momento;

✓ À pesquisadora MSc. Maricleide Naiff pela sua ajuda nos momentos mais urgentes, carinho, dedicação, preocupação, experiência e força de vontade;

✓ Às minhas colegas de turma e de laboratório, Maria Odenice, Luanda, Fabiane, Claudia e Sônia pela amizade e incentivo de êxito profissional;

✓ À minha amiga Francimeire Pinheiro pelos momentos de estudos, perseverança, incentivos e colaboração dispensada;

✓ À minha amada Sandra pela compreensão e paciência nas minhas ausências, enquanto estive produzindo este trabalho;

✓ Aos Programas: Amazônia Verde/FAPEAM/SECT/FINEP e SUS/FAPEAM; Projeto Institucional – PPI nº 1-1805/INPA, pelo financiamento deste estudo;

✓ A Rede Proteômica do Estado do Amazonas na pessoa do seu Coordenador Prof. Dr. Jorge Luiz Lopéz-Lozano, por sempre estar disposto a colaborar;

✓ Às Instituições UNESP-Rio Claro, FIOCRUZ-AM e Laboratório Nacional de Biociência/CNPEM/ABTLuS, que contribuíram para a realização deste trabalho em relação a produção de mapas bidimensionais e identificação das proteínas por espectrometria de massas;

✓ Ao Institute of Chemistry and Technology of Polymers, National Research Council, Pozzuoli (NA), Italy, pela oportunidade de realização dos trabalhos de microscopia eletrônica de transmissão; à Cristina del Barone (ICTP-CNR, Itália) no auxílio às preparações e leitura das amostras no MET;

✓ Ao Laboratory of Inorganic Chemistry, University of Helsinki, Finland, pela oportunidade de realização dos trabalhos de MEV: Dra. Iryna Grafova (UH, Finlândia) pela sua assistência qualificada na preparação de amostras para MET; e ao Kemell (UH, Finlândia) pelas imagens de MEV;

✓ Ao Dr. Marcelo R. Ortigão (Kansas, State University) pelas análises de western-blot;

✓ À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado Amazonas – FAPEAM, pela concessão da bolsa de estudo;

✓ Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e a Universidade Federal do Amazonas – UFAM que deram a oportunidade de realização deste estudo;

✓ À Coordenação do Curso de Entomologia pela oportunidade de formação;

✓ A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

"*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei. Se não fosse por elas eu não teria saído do lugar. Pois, as facilidades nos impedem de caminhar, porém, as críticas nos colocam pra andar*".

Chico Xavier

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Proteínas de matriz peritrófica identificadas até o período de 2011.....24

Tabela 2. Distribuição por grupo proteico das 21 proteínas identificadas no banco de dados Mascot® da matriz peritrófica de *Lutzomyia umbratilis*.....44

Tabela 3. Proteínas identificadas no banco de dados Mascot® em géis 2-DE de matriz peritrófica de *Lutzomyia umbratilis* por espectrometria de massas.. 45-46

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Ilustração do trato digestório de flebotomíneo. Fonte: Adaptado por Pimenta et al. (2012).. 04

Figura 2. Características externas dos Flebotomíneos adultos. Macho (A); Fêmea (B) ingurgitada. Fonte: pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Phlebotomus_sp._6274_lores.jpg 10

Figura 3. Distribuição geográfica da transmissão de *Leishmania (Viannia) guyanensis* por *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*, de acordo com Rangel e Lainson (2003). Neste mapa estão citados somente os países e estados brasileiros em que ocorre a transmissão. Fonte/mapa: http://vitingeo.wordpress.com (Adaptado) 13

Figura 4. Ciclo de transmissão da LTA em hospedeiro vertebrado e invertebrado. Fonte: http://dc251.4shared.com/doc/9Fbkd0G8/preview.html (Acesso em: 12/02/2012) 16

Figura 5. Ilustração demonstrando localização de formação da matriz peritrófica do tipo 1 (MP-1) e do tipo 2 (MP-2) em *Aedes aegypti* Linnaeus,1762 (A) e *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (B). (IA) - intestino anterior; (IM) – intestino médio; (IP) – intestino posterior. Fonte: Marquardt e Kondratieff (2005) 19

Figura 6. Dissecção intestino médio de fêmea de *Lutzomyia umbratilis*. Separação do tórax e do abdômen (A); caracteres taxonômicos utilizados para a identificação de *Lutzomyia umbratilis* (B); abdômen isolado com a porção final do abdômen utilizado para a identificação da espécie (C) 27

Figura 7. Imagens da matriz peritrófica do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia umbratilis* dissecadas e fotografadas em momentos distintos, após a ingestão de sangue em ratos (*Rattus novergicus*). Fêmea adulta não alimentada (A), fêmea alimentada (B), MP 12 h após a ingestão de sangue (C), 24 h (D), 48 h (E) e 72 h (F). Aumento de 40X..... 35

Figura 8. Imagens do conteúdo alimento (CA) do intestino médio de fêmeas de *L. umbratilis*, mostrando a presença de matrizes peritróficas (MP) em diferentes fases de digestão (MP1 = 36-72 h e MP2 = 24-36 h). (A) – duas diferentes fases de digestão de alimento, migrando da região anterior (a) para a posterior (p). (B) – Epitélio (Ep) do intestino médio e MP. (C-E) - MP degradada (MP1) dispersa no novo sangue ingerido, envolvida pela nova MP. Aumento 40 X.. 36

Figura 9. Micrografias eletrônicas de transmissão da matriz peritrófica (PM) do intestino médio de fêmea de *Lutzomyia umbratilis*, dissecadas após: 36 h (A-B), a 48 h (C), e 72 h (D) do repasto sanguíneo 37

Figura 10. Microscopias eletrônicas de varredura da matriz peritrófica (MP) do intestino médio de fêmea de *Lutzomyia umbratilis* mostrando detalhes da superfície da MP após 24 h do repasto sanguíneo. A MP é formada por uma camada fibrilar como mostrada em A-B, com a camada granular em zonas diferentes ao longo da superfície da MP. Em A, também é possível observar o aspecto sinusoidal da superfície da MP. 39

Figura 11. Micrografias eletrônicas de varredura do intestino médio de fêmea de *Lutzomyia umbratilis*, dissecadas a partir de 24 h após o repasto sanguíneo. Superfície do intestino médio abdominal (A). Em destaque (círculo) os feixes de fibras (setas) do epitélio abdominal do inseto (B).....40

Figura 12. Seções histológicas transversais (3µm) do intestino médio de fêmeas de *L. umbratilis,* 24 h após o repasto sanguíneo, demonstrando por meio de corantes específicos a presença na matriz peritrófica (MP) [seta] de: glicoproteínas ácidas sulfatadas de pH 1,0 (A); glicoproteínas ácidas carboxiladas de pH 2,5 (B); proteínas totais (C); e glicoconjugados neutros (D). conteúdo alimentar (CA). As seções foram registradas em um microscópio óptico/aumento de 100x. 41

Figura 13. Perfil unidimensional de proteínas da matriz peritrófica de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* separadas por SDS-PAGE 10% e coradas por nitrato de prata. Padrão (P). Amostra (A).....42

Figura 14. Perfil bidimensional (2DE), gel corado com Coomassie-Blue coloidal de matriz peritrófica de fêmeas de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*

alimentadas com sangue de rato wistar. Localização dos 21 "*spots*" identificados por espectrometria de massas. 43

Figura 15. Resultados do western blot com anticorpo anti-peritrofina da MP de *P. papatasi* do tipo 1 (1); MP de *L. umbratilis* (2); escala de peso molecular (MW). 47

RESUMO

A espécie *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* é o principal vetor da *Leishmania (Viannia) guyanensis* na região amazônica. A infecção ocorre no momento da alimentação sanguínea da fêmea de flebotomíneo. Os protozoários então ficam confinados ao trato digestivo do inseto. Durante várias etapas do seu desenvolvimento, os flagelados ficam ligados à parede do intestino médio abdominal pelo flagelo. No entanto, o parasito precisa escapar de um número de obstáculos no intestino do flebotomíneo, antes da digestão completa do sangue. A matriz peritrófica (MP) secretada por inseto hematófago pode atuar como uma das barreiras. Neste contexto, a imagiologia de diferentes regiões do intestino médio e da MP, a determinação da composição proteica destas estruturas precisa ser cuidadosamente investigada. Fêmeas de *L. umbratilis* foram coletadas em uma área de treinamento militar (CIGS, Manaus-Itacoatiara, AM, BR) e alimentadas experimentalmente em ratos. O intestino médio e a MP foram analisados. O tempo da formação da MP após a ingestão de sangue e sua degradação foi determinado. Detalhes morfológicos importantes da MP e do intestino médio abdominal foram estudados por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV), a sua composição química foi analisada por histoquímica e eletroforese em gel bidimensional aliada a espectrometria de massas ESI-QTof. Nas dissecções a fresco foi observado que a MP se forma completamente em 24 h, possui um aspecto gelatinoso e se degrada em 72 h. Uma segunda MP é secretada após um novo repasto sanguíneo. A MP apresentou uma estrutura de rede fibrilar bem formada e foi observada por MET após 24 h, assim como a sua degradação contínua em 72 h. A face ecto-peritrófica do intestino médio foi observada e considerada uma massa espessa com várias bandas transversais, esta pode, evidentemente, ser atribuída aos músculos da região abdominal. Nesta face, a MP demonstrou a presença de grumos. As análises Histoquímicas revelou que o componente principal da MP é proteína, seguido por glicoproteínas (com diferentes glicanos carboxilados e sulfatados) e glicoconjugados neutros. Das proteínas isoladas do intestino médio e da MP de *L. umbratilis,* em um intervalo de 24 h a 72 h de digestão sanguínea, foram expressas 81 das quais 60 não se correlacionaram com as proteínas já depositadas em bancos de dados conhecidos (NCBI, UniProtKB , FlyBast) levando-se em consideração que o genoma do gênero *Lutzomyia* não foi sequenciado até à data deste estudo. Do total expresso, 21 proteínas foram identificadas e distribuídas nos grupos das glicoproteínas (5), proteoglicanos (3), nucleuproteínas (7), cromoproteínas (1), das quais, cinco, com função desconhecida. Algumas destas proteínas estão correlacionadas com a formação, resistência, adesão, estrutura, manutenção e degradação da MP. Pela primeira vez, a estrutura da MP é descrita em detalhes para a espécie *L. umbratilis* usando uma combinação de microscopia eletrônica (MET e MEV) e por análise histoquímica. Eventuais funções dos componentes estruturais da MP e sua importância para o desenvolvimento de parasitos *Leishmania* foram discutidas.

Palavras-chave: Matriz Peritrófica, Microscopia, Proteínas, Gel bidimensional.

ABSTRACT

Sand fly *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* is the primary vector of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Amazon region. Infection occurs when the blood supply of the female sandfly. Protozoa are then confined to the digestive tract of the insect. During several steps of their development, the flagellates are attached to the gut wall by flagellum. However, the parasite needs to escape of a number of barriers in the sand fly gut before a complete blood meal digestion. Peritrophic matrix (PM) secreted by blood-sucking insect is one of those barriers. In this context, imaging of different regions of the midgut and PM, determination of protein composition of the latter need to be thoroughly investigated. Females of *L. umbratilis*, were collected in a military training area (CIGS, Manaus-Itacoatiara, AM, BR) and fed experimentally in rats. The sandfly's midgut and PM were analysed, timeframe of the PM formation after the blood meal ingestion and its degradation were determined. Important morphological details of the *L. umbratilis* sand fly PM and of the midgut were studied by transmission (TEM) and scanning (SEM) electron microscopies, its chemical composition was analysed by histochemistry. Complete formation of the PM was observed in 24 h in the dissections. It has a gelatinous aspect and degrades in 72 h. The second PM is secreted after a second- new blood meal. A well-formed fibrillar network structure of the PM was observed by TEM after 24 h, as well as its continuous degradation in 72 h. The ecto-peritrophic face of the midgut was found to be a thick mass with several transversal bands, the latter may evidently be attributed to muscles of the abdominal region, and the PM demonstrated the presence of lumps. Histochemical analysis showed that main PM component is protein, followed by glycoproteins (with different carboxylated and sulfated glycans) and neutral glycoconjugates. The proteins separated from the of midgut and PM of *L. umbratilis* fed in an interval of 24h to 72h were investigated using the 2-D gel electrophoresis (2-DE) and sequenced by ESI-QToF mass spectrometry. Also, one has to consider that genome of *Lutzomyia* has not been sequenced up to date. Thus, it was interesting to find out that 60 proteins identified by 2-DE were not correlated with those already deposited in known databases (NCBI, UniProtKB, FlyBast), among the total of 81 protein expressed. In this study, 21 proteins classified as glycoproteins (5), proteoglycans (3), nucleoprotein (7) and chromoprotein (1) were identified, five of them with unknown function. Some of those relate to the matrix formation, resistance, adhesion, structure, maintenance and degradation. For the first time, the PM structure is described in detail for *L. umbratilis* species using a combination of electron microscopy (SEM and TEM) and histochemical analysis. Possible roles of the PM structural components and their importance for the development of *Leishmania* parasites are discussed.

Keywords: Peritrophic Matrix, Microscopy, Proteins, Two-dimensional gel.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS viii
LISTA DE FIGURAS ix
RESUMO xii
ABSTRACT xiii
1. INTRODUÇÃO 1
1.1- Considerações gerais 1
1.2- O trato digestório e a digestão em insetos hematófagos 2
1.3- A matriz peritrófica 5
2. REVISÃO DE LITERATURA 7
2.1- As leishmanioses 7
2.2- As leishmânias e reservatórios naturais 8
2.3- Aspectos gerais dos flebotomíneos 9
2.4- Classificação e distribuição dos flebotomíneos 11
2.5- O vetor *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward e fraiha, 1977 12
2.6- Ciclo de transmissão da leishmaniose e a infecção natural em flebotomíneos 14
2.7- Competência, capacidade vetorial e barreiras naturais 17
2.8- Características gerais da matriz peritrófica 18
2.9- Estudos proteicos e ultraestruturais da matriz peritrófica de insetos 20
3. OBJETIVOS 25
3.1- Geral 25
3.2- Específicos 25
4. MATERIAL E MÉTODOS 26
4.1- Coleta de flebotomíneos 26
4.2- Alimentação e indução a formação da matriz peritrófica 26
4.3- Preparação do intestino médio para análise em microscopia eletrônica 27
4.3.1- Microscopia Eletrônica de Transmissão 27
4.3.2- Microscopia Eletrônica de Varredura 28
4.4- Testes histoquímicos 29
4.5- Preparo das amostras para análise proteica 30
4.6- Eletroforese unidimensional/SDS-PAGE 30
4.7- Eletroforese bidimensional (2-DE SDS PAGE) 30
4.8- Análise de imagens dos géis bidimensionais 32
4.9- Digestão das proteínas e espectrometria de massas ESI-QTof (Electrospray Ionization) 32
4.10- Análise de Western blot 33
5. RESULTADOS 34
5.1- Formação da matriz peritrófica e análise ultraestrutural do intestino médio abdominal de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis.* 34
5.2- Análise histoquímica da matriz peritrófica 38
5.3- Perfil uni e bidimensional do intestino médio abdominal de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis.* 38
5.4- Perfil do Western blot 44
6. DISCUSSÃO 48
6.1- Formação da matriz peritrófica, análise ultraestrutural e histoquímia do intestino médio abdominal de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis.* 48
6.2- Perfil uni e bidimensional do intestino médio abdominal de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis.* 52
6.3- Detecção de Peritrofina-1 da matriz peritrófica de *Lutzomyia* umbratilis, pela técnica de *Westen Blot* 57
7. CONCLUSÕES 59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61
9. ANEXO 80

1. **INTRODUÇÃO**

1.1- Considerações gerais

As doenças transmitidas ao homem por insetos hematófagos tem como ponto de partida para a infecção a ingestão de sangue infectado obtido pela realização do repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado. Assim, o comportamento e a dinâmica da alimentação destes vetores e da fisiologia durante o processo de digestão é determinante na transmissão de patógenos por esses insetos. Os flebotomíneos são insetos considerados importantes para a saúde pública em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, por serem potenciais transmissores de diversas doenças ao homem, como as leishmanioses. Na Amazônia a espécie *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward e Fraiha, 1977 é o principal vetor da *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954 causadora da forma clínica cutânea/mucocutânea da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Estes parasitos realizam parte do ciclo de desenvolvimento no vetor, sendo assim considerado, um alvo potencial para o controle da doença. Os parasitos que se desenvolvem dentro do intestino médio (IM) desses insetos tem que ultrapassar diversas barreiras naturais, uma delas a de transpor a matriz peritrófica (MP) e o epitélio do intestinal médio abdominal. A MP é uma camada extracelular que circunda completamente o conteúdo alimentar que tem como principal função proteger o epitélio do intestino contra danos físicos e abrasivos, além de auxiliar a digestão. Consequentemente, a MP pode atuar como uma barreira natural parcial contra a invasão de parasitos no IM e, especula-se que, modificações da MP podem conduzir a uma barreira completa para infecção. Para

tal, o conhecimento da distribuição da espécie, de sua fisiologia e das macro/micro barreiras no inseto que se formam durante e após a digestão do sangue, é de importância epidemiológica necessária a melhor compreensão da interação parasito/vetor e a formulação de estratégias de controle da doença.

1.2- O trato digestório e a digestão em insetos hematófagos

Durante a hematofagia os flebotomíneos podem ser usados como hospedeiros por um grande número de microrganismos, os quais podem colonizar, crescer e se reproduzir, principalmente, no trato digestório, associados ao lúmen e ao epitélio intestinal (Lilburn et al., 2001, Lemke et al., 2003; Dillon e Dillon, 2004).

O trato digestório de insetos hematófagos é composto por uma camada de células epiteliais que se estende da abertura da região anterior (cavidade bucal) até a região posterior que corresponde ao ânus (Romoser, 1996). Este trato divide-se em três regiões principais que são: *(a) intestino anterior* - IA; *(b) intestino médio* - IM; e *(c) intestino posterior* – IP. Cada uma destas regiões é especializada em funções particulares no processo digestivo (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994) [Figura 1]:

(a) O IA está envolvido com a ingestão, condução e armazenamento de alimento. Contém dois êmbolos de sucção, a bomba cibarial e a faringeana, que servem para a ingestão do alimento, o canal proboscídeo, as glândulas salivares e o esôfago. Próximo ao final do esôfago surge três divertículos: dois dorsolaterais e um ventral. Comparativamente, os divertículos dorsais são menores que o ventral, ou papo, que, quando cheio, fica bastante dilatado na região abdominal. Normalmente, todos os três divertículos apresentam-se cheios de ar e são usados como

reservatórios de alimentos ricos em açúcares (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994);

Na terminação do esôfago existe uma estrutura denominada cárdia ou válvula de estomodeu, responsável pelo direcionamento das dietas ingeridas pela fêmea do mosquito. Quando a fêmea ingere sangue, a válvula abre-se e o sangue é armazenado no intestino médio; entretanto, quando esse inseto ingere substâncias adocicadas, a válvula permanece fechada e a substância é encaminhada para o divertículo (Romoser, 1996).

(b) O IM é formado por células epiteliais colunares que secretam as enzimas digestivas. Na região luminal estas células possuem microvilosidades, que favorecem a absorção de nutrientes. Este intestino longitudinalmente é dividido em uma região anterior (em forma de tubo) e uma posterior (em forma de saco). A região posterior é altamente expansível e é o local de destino para armazenagem do sangue digerido e absorção de nutrientes (Graf et al., 1986; Billingsley e Lehane, 1996);

O IM, diferentemente do IA e IP, não é coberto com cutícula protetora, estando em contato direto com o ambiente externo. No lúmen do IM é sintetizada, uma matriz quitino-protéica, após a ingestão do sangue, denominada *matriz peritrófica*, que envolve o alimento ingerido e separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, formando o espaço endoperitrófico (dentro da matriz peritrófica) e o ectoperitrófico (fora da matriz peritrófica) [Terra, 1990];

Por sua vez, os alimentos ricos em açúcares são direcionados para o divertículo, onde a digestão é iniciada pela ação de carboidrases oriundas da glândula salivar (Schaefer e Miura, 1972; Marinotti et al., 1996). Posteriormente, os açúcares são, paulatinamente, transferidos para o IM onde a digestão é finalizada. O

IM é também, o principal sítio de interação entre o inseto e os patógenos, no estabelecimento da infecção (Sanders et al., 2003).

(c) O IP é composto pelo íleo, ampola retal e ânus (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994), sendo responsável pela excreção de resíduos oriundos do IM e túbulos de Malphigihi. Estes túbulos, localizados na junção entre o IM e o IP, são órgãos de excreção e de regulação da composição da hemolinfa (Romoser, 1996).

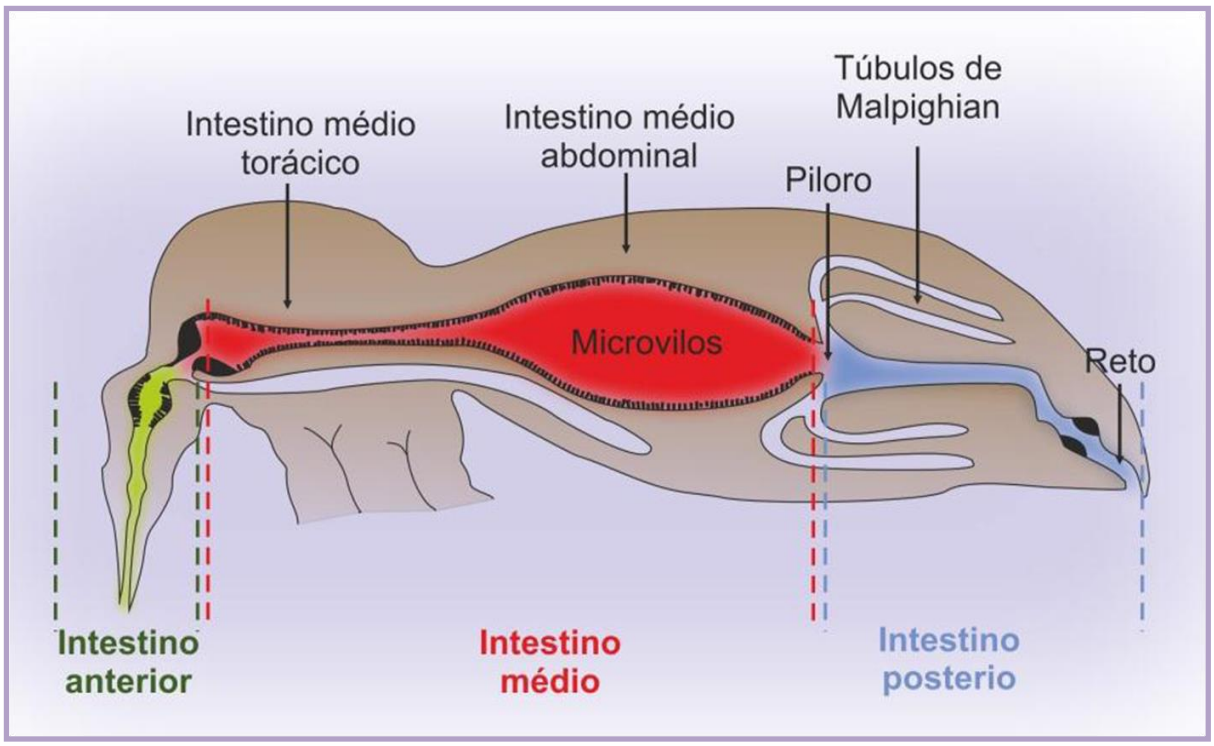

Figura 1. Ilustração do trato digestório de flebotomíneo. Fonte: Adaptado por Pimenta et al. (2012).

1.3- A matriz peritrófica

Após a alimentação sanguínea da fêmea de flebotomíneo ocorre a formação da MP, uma camada extracelular constituída por quitina, fibrilas de quitina, proteínas (peritrofinas), glicoproteínas e proteoglicanos, formando uma flexível rede que reveste completamente o alimento ingerido no interior do intestino dos insetos (Wang e Granados, 2001).

Esta estrutura além de funcionar na proteção do epitélio intestinal contra danos mecânicos causados por partículas sólidas de alimento, também facilita os processos digestivos, compartimentalizando enzimas e proteínas envolvidas na digestão, e consequentemente, pode atuar como barreira vetorial às invasões de microrganismos e outros parasitos (Tellam et al., 1999).

Propriedades físico-químicas e bioquímicas da MP tais como, sua espessura e o tempo de degradação podem estar relacionados com a capacidade de sobrevivência de diferentes espécies de parasitos dentro de insetos vetores (Huber et al., 1991; Shahabuddin et al., 1993). A espessura e elasticidade da maioria das MP dos insetos atestam o seu potencial de funcionar como uma barreira protetora entre o conteúdo do lúmen intestinal e os tecidos dos insetos (Tellam, 1996).

Embora as funções do IM e da MP sejam conhecidas em diversos grupos de artrópodes e algumas de suas proteínas terem sido alvo de estudo no controle de insetos praga, na pecuária (East et al., 1993) e na agricultura (Pechan et al., 2002), em flebotomíneos esses conhecimentos ainda são escassos.

Com as inovações de estudos proteômicos, as pesquisas relacionadas com a expressão e a funcionalidade das proteínas têm apresentado grandes avanços em diversos sistemas biológicos. Esta tecnologia que envolve uma combinação das

técnicas de eletroforese em gel bidimensional (2D-E) e espectrometria de massas (EM), capaz de separar centenas ou milhares de proteínas em um único experimento e identificar o conteúdo proteico de cada região do gel (Mann et al*.,* 2001; Nyman, 2001), neste estudo, pôde auxiliar na identificação dos constituintes proteicos do epitélio do IM e aquelas envolvidas na formação, manutenção e degradação da MP, tornando-se a melhor estratégia disponível para identificação em larga escala do conjunto de proteínas resultantes da expressão gênica.

Além destes estudos bioquímicos, outros métodos como a microscopia eletrônica e histoquímica foram importantes aliados para um amplo entendimento morfológico e químico do epitélio do IM e da MP, auxiliando na identificação e análise dos seus componentes. Os dados da literatura apresentados neste estudo são bastante genéricos e baseados nos escassos manuscritos que se tem a respeito do estudo do IM e da composição química da MP, em flebotomíneos.

Este trabalho pode contribuir para estudos posteriores, a fim de propor um modelo de formação, manutenção e degradação entre os componentes proteicos do epitélio do IM e da MP de flebotomíneos vetores, buscando alternativas de controle destes insetos e, consequentemente, das doenças transmitidas por estes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- As leishmanioses

As leishmanioses são doenças crônicas, não contagiosas, de manifestação visceral (Leishmaniose visceral - LV) ou cutânea (Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA) [Brasil, 2007] que são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), transmitida ao ser humano e a outros animais pela picada de insetos hematófagos, flebotomíneos. Estas doenças estão presentes em 98 países ou territórios (sendo, 76 em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento), distribuídos nos continentes das Américas, Europa, África, Ásia (WHO, 2010) e Austrália (Rose et al., 2004).

Mais de 350 milhões de pessoas encontram-se em áreas de risco e, a cada ano, 500 mil são acometidas com a forma visceral e 1,5 milhões a forma tegumentar da doença (Desjeux, 2004; WHO, 2010). Desta forma, a LTA é considerada como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (Brasil, 2007).

No continente Americano já foram registrados mais de 66.000 casos de LTA (Alvar et al., 2012), desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (Funasa, 2000), exceto o Uruguai e Chile (Skraba et al., 2014).

Na América Latina, a doença já foi registrada em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorreram no Brasil com 26.008 casos/ano (Brasil, 2014), seguido de Colômbia (17.420 casos/ano), Peru (6.405 casos/ano), Bolívia (2.647 casos/ano) e Argentina (261 casos/ano) [Alvar et al., 2012]. No Brasil, somente no

período de 2003 a 2012, foram registrados mais de 250.000 casos de LTA, sendo 103.397 na Região Norte, 78.188 na Nordeste, 39.173 na Centro-Oeste, 24.306 na Sudeste e 5.639 na Sul (Sinan net, 2014).

Portanto, a LTA é uma zoonose em franca expansão geográfica, considerada uma das infecções dermatológicas mais importantes não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, pela sua magnitude e pouca vulnerabilidade as medidas de controle, se tornando, portanto, um importante problema de saúde pública (Brandão-Filho et al*.,* 1994).

2.2- As leishmânias e reservatórios naturais

Na Amazônia, a LTA pode ser ocasionada por sete espécies de leishmânias, sendo:

(i) Seis do subgênero *Viannia* Lainson e Shaw, 1987:

- *L. (V.) braziliensis* Vianna, 1911;
- *L. (V.) guyanensis* Floch, 1954;
- *L. (V.) lainsoni* Silveira*,* Shaw*,* Braga e Ishikawa*,* 1987;
- *L. (V.) naiffi* Lainson e Shaw, 1989;
- *L. (V.) shawi* Lainson, Braga e Souza, 1989;
- *L. (V.) lindenbergi* Silveira, Ishikawa e Souza, 2002.

(ii) Uma do subgênero *Leishmania* Ross, 1903:

- *L. (L.) amazonensis* Lainson e Shaw, 1972.

A comparação entre dados clínicos da doença e os agentes etiológicos revelou que 83% dos casos notificados na região amazônica são ocasionados pela

L. (V.) guyanensis (Silveira et al*.,* 2002). Esta espécie tem sido encontrada ao norte da América do Sul em floresta primária de terra firme, tendo como hospedeiros vertebrados: *Choloepus didactylus* Linnaeus, 1758 (preguiça-real), *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (tamanduá) e *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 (mucura); e, hospedeiros invertebrados: *L. umbratilis*, *L. anduzei* Rozeboom, 1942 e *L. whitmani* Antunes e Coutinho, 1939 (Arias e Naiff, 1981).

2.3- Aspectos gerais dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos com ciclo de vida holometábolo, caracterizado por apresentar as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os adultos podem medir cerca de 2 a 5 mm de comprimento e ambos os sexos apresentam dimorfismo sexual acentuado. O corpo é recoberto por inúmeras cerdas e quando pousados as asas permanecem em forma de ponta de lança, mantidas eretas sobre o corpo e a cabeça formando um ângulo de 90º com o tórax (Figura 2). Estes insetos são conhecidos popularmente no Brasil como asa branca, asa dura, birigui, cangalinha, mosquito-palha, tatuquira, frebóti, entre outros (Forattini, 1973).

Os flebotomíneos possuem hábitat diversificados e podem ser encontrados em regiões semiáridas, florestas, áreas serranas, chegando a alcançar áreas urbanas. Devido ao hábito crepuscular e noturno, estes insetos costumam permanecer em seus abrigos durante as horas luminosas do dia, abandonando-os no período crepuscular em busca de alimento (Forattini, 1973).

Os adultos de ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte de energia, alimentando-se de seiva de plantas, néctar (Christensen et al*.,* 1982;

Alexander e Usma, 1994), secreções de afídeos e frutas maduras (Cameron et al., 1995).

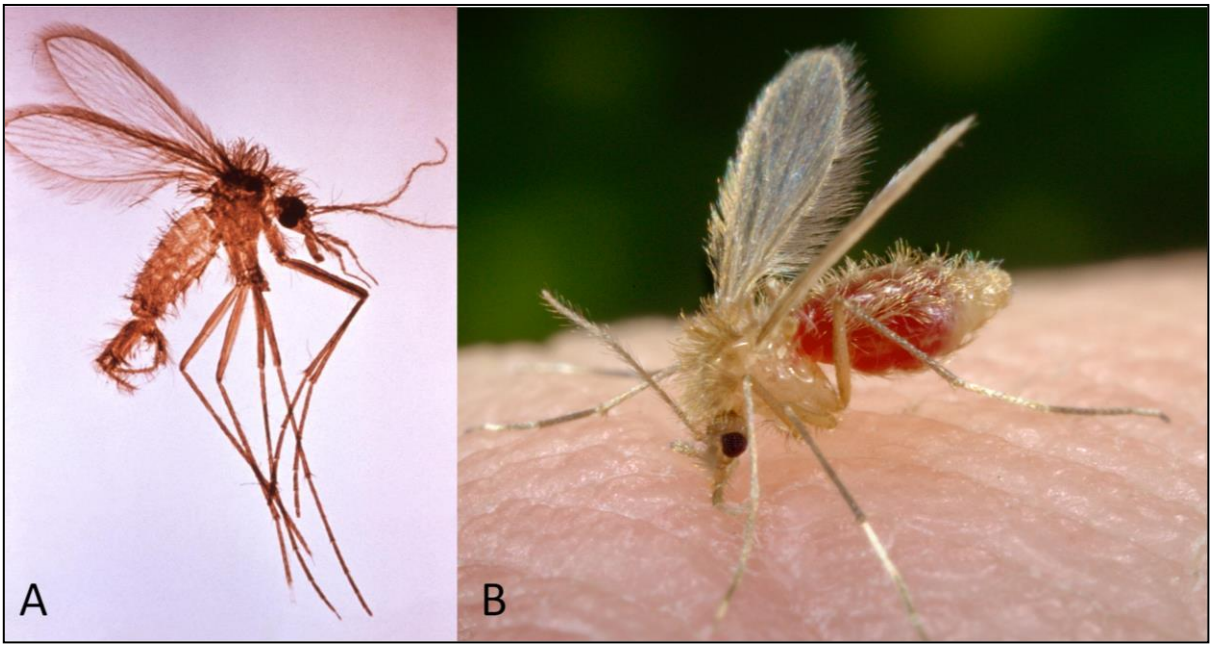

Figura 2. Características externas dos Flebotomíneos adultos. Macho (A); Fêmea (B) ingurgitada (Fonte: pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Phlebotomus_sp._6274_lores.jpg).

As fêmeas, entretanto, apresentam o hábito de sugar o sangue de vertebrados, necessário à maturação de seus ovos. Essa característica os inclui dentro de um grupo de importância epidemiológica. Em florestas tropicais, a fonte de alimentação sanguínea de fêmeas adultas destes insetos são, principalmente, edentados (*C. didactylus*; *T. tetradactyla*; roedores (*p. ex*.: *Proechimys guyanensis* Desmarest, 1817 - rato-soiá) e marsupiais (*D. marsupialis*) que habitam este tipo de floresta (Lainson et al*.,* 1981).

Em *Lutzomyia longipalpis* Lutz e Neiva, 1912, durante o hematofagismo ocorre a inoculação de saliva que contém maxadilan (Lerner et al., 1991), uma substância vasodilatadora que inibe a ação dos macrófagos, facilitando a

proliferação de vários agentes etiológicos de doenças que acometem o homem como as leishmanioses, bartonelose e algumas arboviroses (Pessoa e Martins, 1982; Corn et al*.,* 1990). Além destas doenças, os flebotomíneos podem ser hospedeiros de bactérias, fungos, determinadas espécies de plasmódios, hemogregarinas, tripanossomas e endotrípanos (Christensen e Herrer, 1976; Warburg, 1991; Shaw, 1992).

2.4- Classificação e distribuição dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Sua classificação baseia-se na morfologia dos adultos, machos e fêmeas, tendo a subfamília agrupando seis gêneros, sendo três no Velho Mundo (Ásia, África e Europa): *Phlebotomus* Rondani e Berté, 1840*; Sergentomyia* França e Parrot, 1920; e *Chinius* Leng, 1987 e, três no Novo Mundo (continente americano): *Brumptomyia* França e Parrot, 1921; *Lutzomyia* França, 1924; e *Warileya* Hertig, 1984 (Young e Duncan, 1994).

Atualmente, 927 espécies de flebotomíneos já foram descritas no mundo e destas, 32 estão relacionadas com a transmissão das leishmanioses ao homem (Grimaldi e Tesh, 1993; Rangel e Lainson, 2003; Brasil, 2006). Somente nas Américas, cerca de 500 táxons têm sido registrados, destes 400 espécies pertencem ao gênero *Lutzomyia*, cerca de 267 tem registro no Brasil e 19 são vetoras de leishmanioses (Alexander, 2000; Rangel e Lainson, 2003; Shimabukuro e Galati, 2010). Este gênero é considerado o mais importante por conter o maior número de espécies envolvidas na transmissão das leishmanioses (Brasil, 2007).

Além das leishmânias, os flebotomíneos são hospedeiros de bactérias, fungos, determinadas espécies de plasmódios, hemogregarinas, tripanossomas e endotrípanos (Christensen e Herrer, 1976; Warburg, 1991; Pessoa et al., 2007).

No Amazonas, quatro espécies de flebotomíneos são comprovadamente vetoras da LTA: *Lutzomyia (Nyssomyia) anduzei* Rozeboom, 1942, *L. (N.) flaviscutellata* Mangabeira, 1942, *L. (N.) olmeca nociva,* Young e Arias 1982 e *L. (N.) umbratilis* (Arias e Freitas, 1977, 1978; Lainson, 1983). Tendo esta última chamada à atenção por ser a maior transmissora da *L. (V.) guyanensis*, na região norte brasileira e na maioria dos países da Amazônia Legal (Arias e Freitas, 1977; Arias e Freitas, 1978; Rangel e Lainson, 2003; Brasil, 2007) [Figura 3].

2.5- O vetor *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward e fraiha, 1977

Estudos realizados por Almeida (1970) nas zonas periféricas de Manaus (Amazonas, Brasil) capturou indivíduos de ambos os sexos de uma espécie que identificou como *Lutzomyia (Nyssomyia) anduzei*, enfatizando o primeiro registro da espécie descrita por Rozeboom (1942), em território brasileiro. Entretanto, Ward e Fraiha (1977), ao estudarem o trabalho de Almeida, verificaram que o autor estava diante de uma nova espécie e a descreveram como *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*.

Arias e Freitas (1978) confirmaram *L. umbratilis* e *L. anduzei* como vetores primário e secundário, respectivamente, sendo encontrados ao norte do Rio Amazonas, na região do município de Manaus (Am, Brasil). A primeira é considerada a principal vetora da *L. (V.) guyanensis* e predomina na floresta primária

de terra firme dessa região. São consideradas altas as taxas de infecção em *L. umbratilis* por tripanossomatídeos, chegando, às vezes, a mais de 10% entre as fêmeas dissecadas. Estes mesmos autores citam que esta espécie alimenta-se com maior frequência no período noturno, atacando avidamente o homem quando perturbada em seus refúgios naturais, e durante o dia nas bases dos troncos das árvores. Apesar de ser uma espécie de floresta primária, esta espécie alcança, com relativa frequência, as casas situadas às margens da floresta.

Figura 3. Distribuição geográfica da transmissão de *Leishmania (Viannia) guyanensis* por *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*, de acordo com Rangel e Lainson (2003). Neste mapa estão citados somente os países e estados brasileiros em que ocorre a transmissão. Fonte/mapa: http://vitingeo.wordpress.com (Adaptado).

Outros trabalhos realizados no Amazonas reforçam o predomínio de *L. umbratilis* nesta região. Nery (2003) realizou estudos em um fragmento florestal urbano no município de Manaus e constatou maior abundância desta espécie nesta área, apresentando 39% (1744/4.463) em suas coletas. Franco et al. (2010) em estudos realizados em área de assentamento no município de Rio Preto da Eva (Amazonas, Brasil) verificaram o predomínio desta espécie com representatividade de 75% (6.624/8752), encontrando uma taxa de infecção de 3,89% (40/1.026). Soares (2012) em coletas de flebotomíneos no município de Tabatinga, aréa de fronteira com a Colombia e Peru, revelou o predomínio de *L. umbratilis* com 62,3% (3.577/5.741) em seus achados.

Portanto, além destes estudos, outros autores vêm comprovando a importância epidemiológica de *L. umbratilis*, tais como os realizados por Arias e Freitas (1977; 1978); Lainson, (1983); Ready et al. (1986); Castellón et al. (2000); Freitas et al. (2002); Lainson e Shaw (2005); Pessoa et al. (2007); Silva et al. (2007); Gomes et al. (2009); Gil et al. (2009); Franco et al. (2010); Nery et al. (2010); Guerra et al. (2011); e Saraiva et al. (2011).

2.6- Ciclo de transmissão da leishmaniose e a infecção natural em flebotomíneos

O ciclo de vida das leishmânias é do tipo heteroxênico, ocorrendo em hospedeiro vertebrado e invertebrado (Figura 4), segundo de van Zandbergen et al. (2004), conforme descrição a segui:

- O inseto ao picar o vertebrado, inocula, primeiramente, uma substância anti-coagulante para iniciar a ingestão de sangue, neste momento injeta as formas promastigotas (que já se encontravam em seu aparelho bucal), no local da picada e, por volta de 4 a 8 h, estes flagelados são fagocitados por neutrófilos teciduais do hospedeiro. Estes neutrófilos com as promastigotas sofrem apoptose e são fagocitadas por macrófagos;

- Nos macrófagos, as formas promastigotas se transformam em amastigotas e são encontradas no sangue 24 h após a fagocitose. As amastigotas resistem à ação destruidora dos macrófagos devido ao revestimento em sua superfíce celular por lipofosfoglicano (LPG) e se multiplicam intensamente, até ocupar todo o citoplasma. O macrófago então se rompe, liberando as amastigotas, que vão ser fagocitados por outros macrófagos, iniciando assim, uma reação inflamatória;

- O inseto ao procurar por alimento e exercer a hematofagia em vertebrado infectado ingere macrófagos contendo as formas amastigotas do parasito. Ao chegarem ao estômago do inseto, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas. Estas amastigotas, após sucessivas divisões binárias, transformam-se rapidamente em promastigotas, que se multiplicam ainda no sangue ingerido, que é envolto pela MP. Por volta do 3º ou 4º dia, as formas promastigotas transpõem a MP e ficam livres, e em contínua reprodução.

De acordo com Lainson et al. (1979) e Grimaldi e Tesh (1993), as promastigotas podem seguir dois caminhos, dependendo da espécie de parasito:

(1º) Do subgênero *Viannia* do “complexo *brasiliensis*” vão migrar para as regiões do piloro e do íleo (seção peripilária ou intestino posterior). Nestes locais elas se transformam de promastigotas para paramastigotas, aderindo ao epitélio do intestino do inseto;

(2º) Do subgênero *Leishmania* do “complexo *mexicana*” vão migrar para as regiões da seção suprapilária ou intestino médio e anterior. Novamente se transformam em promastigotas e migram para a região da faringe do inseto. Neste local se transformam novamente em paramastigotas e a partir daí vão se transformando em pequenas promastigotas infectantes, altamente móveis, que se deslocam para o aparelho bucal do inseto.

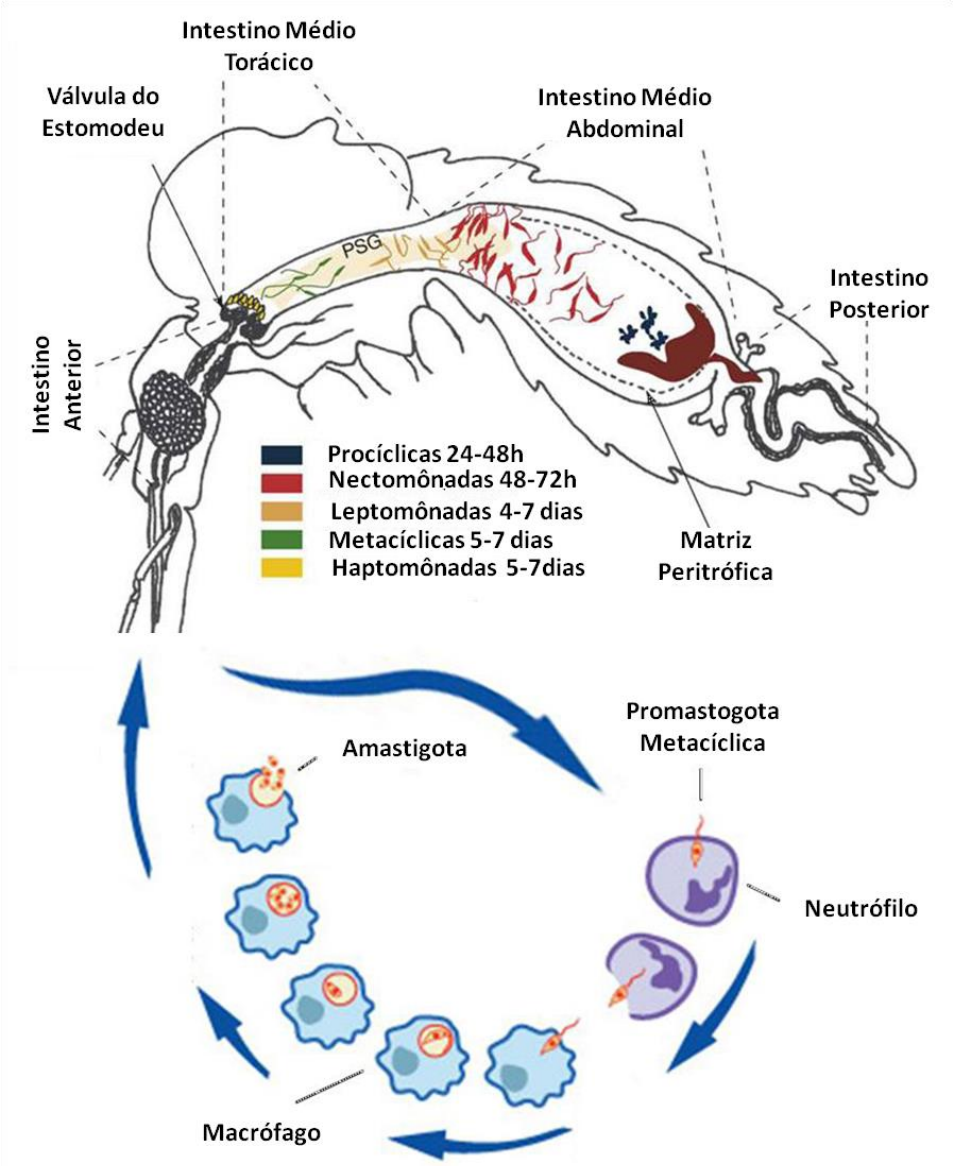

Figura 4. Ciclo de transmissão da LTA em hospedeiro vertebrado e invertebrado. Fonte: http://dc251.4shared.com/doc/9Fbkd0G8/preview.html.

2.7- Competência, capacidade vetorial e barreiras naturais

A competência vetorial é a propriedade biológica inata do inseto vetor em se infectar, colonizar e transferir determinado patógeno a um hospedeiro em potencial (Beerntsen et al., 2000). Esta competência é fator essencial para sua capacidade vetorial, que é definida como sendo “a taxa de eficiência da transmissão do patógeno pela população de local de vetores”. Esta capacidade está relacionada a diversos fatores Tais como: comportamental (prefência alimentar), morfofisiológicos (tamanho, longevidade, duração do ciclo gonodotrófico, etc.) e ecológicos (temperatura e umidade) [Marquardt, 2004; Anderson e Rico-Hesse, 2006].

Portanto, o sucesso do ciclo de vida de uma espécie de patógeno, em determinada espécie de inseto, é fundamental para a determinação da sua competência e capacidade vetorial, estabelecida pela superação do agente etiológico pelas diversas barreiras físicas, químicas e biológicas impostas pelo vetor durante seu ciclo de desenvolvimento. Sendo assim, o parasito deve superar três importantes barreiras:

(i) sobreviver a um ataque proteolítico (Pimenta et al. 1997);

(ii) transpor a matriz peritrófica (Sádlová e Volf, 2009); e depois

(iii) aderir-se ao epitélio do intestino médio e completar seu ciclo de vida, culminado no desenvolvimento e diferenciação até formas infectivas, a fim de impedir a sua excreção com os restos do repasto sanguíneo (Pimenta et al., 1992; Pimenta et al., 1994; Kamhawi et al., 2004; Oliveira, 2005b; Kamhawi, 2006; Volf e Myshoka, 2007).

Esse mecanismo de adesão do parasito ao epitélio tem sido associado ao LPG presente na superfície das leishmânias (Sacks et al., 1994). O LPG é um

glicolipídeo abundante na superfície celular das promastigotas, inclusive no seu flagelo, protegendo-o da digestão (Oliveira, 2005b; Soares et al., 2005). Caso as promastigotas estejam dentro de uma espécie de flebotomíneo sem competência vetorial para o patógeno, ocorrerá sua destruição através da digestão, o que sugere uma especificidade de condições bioquímicas (Oliveira, 2005b).

Um dos eventos importantes neste processo de interação vetor-parasito é o movimento do patógeno em direção ao epitélio do IM do inseto, onde cada patógeno utiliza uma estratégia própria para alcançar este tecido, alguns interagem com a MP, outros a atravessam ou a evitam, durante o curso da infecção no inseto (Filho et al., 2002).

Outros estudos têm demonstrado que a entrada e sobrevivência de parasitos dentro de macrófagos, só são possíveis com a prévia infecção em neutrófilos que são recrutados como uma resposta normal à picada do inseto (Jochim e Teixeira, 2009). No entanto, os neutrófilos são células que apresentam um curto ciclo de vida e entram em apoptose, um processo crítico para o sucesso da resolução da inflamação (Savill et al., 1995), sendo estes fagocitados por macrófagos (Jochim e Teixeira, 2009).

2.8- Características gerais da matriz peritrófica

No IM da maioria dos insetos, o bolo alimentar é envolvido por uma camada acelular semipermeável, composta predominantemente de fibrilas de quitina, proteínas e glicoproteínas, formando uma flexível rede, denominada *matriz* ou

membrana peritrófica (Tellam et al, 1999; Shao et al*.,* 2001; Wang e Granados, 2001; Devenport e Jacobs-Lorena, 2005; Kato et al*.*, 2006).

A MP está presente na maioria dos insetos, exceto nas ordens como Hemiptera, Phthiraptera, Psocoptera, Zoraptera, Thysanoptera, Strepsitera, Rhaphidioptera e Megaloptera, sendo substituída por uma estrutura alternativa que desempenharia papel análogo, as membranas perimicrovilares (Peters, 1992).

São conhecidas dois tipos de MP: *o tipo 1* - secretada por todas as células epiteliais do IM em em resposta direta da ingestão de sangue, formando uma estrutura que envolve totalmente o bolo alimentar (Terra, 1996; Tellam et al*.*, 1999); *o tipo 2* - secretada por células especializadas presentes na região anterior do IM (cárdia), em resposta direta a limentação por carboidratos e cresce em direção às regiões posteriores, sendo mais resistente que a do tipo 1 (Terra, 1996) [Figura 5].

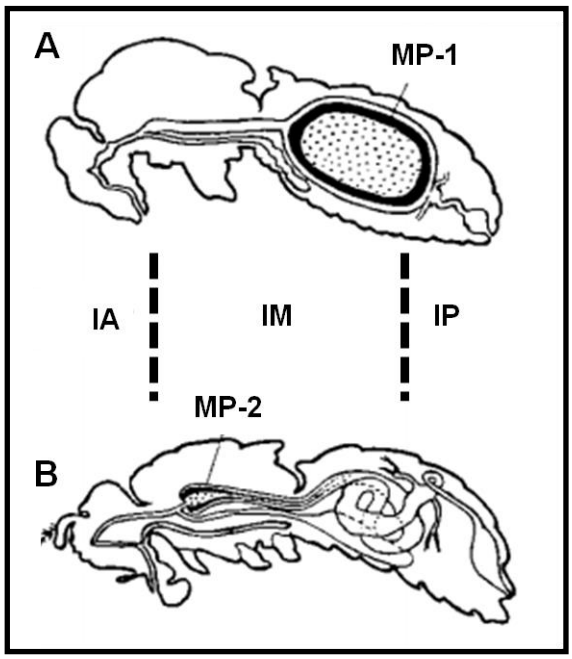

Figura 5. Ilustração demonstrando localização de formação da matriz peritrófica do tipo 1 (MP-1) e do tipo 2 (MP-2) em *Aedes aegypti* Linnaeus,1762 (A) e *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (B). (IA) - intestino anterior; (IM) – intestino médio; (IP) – intestino posterior. Fonte: Marquardt e Kondratieff (2005).

A MP possui diversas funções no intestino do inseto durante o processo de digestão tendo como sua principal função a de proteger o epitélio contra danos mecânicos causados por partículas sólidas de alimento (Tellam et al., 1999), mas além desta, temos:

- Facilitar os processos digestivos, compartimentalizando enzimas e proteínas envolvidas na digestão (Tellam et al., 1999);
- Atuar como barreira às invasões de microorganismos e outros parasitos (Tellam et al., 1999);
- Participar do processo de detoxificação do grupo prostético heme (Pascoa et al., 2002) que funciona como ligante de várias enzimas, citocromos e globinas e, está envolvida no transporte ou reserva de oxigênio, reações de elétrons, metabolismo de drogas, biossíntese de esteróides, defesa antioxidante e sinalização celular (Ryter e Tyrrel, 2000);
- Desestabilizar membranas biológicas aumentando a sua permeabilidade ou mesmo levando a ruptura da mesma (Schmitt et al., 1993);
- Favorecer o desenvolvimento dos estágios iniciais das formas amastigotas, protegendo-as das atividades das proteases no trato digestório do inseto, podendo também, representar uma barreira ao desenvolvimento das formas promastigotas das leishmânias em seu interior (Walters et al., 1992).

2.9- Estudos proteicos e ultraestruturais da matriz peritrófica de insetos

Os primeiros estudos ultraestruturais em insetos foram relacionados unicamente aos caracteres externos, devido à inexistência de instrumentos de

aumento capazes de visualizar a organização interna destes. O primeiro trabalho sobre anatomia interna de insetos foi do médico italiano Malpighi, sobre o bicho da seda. O aprimoramento dos instrumentos de visualização, como as lupas, microscópios de luz, e mais recentemente, a microscopia eletrônica, tornou possível analisar e compreender uma série de fenômenos importantes, complementados obviamente com estudos relacionados à fisiologia e à bioquímica das células (Landim, 2009).

Um passo importante para o entendimento do metabolismo proteico foi o surgimento de estudos relacionados com o proteoma, que é definido como, estudo de todas as proteínas que estão presentes em uma determinada célula num determinado momento, “the *PROTE*in complement expressed by a gen*OME*”, refletindo a expressão de genes específicos em situações pontuais (Trayhurn, 2000). A proteômica engloba conhecimentos e técnicas capazes de não só identificar um conjunto de proteínas produzidas por uma célula, mas também de revelar as interações e interdependência dos processos biológicos. Ela constitui uma nova linguagem que deve ser aprendida para desvendar o significado do complexo mapa da síntese proteica (Abbott, 1999), o que pode nos auxiliar na melhor compreensão da formação, função e degradação da MP de *L. umbratilis.*

Estudos bioquímicos e moleculares a respeito da MP em insetos realizados por Bolognesi (2005) sobre a caracterização e expressão de genes de *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797; *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758*; Musca domestica* Linnaeus, 1758; demonstraram que a MP destes insetos codificavam uma peritrofina (proteínas da MP) e enzimas responsáveis pela síntese e degradação de quitina [quitina sintases 1 (SfCHS1) e 2 (SfCHS2), e quitinase (SfCHI), respectivamente] onde mostrou, usando vários modelos experimentais, que a separação de

compartimentos luminais pela MP (a) impediu a inibição de despolimerases por remover oligômeros do espaço endoperitrófico, (b) evitou a inibição de oligômero hidrolases restringindo-as ao espaço ectoperitrófico, impedindo o contato com o alimento e (c) anulou a inibição de enzimas envolvidas na digestão terminal presentes na superfície do epitélio, bloqueando o contanto do alimento com elas.

Estudos realizados por Tellam et al. (1999) revelaram que as proteínas da MP perfazem um total de 21 a 55% de sua massa estrutural e que estas proteínas podem ser agrupadas em 4 classes: classe 1 - proteínas solúveis em tampão fisiológico; classe 2 - proteínas solúveis em detergentes brandos; classe 3 - proteínas removidas apenas utilizando-se agentes desnaturantes forte (representando 11% das peritrofinas); e classe 4 - proteínas residuais insolúveis.

No entanto, em relação a sua importante função como barreira à invasão de microrganismo, a MP tem sido intensivamente investigada em alguns grupos de artrópodes (*Aedes aegypti* Linnaeus, 1762; *Triclopusia ni* Hübner, 1803; *Lucilia cuprina* Wiedemann, 1830; *Anopheles gambiae* Giles, 1902; *Chrysomyia bezziana* Villeneuve, 1914; e *Anopheles darlingi* Root, 1926), onde foram determinadas por meio de clonagem e caracterização do cDNA, as sequências de aminoácidos das peritrofinas destes insetos (Elvin et al., 1996; Shen e Jacobs-Lorena, 1998; Vuocolo et al., 2001; Wang et al., 2004; Guo et al., 2005).

Duas enzimas envolvidas na biossíntese e secreção da MP foram clonadas e sequenciadas: a glicosamina frutose-6-fosfato aminotransferase, que catalisa a formação de glicosamina-6-fosfato a partir de glutamina (doador de amida) e frutose-6-fosfato (Kato et al., 2002); e, a quitina sintase, responsável pela síntese de quitina a partir da UDP-Nacetilglicosamina (formada posteriormente a partir de glicosamina-6-fosfato) [Ibrahim et al., 2000].

A quitina sintase é expressa em homogenatos totais de fêmeas não alimentadas e alimentadas. No entanto, quando se estuda sua expressão no IM de fêmeas adultas por RT-PCR, pode-se concluir que embora se detecte a presença de RNA_m em fêmeas não alimentadas, a expressão da enzima aumenta consideravelmente em resposta à alimentação, estando o sinal presente em até 72 h após alimentação e diminuindo rapidamente por volta de 96 h após a ingestão de sangue (Ibrahim et al*.,* 2000).

Estudos proteicos, envolvendo técnicas proteômicas, da MP em flebotomíneos são escassos, no entanto, diversas proteínas da MP já foram identificadas em várias espécies de insetos (Tabela 1).

Poucos são os estudos morfológicos por microscopia eletrônica da MP de flebotomíneos. Alguns trabalhos têm sido relatados para as espécies *L. spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno e Hoyos, 1969; *Phlebotomus papatasi* Scopoli, 1786; *P. longipes* Parrot e Martin, 1939 (Gemetchu, 1974; Blackburn et al*.*, 1988; Walters et al*.*, 1993), *L. intermedia* Lutz e Neiva, 1912 (Andrade-Coelho et al*.*, 2001) e *L. longipalpis* Lutz e Neiva, 1912 (Secundino et al*.*, 2005).

Um fato interessante observado na literatura a respeito da morfologia do IM e da MP em flebotomíneos é que vários fatores estão influenciando sua formação e ela pode apresentar variações dependendo da espécie em estudo e dentro da mesma espécie de acordo com fatores como a localização geográfica da espécie e dieta alimentar (Reznik e Kuznetsova, 1983; Blackburn et al*.*, 1988).

Tabela 1. Proteínas de matriz peritrófica identificadas até o período de 2011.

ID da Proteína	kDa previsto	Função	Espécie	Referência
Lsti99	45,06	Estrutural	*Loxostege sticticalis*	Yin et al. 2011
AgAper9	9,0	Estrutural	*Anopheles gambiae*	Dinglasan et al. 2009
AgAper25 um	25,0	Estrutural	*A. gambiae*	Dinglasan et al. 2009
AgAper25 b	25,8	Estrutural	*A. gambiae*	Dinglasan et al. 2009
AgAper26	26,3	Estrutural	*A. gambiae*	Dinglasan et al. 2009
AgAper29	28,9	Estrutural	*A. gambiae*	Dinglasan et al. 2009
AgAper30	30,0	Estrutural	*A. gambiae*	Dinglasan et al. 2009
AgAper34	33,6	Estrutural	*A. gambiae*	Dinglasan et al. 2009
AgAper57	57,2	Estrutural	*A. gambiae*	Dinglasan et al. 2009
AgICHIT	40,6	Estrutural	*A. gambiae*	Dinglasan et al. 2009
AgAper14	10,1	Estrutural	*A. gambiae*	Devenport et al. 2005
AeAper50	50,0	Estrutural	*Aedes aegypti*	Shao et al. 2005
CBP1		Estrutural	*Trichoplusia ni*	Wang et al. 2004
CBP2		Estrutural	*T. ni*	Wang et al. 2004
McMUC1		Estrutural	*Mamestra configurata*	Shi et al. 2004
McPM1		Estrutural	*M. configurata*	Shi et al. 2004
Peritrofina-55	55,0	Estrutural	*Lucilia cuprina*	Tellam et al. 2003
PxIIM		Estrutural	*Plutella xylostela*	Sarauer et al. 2003
Peritrofina-15	15,0	Estrutural	*L. cuprina*	Wijffels et al. 2001
Peritrofina-15	15,0	Estrutural	*Chrysomya bezziana*	Wijffels et al. 2001
Peritrofina-48	48,0	Estrutural	*C. bezziana*	Vuocolo et al. 2001
AeIMUC1	29,65	Estrutural	*A. aegypti*	Rayms-Keller et al. 2000
Peritrofina-30	30,0	Estrutural	*L. cuprina*	Tellam et al. 1999
AgMuc1		Estrutural	*A. gambiae*	Shen et al. 1999
Peritrofina-48	48,0	Estrutural	*L. cuprina*	Schorderet et al. 1998
AgAper1	16,6	Estrutural	*A. gambiae*	Shen e Jacobs-Lorena 1998
AgChitinase		Estrutural	*A. gambiae*	Shen et al. 1999
Peritrofina-95	95,0	Estrutural	*L. cuprina*	Casu et al. 1997
IIM		Estrutural	*T. ni*	Wang e Granados 1997a
Peritrofina-44	44,0	Estrutural	*L. cuprina*	Elvin et al. 1996

3. OBJETIVOS

3.1- Geral

✓ Analisar aspectos químicos e ultraestruturais do intestino médio abdominal e da matriz peritrófica (MP) de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*.

3.2- Específicos

✓ Analisar os aspectos químicos e ultraestrutura do epitélio do intestino médio abdominal e da MP de *L. umbratilis* por meio de microscopia eletrônica (transmissão e varredura);

✓ Identificar o tempo de formação e degradação da MP a partir das dissecções a fresco, de seções de microscopia óptica esterioscópia e microscopia eletrônica, nos períodos de 24, 30, 48 e 72 horas após a ingestão de sangue;

✓ Verificar por meio de testes histoquímicos os tipos de proteínas existentes na MP, após 24 h de digestão sanguínea;

✓ Identificar as proteínas do intestino médio de *L. umbratilis* por meio de técnicas em gel uni e bidimensional e espectrometria de massas MALDI TOF;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Coleta de flebotomíneos

As fêmeas de *L. umbratilis* foram capturadas na reserva militar Marechal Rondon (BI1) do Centro de Instrução de Guerra na Selva (CIGS), localizada no Km 65 da rodovia AM-010 (Manaus-Itacoatiara, AM, BR), com armadilha de luz do tipo CDC (modificada para aspiração). Nesta reserva há uma predominância de espécimes de *L. umbratilis*, sendo coletadas em grande número em base de árvores, como demonstraram estudos realizados nesta área por Gomes (2003).

4.2- Alimentação e indução a formação da matriz peritrófica

As fêmeas de flebotomíneos, recém-capturadas não ingurgitadas realizaram o repasto sanguíneo diretamente sobre a pele de ratos adultos Wistar (*Rattus novergicus* Berkenhout, 1769), previamente anestesiados (cloridrato de cetamina a 10%/Syntec). Apósa a alimentação, as fêmeas completamente ingurgitadas foram isoladas e mantidas a temperatura de 25-28°C e umidade de 85-99%, em seguida receberam solução de sacarose a 10%, até a sua dissecção.

A figura 6 demonstra as etapas de dissecção, onde as fêmas ingurgitadas foram imobilizadas colocadas na geladeira por 3 min e, em seguida, dissecadas em solução salina estéril (NaCl 0,95%). A identificação da espécie foi feita de acordo com a classificação de Young e Duncan (1994).

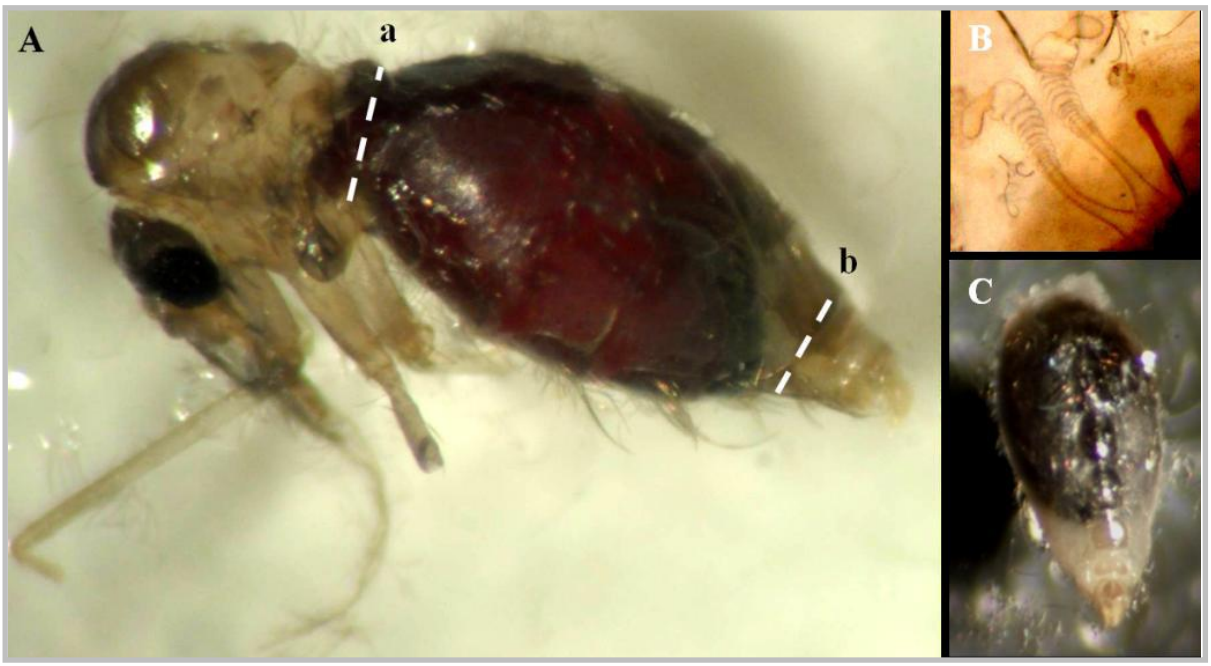

Figura 6. Dissecção intestino médio de fêmea de *Lutzomyia umbratilis*. Separação do tórax e do abdômen (A); caracteres taxonômicos utilizados para a identificação de *Lutzomyia umbratilis* (B); abdômen isolado com a porção final do abdômen utilizado para a identificação da espécie (C).

4.3- Preparação do intestino médio para análise em microscopia eletrônica

4.3.1- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise e observação da MP do intestino médio de *L. umbratilis* por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), as amostras dissecadas foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% com tampão cacodilato de sódio (0,1M e pH 7,2) em overnigth a 4°C e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, contendo ferrocianeto de potássio a 0,8%. A contrastação em bloco do material foi realizada com acetato de uranila a 2,5% em acetona a 50%. A desidratação das amostras

ocorreu em séries crescentes de acetona nas concentrações de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Em seguida, as amostras foram inclusas em resina de Epon 8715 para microtomia.

Seções transversais e longitudinais com 70 nm de espessura obtidas por meio de ultramicrótomo foram montadas em grades (300 mesh). As seções foram contrastadas em acetato de uranila e depois tratadas com citrato de chumbo. As imagens foram obtidas no MET ZEISS, 80 kV.

Algumas amostras foram preparadas sem a utilização de contraste, desidratadas em séries crescentes de acetona (30, 60, 90 e 100%) e incluídas em resina de Epoxi 45359 (kit de Fluka). As amostras foram ultraseccionadas à temperatura ambiente no ultramicrótomo Leica EM UC6/FC6. As secções foram obtidas a uma velocidade de 1,0-2,0 mm/s e uma espessura de 80-90 nm, em seguida, foram colocadas em grades de cobre de 400 mesh. As observação da MET foram realizadas por meio de um microscópio eletrônico de transmissão FEI TECNAL G12 Spirit-Twin (fonte LaB_6) equipado com um fundo montado FEI Eagle-4k, câmera CCD (Eindhoven, Holanda), operando com uma voltagem de aceleração de 120 kV.

4.3.2- Microscopia Eletrônica de Varredura

As fêmeas ingurgitadas para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram fixadas e desidratadas de acordo com a metodologia utilizada para análise em MET. Estas foram processadas em um secador de ponto crítico de CO_2, por sucessivas passagens a uma temperatura de 4°C. As amostras

foram secadas em temperatura ambiente por 24 h e montadas em bases do MEV utilizando-se de fita adesiva de dupla face, em seguida metalizadas com uma camada de ouro coloidal de cerca de 20 nm de espessura e corrente contínua de 25 mA. A aquisição das imagens foi realizada em MEV LEO 435 VP ZEISS.

4.4- Testes histoquímicos

Para os testes histoquímicos foram utilizadas seis fêmeas alimentadas com sangue, os intestinos médios foram isolados e fixados na mesma solução como descrito para análises em MET e MEV, durante 72 h, a 4°C. Posteriormente, o material foi desidratado em série crescente de etanol (30, 50, 75 e 100%) e incluso em resina Technovit 7100.

As amostras resinadas receberam cortes transversais de três milímetros de espessura e as seções obtidas foram montadas em lâminas para serem examinadas por meio de testes histoquímicos, de acordo com Mittal e Mittal (2008). As soluções aplicadas sobre as amostras foram as seguintes: ácido periódico de Schiff (PAS), para detecção de glicoproteínas/glicoconjugados neutros; Mercurio de bromofenol para proteínas totais; Alcian Blue (AB) pH 1,0 para glicoproteínas ácidas sulfatados e AB pH 2,5 para glicoproteína ácida carboxilada.

4.5- Preparo das amostras para análise proteica

O IM das fêmeas ingurgitadas foi isolado em lâmina histológica (sobre uma base de gelo) contendo solução fisiológica (NaCl 125 mM) para retirada das MP, sendo cada uma rompida e lavada sucessivamente na mesma solução para extração do conteúdo alimentar (CA). Essas MP foram mantidas na mesma solução onde foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases, e posteriormente armazenadas a temperatura de -80°C até a confecção dos géis, uni e bidimensionais.

4.6- Eletroforese unidimensional/SDS-PAGE

Foram utilizadas 80 MP do IM de *L. umbratilis* para o preparo de géis unidimensionais SDS a 10%. As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.001% azul de bromofenol e 5% β-mercaptoetanol) e fervidas a 100°C por 5 min. A eletroforese foi conduzida a 100 V até a frente de corrida (azul de bromofenol) chegar a base do gel. Logo após a corrida, o gel foi corado em solução de nitrato de prata/Thermo Scientific.

4.7- Eletroforese bidimensional (2-DE SDS PAGE)

Para a focalização isoelétrica (FI) em gel 2-DE/SDS PAGE foram utilizadas 120 amostras de MP solubilizadas em 50µL de água destilada estéril com 2% de

coquetel de inibidor de protease (Sigma); 30µL do solubilizado foi adicionado a 220µL de solução de reidratação (DeStreak^{TM} rehydratation solution/GE Healthcare) e 0,5% de tampão IPG pH 3-10 (GE Healthcare) foi aplicado na fita com gradiente de pH imobilizado (13 cm, pH 3-10 linear, GE Healthcare) para reidratação. A reidratação passiva foi realizada a 50 µA por 12 h a 20°C em aparelho IPGphor (Ettan IPGPhor 3/GE Healthcare, seguida de reidratação ativa na FI (50 µA/IPG strip, 0.5% IPG buffer, 20°C, de acordo com instruções do fabricante).

Após a FI, algumas fitas foram conservadas a -80°C por no máximo uma semana, outras eram aplicadas diretamente sobre o gel da segunda dimensão. Cada fita foi equilibrada por 20 min em 5 mL de solução de equilíbrio (Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.8, 6 M de uréia, 30% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS, 0.002% BPB) adicionado com 125 mM de DTT, seguida de uma segunda etapa de incubação com a mesma solução de equilíbrio com 125 mM de iodacetamida.

Após o equilíbrio, a separação das proteínas na segunda dimensão (de acordo com a massa molecular) foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12,5%, e corrida em aparelho Hoefer^{TM} SE 600 Ruby^{TM}(GE Healthcare) conectado a uma fonte (Electrophoresis Power Supply/EPS601/GE Healthcare). A eletroforese foi realizada em tampão Tris/Glicina/SDS de acordo com as condições descritas por O'Farrel et al. (1977). A corrida foi realizada a 40 mA/gel a 15°C até a chegada do corante ao final do gel. Após a eletroforese os géis foram corados por Comassie Coloidal Brilliant blue G-250 segundo o procedimento descrito por Neuhoff et al. (1988).

4.8- Análise de imagens dos géis bidimensionais

As imagens dos géis bidimensionais foram digitalizadas a partir dos géis corados usando ImageScanner™III (GE Healthcare). As imagens geradas foram analisadas usando o programa ImageMaster™ 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare). O gel consenso foi criado a partir de três réplicas. A autenticidade e relevância de cada *spot* protéico foram validadas por inspeção visual e editadas quando necessário. A intensidade de cada *spot* proteico foi normalizada com relação à abundância total de todos os *spots* válidos.

4.9- Digestão das proteínas e espectrometria de massas ESI-QTof (Electrospray Ionization)

Todos os *spots* expressos no gel consenso foram excisados, reduzidos, alquilados e submetidos à digestão em gel com tripsina, de acordo com os procedimentos de Gharahdaghi et al. (1999). Uma alíquota (4.5 µL) da mistura resultante de peptídios foi separada em resina C18 (75 µm x 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) acoplada a um espectro de massa Q-Tof Ultima (Waters) com fonte de nano eletrospray a uma taxa de fluxo de 0.6 mL/min. O gradiente foi de 2-90% de acetonitrila em 0.1% de ácido fórmico por 20 min. O instrumento foi operado no modo 'top three', no qual um espectro MS é obtido, seguido por MS/MS dos três picos mais intensamente detectados.

Os espectros resultantes foram processados utilizando o software Mascote Distiller 2.2.1.0, 2008, Matriz Science (MassLynx V4.1) e comparados com o banco

de dados de proteínas do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando o software Mascote, com a carbamidometilação com uma modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável, permissão de até uma clivagem de tripsina perdida e uma tolerância de 0.1 Da para precursor e fragmentos de íons.

4.10- Análise de Western blot

Foram utilizados nove extratos do IM de *L. umbratilis*, dissecados 30h após o repasto sanguíneo. A IM e MP de uma colônia de *P. papatasi* da Universidade do Kansas (EUA) foram usadas como controle de teste. Após separação dos polipéptidos por SDS-PAGE e electrotransferência a membrana de PVDF (0,2 um, da Bio-Rad), sendo incubadas durante a noite a 4° C com anticorpo anti-peritrofina (tipo I), diluído 1: 200 com TBS-T (tampão TBS com 0,05% de Tween-20), seguido por três lavagens de 10 min cada. O blot foi incubado durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpo (anti-mouse) conjugado com fosfatase alcalina (Promega), diluída 1: 5000 com TBS-T, e lavou-se com o último como indicado acima. As bandas de proteína foram visualizadas usando o Western Blue (Promega).

5. RESULTADOS

5.1- Formação da matriz peritrófica e análise ultraestrutural do intestino médio abdominal de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis.*

Nas dissecções à fresco sob um microscópio estereoscópico, observou-se que a MP de *L. umbratilis* apresenta uma massa densa e transparente de aspecto gelatinoso, que envolve completamente o conteúdo do alimento. Após a ingestão de sangue, o volume do intestino médio atinge o seu máximo em cerca de 30 min, aumentando em quatro vezes (Figuras 7, C-F), em relação ao volume do intestino médio em jejum (Figura 7, A-B). No intestino, após 12 h de alimentação, a MP estava bem aderida ao epitélio, sendo visto apenas uma fina camada da MP no sangue ingerido (Figura 7-C). Em 24 h, a MP mostrou-se completamente formada (Figura 7-D) e sua degradação foi observada nas amostras após 72 h do repasto sanguíneo (Figura 7-E). Quando o intestino médio foi dissecado, e antes da fixação, a MP apresentou-se em forma de bolsa (Figura 7-F).

A formação de uma nova MP foi observada em vários espécimes de *L. umbratilis*, depois de submetidos a um novo repasto sanguíneo (Figura 8, A-E). Após 36 h estava desprendida do conteúdo alimentar (Figura 9, A-B). Com 48 h, após o repasto sanguíneo, a MP encontrava-se como uma fina camada em contínua degradação (Figura 9-C), e em 72 h sem organização estrutural de seus componentes (Figura 9-D).

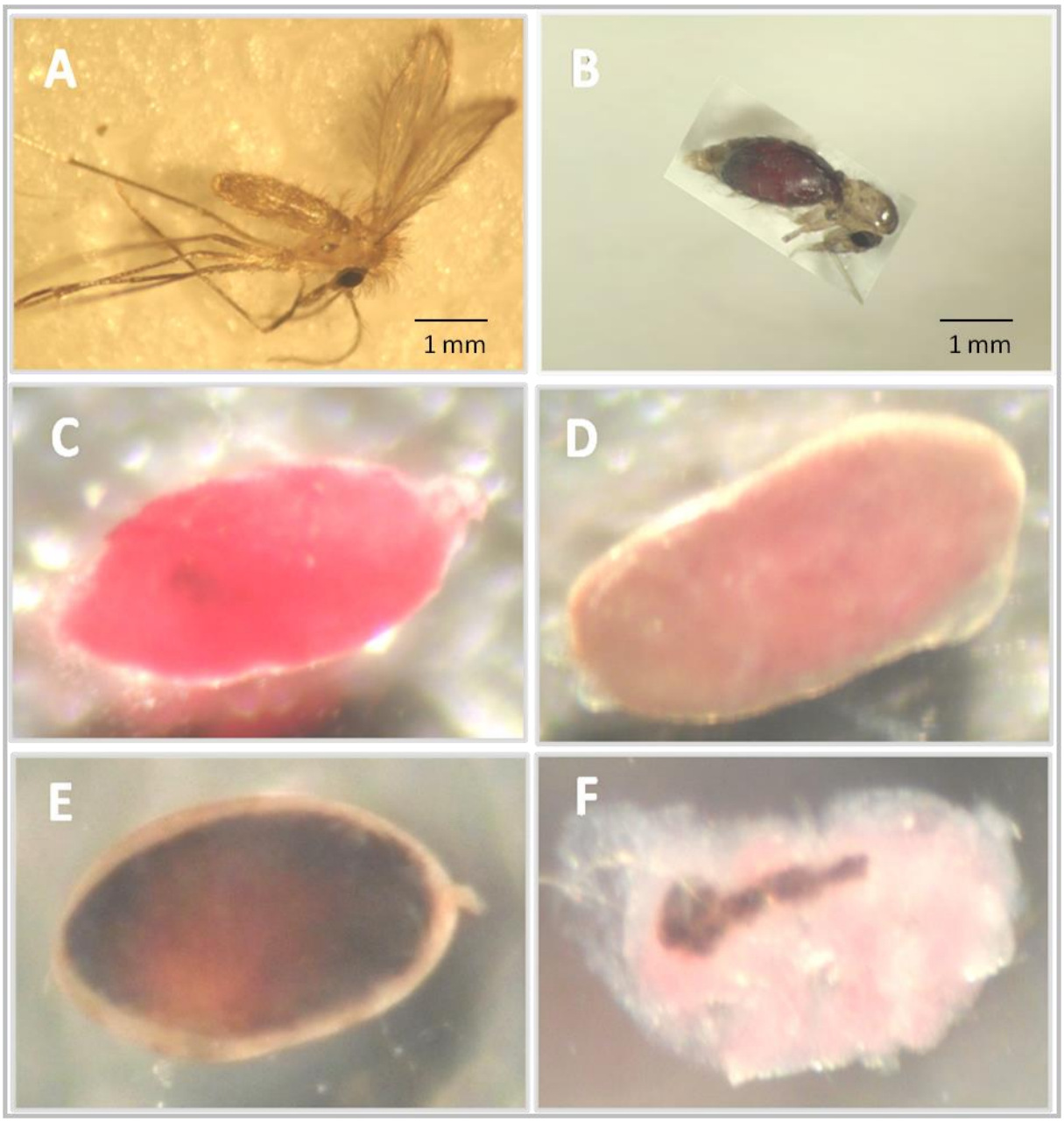

Figura 7. Imagens da matriz peritrófica do intestino médio de fêmeas de *Lutzomyia umbratilis* dissecadas e fotografadas em momentos distintos, após a ingestão de sangue em ratos (*Rattus novergicus*). Fêmea adulta não alimentada (A), fêmea alimentada (B), MP 12 h após a ingestão de sangue (C), 24 h (D), 48 h (E) e 72 h (F). Aumento de 40X.

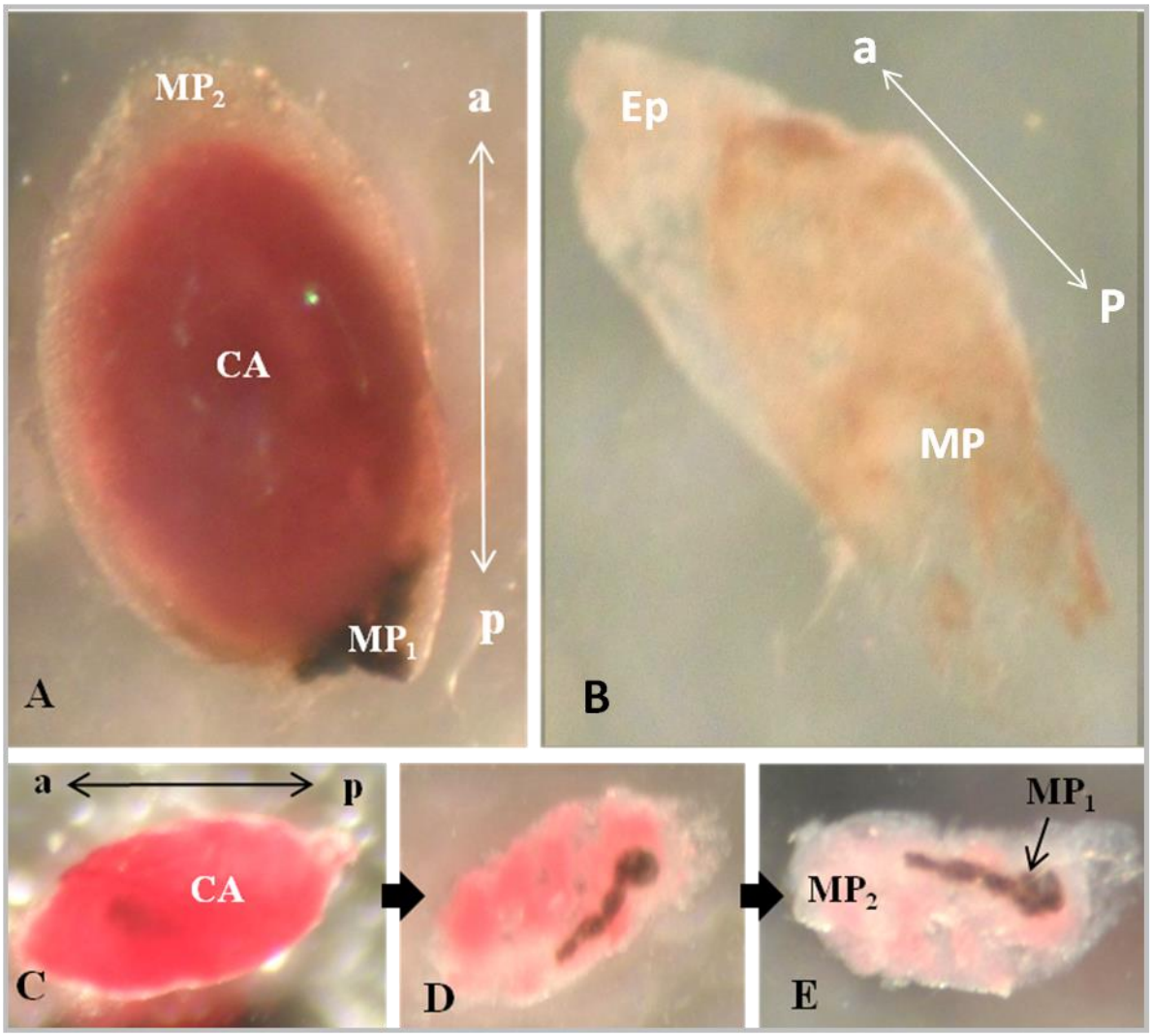

Figura 8. Imagens do conteúdo alimento (CA) do intestino médio de fêmeas de *L. umbratilis*, mostrando a presença de matrizes peritróficas (MP) em diferentes fases de digestão (MP1 = 36-72 h e MP2 = 24-36 h). (A) – duas diferentes fases de digestão de alimento, migrando da região anterior (a) para a posterior (p). (B) – Epitélio (Ep) do intestino médio e MP. (C-E) - MP degradada (MP1) dispersa no novo sangue ingerido, envolvida pela nova MP. Aumento 40 X.

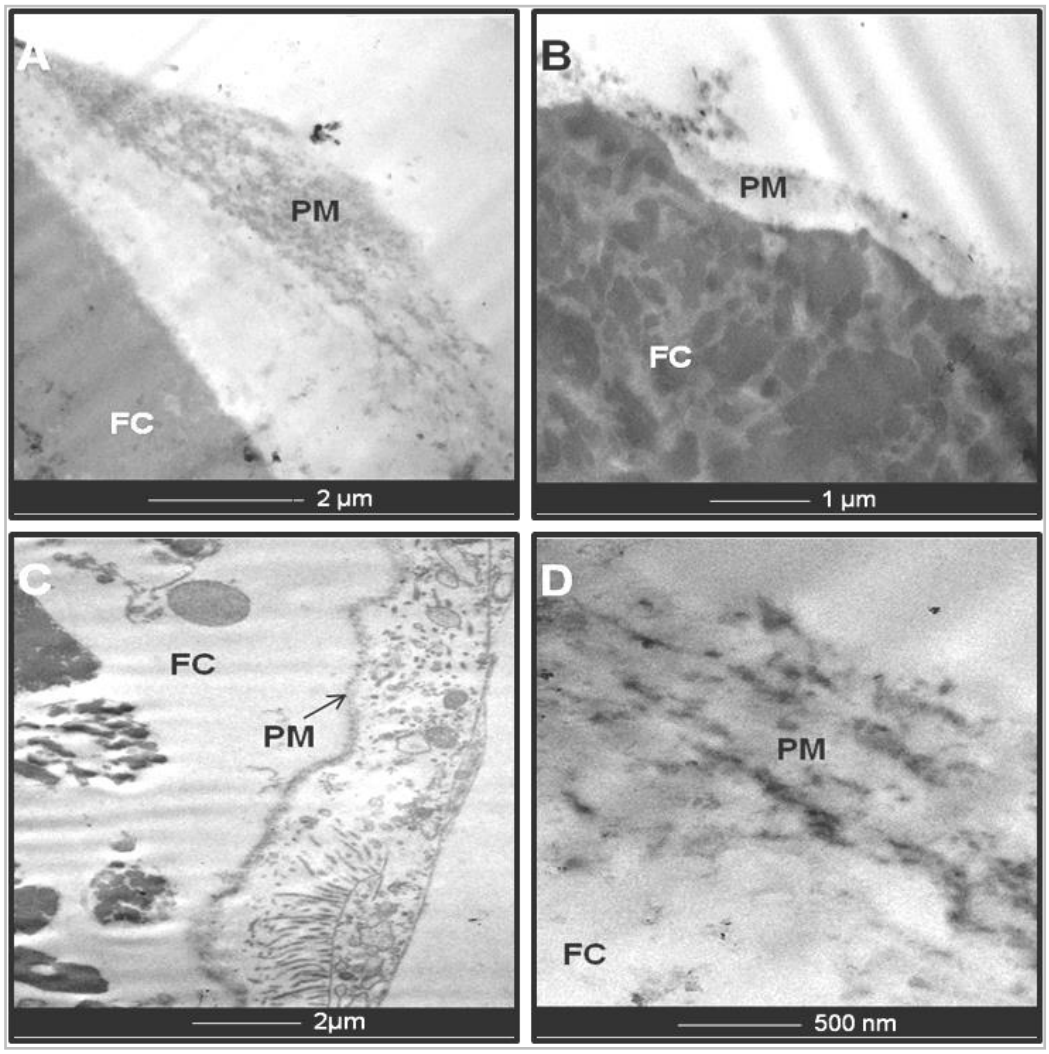

Figura 9. Micrografias eletrônicas de transmissão da matriz peritrófica (PM) do intestino médio de fêmea de *Lutzomyia umbratilis*, dissecadas após: 36 h (A-B), em 48 h (C), e 72 h (D) do repasto sanguíneo.

A figura 10 (A-B) mostra com detalhes a superfície da MP após 24 h do repasto sanguíneo. Em A, é possível observar o aspecto sinusoidal da superfície da MP. Em B é possível observar uma camada granular em diferentes áreas ao longo da superfície. Na figura 11-A, mostra a superfície do epitélio do intestino médio abdominal, sendo possível observar em destaque na figura 11-B, os feixes de fibras (setas) do epitélio abdominal do inseto.

5.2- Análise histoquímica da matriz peritrófica

Os testes histoquímicos da MP de *L. umbratilis* evidenciaram a presença de glicoproteínas ácidas sulfatadas/pH 1,0 (Figura 12-A) e carboxiladas/pH 2,5 (Figura 12-B). Os ensaios com mercúrio de bromofenol revelaram proteínas totais (Figura 12-C), além da presença de glicoconjugados neutros (Figura 12-D).

5.3- Perfil uni e bidimensional do intestino médio abdominal de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis.*

No perfil unidimensional (SDS-PAGE) foram observadas numerosas bandas proteicas acima de 30 kDa (Figura 13) e no gel bidimensional (Figura 14) foram revelados 101 spots, dos quais, 81 proteínas foram analisadas e 60 não apresentaram correlação com as proteínas já depositadas nos bancos de dados conhecidos (NCBI, UniProtKB, FlyBast), 21 foram identificadas e classificadas em quatro grupos proteicos (Tabela 2).

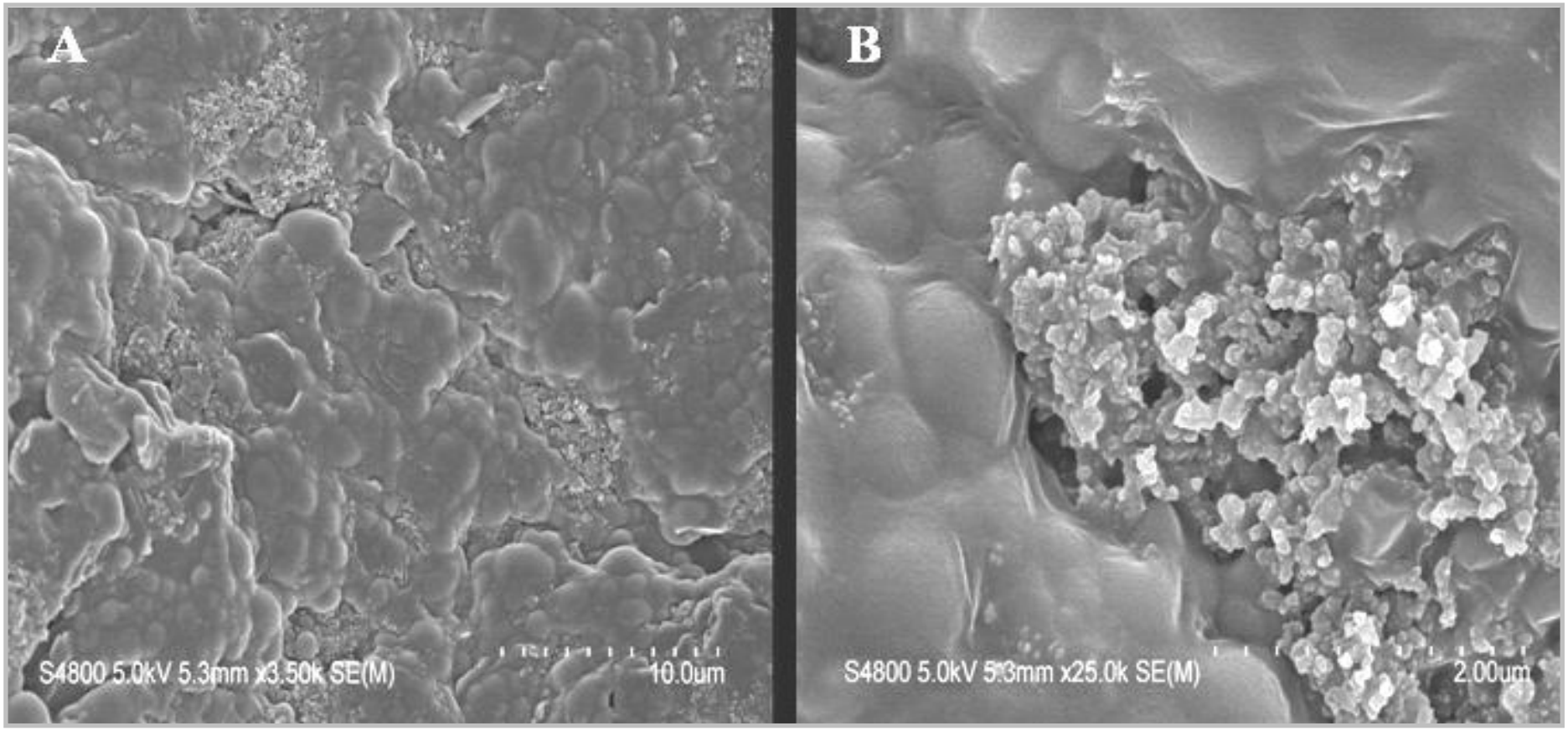

Figura 10. Microscopias eletrônicas de varredura da matriz peritrófica (MP) do intestino médio de fêmea de *Lutzomyia umbratilis* mostrando detalhes da superfície da MP após 24 h do repasto sanguíneo. A MP é formada por uma camada fibrilar como mostrada em A-B, com a camada granular em zonas diferentes ao longo da superfície da MP. Em A, também é possível observar o aspecto sinusoidal da superfície da MP.

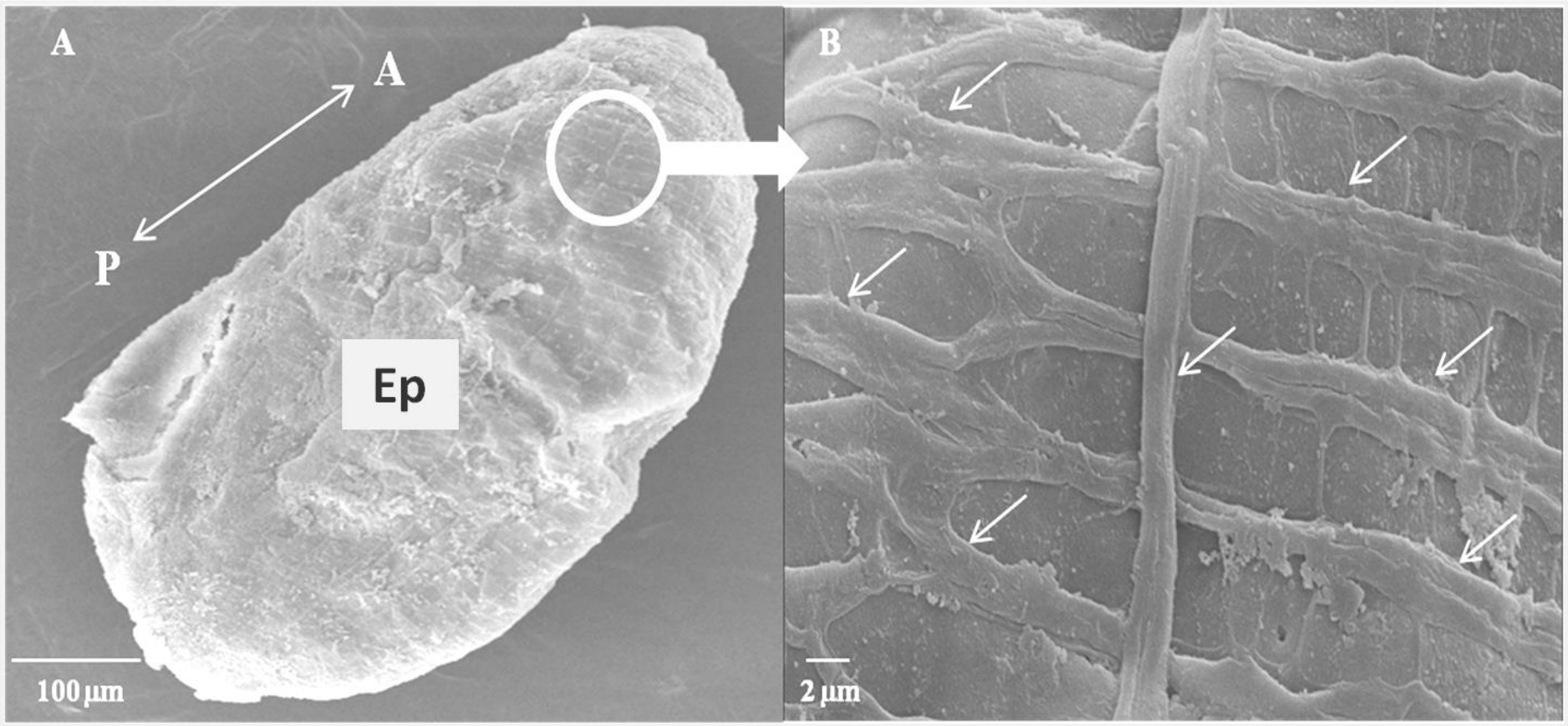

Figura 11. Micrografias eletrônicas de varredura do intestino médio de fêmea de *Lutzomyia umbratilis*, dissecadas a partir de 24 h após o repasto sanguíneo. Superfície do intestino médio abdominal (A). Em destaque (círculo) os feixes de fibras (setas) do epitélio abdominal do inseto (B).

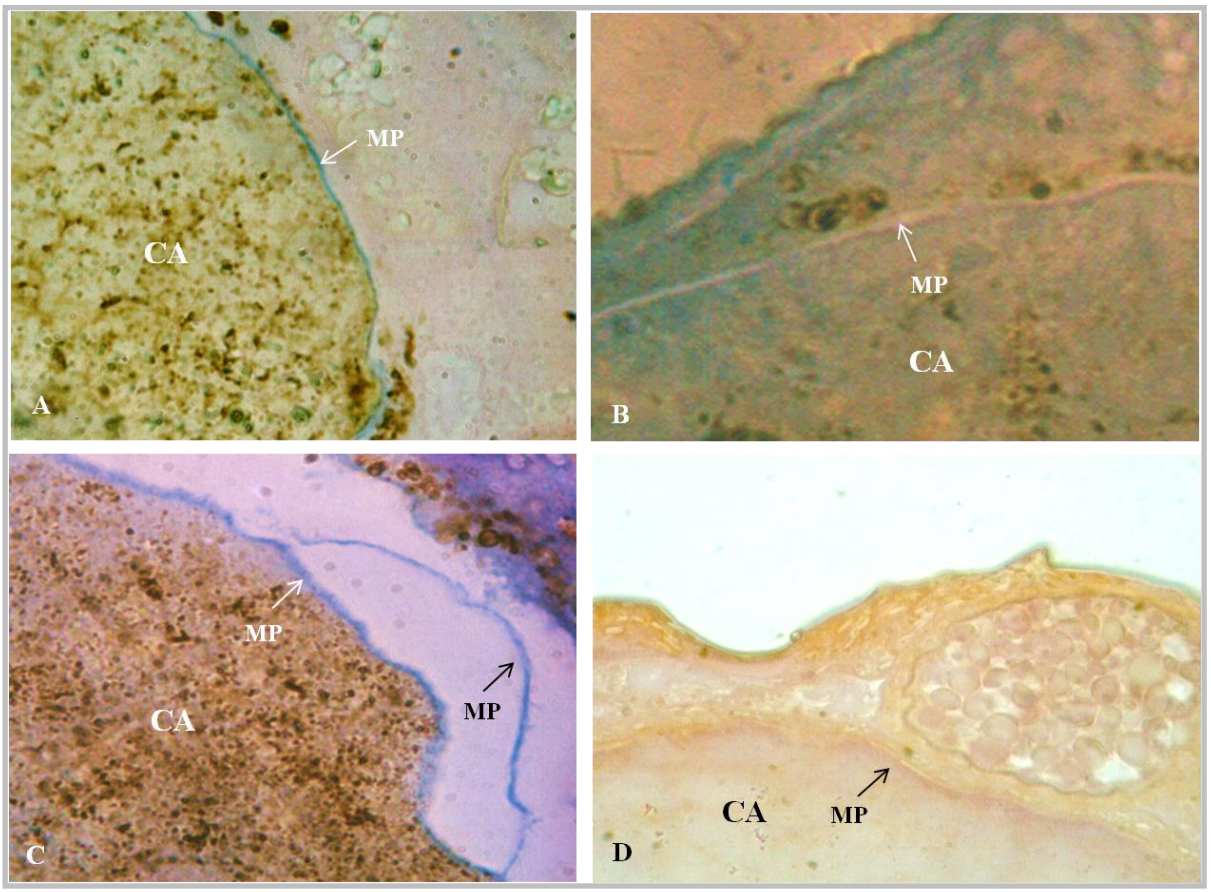

Figura 12. Seções histológicas transversais (3µm) do intestino médio de fêmeas de *L. umbratilis,* 24 h após o repasto sanguíneo, demonstrando por meio de corantes específicos a presença na matriz peritrófica (MP) [seta] de: glicoproteínas ácidas sulfatadas de pH 1,0 (A); glicoproteínas ácidas carboxiladas de pH 2,5 (B); proteínas totais (C); e glicoconjugados neutros (D). conteúdo alimentar (CA). As seções foram registradas em um microscópio óptico/aumento de 100x.

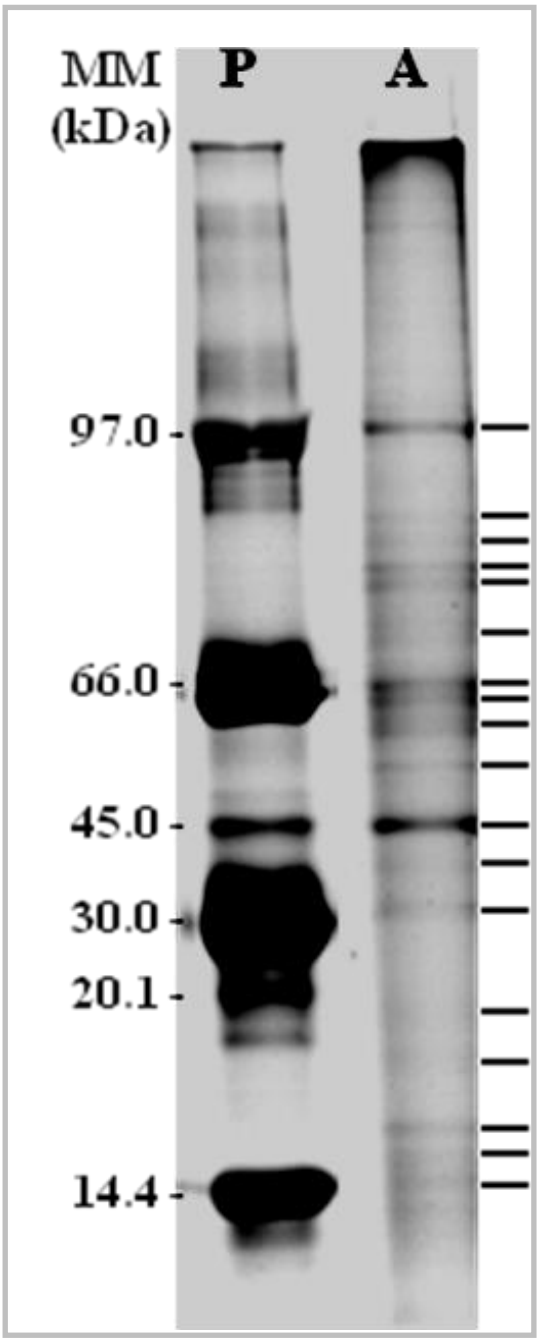

Figura 13. Perfil unidimensional de proteínas da matriz peritrófica de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* separadas por SDS-PAGE 10% e coradas por nitrato de prata. Padrão (P). Amostra (A).

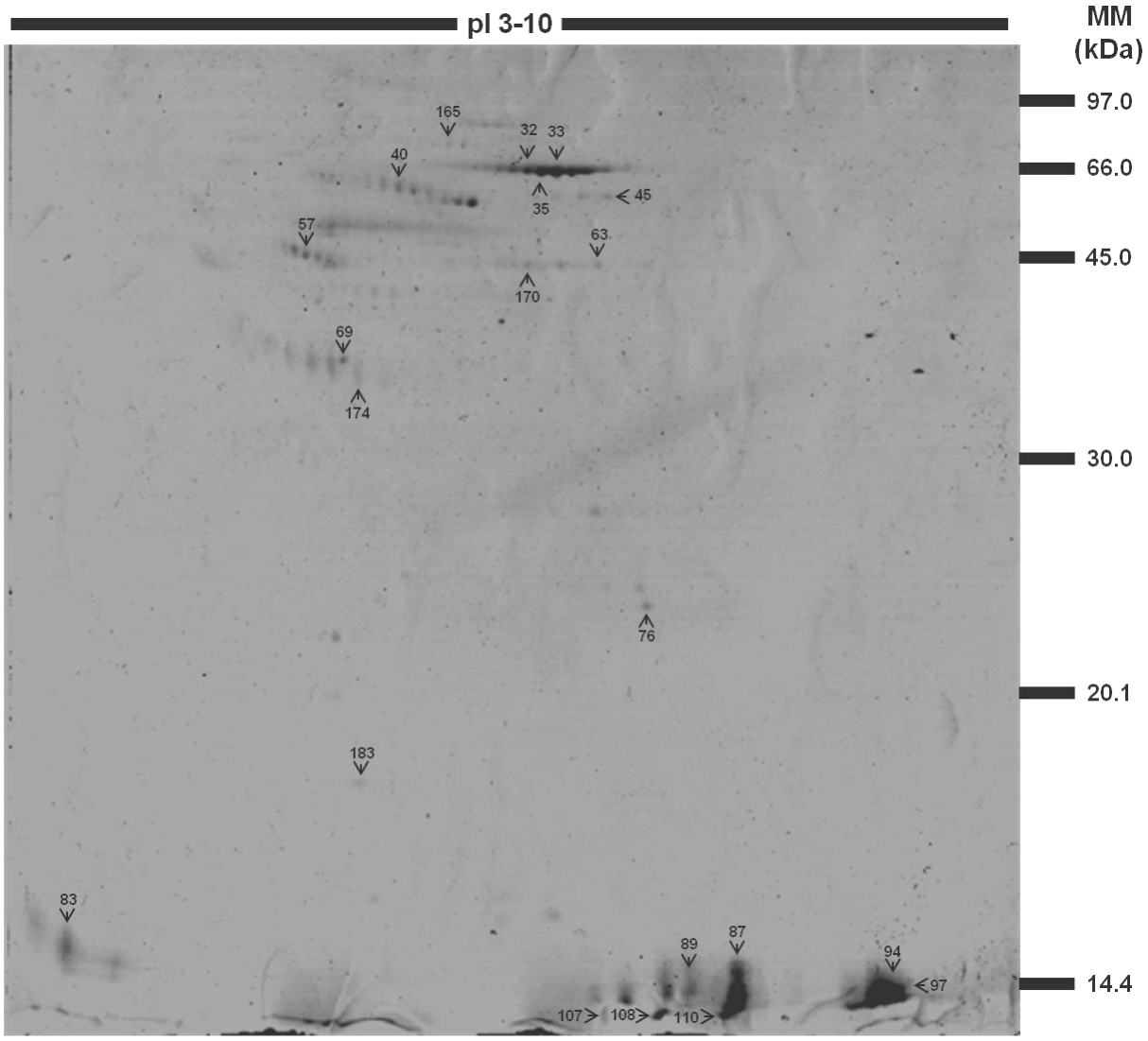

Figura 14. Perfil bidimensional (2DE), gel corado com Coomassie-Blue coloidal de matriz peritrófica de fêmeas de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* alimentadas com sangue de rato wistar. Localização dos 21 "*spot*s" identificados por espectrometria de massas.

Tabela 2. Distribuição por grupo proteico das 21 proteínas identificadas no banco de dados Mascot® do intestino médio de *Lutzomyia umbratilis.*

Cromoproteína	Proteoglicano	Glicoproteína	Nucleoproteína	Peptídeo com função desconhecida
gi/27734441	gi/54640329 gi/190650009 gi/54638745	gi/108880077 gi/54636157 gi/190624088 gi/190650911 gi/190618410	gi/194112995 gi/193917535 gi/194120805 gi/194121077 gi/109915165 gi/190626261 gi/194112995	gi/198138580 gi/193898692 gi/194154397 gi/190617812 gi/108882496
01 (4,8%)	**03 (14,3%)**	**05 (23,8%)**	**07 (33,3%)**	**05 (23,8)**

Na tabela 3, são demonstradas em maior detalhe as 21 proteínas identificadas no banco de dados Mascot® reveladas nos géis 2-DE por espectrometria de massas.

5.4- Perfil do Western blot

Para esta técnica os resultados revelaram a presença de peritrofina do tipo I (PpPer I), apresentando Bandas superiores a 35 kDa (Figura 15).

Tabela 3. Proteínas identificadas no banco de dados Mascot® em géis 2-DE do intestino médio de *Lutzomyia umbratilis* por espectrometria de massas.

No. *spot*	Nome da proteina	Código de acesso NCBI	MM (kDa)	Valor do p*I* calculado	Valor Mascot	% de cobertura	Mach/n° Peptideos	Sequence de peptide	No. de aa	Funcão	Referências
L35	AAEL004319 receptor do fator de crescimento epidérmico *[Aedes aegypti]*	gi/108880077	150.448	5,83	42	2	3/136	RGGVMGMGAFGR	1304	Glicoproteína com atividade de proteína-quinase. Auxiliam na atividade tirosina-quinase e como receptor do fator de crescimento epidérmico.	Nene et al., 2007.
L45	GG19547 *[D. erecta]*	gi/190650009	142.554	9,06	41	2	2/132	LAIDDMR, LSILSPEK	1266	Proteoglicano com função estrutural com domínio PDZ (**P**SD95, **D**lgA e **z**o-1) que auxiliam na ancoragem de proteínas transmembranais ao citoesqueleto e a organização do complexo de sinalização dos processos fisiológicos.	Ranganathan e Ross, 1997; Clark et al., 2007.
L57	AGAP009998 40S ribosomal da proteína S11 *[Anopheles gambiae]*	gi/109915165	17.974	11,06	38	6	2/125	EAITGTYIDK	153	Nucleoproteína que auxilia no processamento do pré-RNAm por trans-splicing.	Holt et al., 2002.
L63	Gr57a *[D. p. pseudoobscura]*	gi/54636157	49.112	9,39	43	2	1/122	TVLEARR	426	Glicoproteina de quimiorre-cepção gustativa de 7 domínios transmembranais.	Richards et al., 2005.
L69	GA14877, isoform A *[D. p. pseudoobscura]*	gi/54638745	42.174	5,30	203	21	9/132	AVFPSIVGRPR, VAPEEHPVLLTEAPLNPK, DLTDYLMK, GYSFTTTAER, SYELPDGQVITIGNER, EITALAPSTIK, IIAPPER, IIAPPER, IIAPPERK	376	Proteoglicano com função estrutural com domínio de ligação de actina, envolvido na consistência, rigidez e elasticidade da estrutura em formação.	Richards et al., 2005.
L76	GF17326 *[D. ananassae]*	gi/190626261	28.344	10,70	38	4	1/115	RPGGAPGAVQK	275	Nucleoproteína com domínios de ligação de nucleotídeos	Clark et al., 2007.
L87	GL20111 *[D. persimilis]*	gi/194112995	67.946	7,77	45	2	1/131	HLDNLK	576	Nucleoproteína com domínios de ligação de ácidos nucleicos	Clark et al., 2007.
L89	GF24389 *[D. ananassae]*	gi/190624088	28.421	8,84	39	3	1/121	CILNVLEK	261	Glicoproteína com domínio de ligação-NAD (P), envolvido na oxirredução	Clark et al., 2007.
L94	GL20111 *[D. persimilis]*	gi/194112995	67.946	7,77	45	2	1/137	HLDNLK	576	Nucleoproteína com domínios de ligação de ácidos nucleicos.	Clark et al., 2007.

Continua...

No. spot	Nome da proteina	Código de acesso NCBI	MM (kDa)	Valor do pI calculado	Valor Mascot	% de cobertura	Mach/no Peptideos	Sequencia de peptideos	No. de aa	Funcão	Referências
L97	GI10515 [*D. mojavensis*]	gi/193917535	48.016	10,11	44	2	2/116	KQNAVGAK	433	Nucleoproteína com domínios de ligação de nucleotídeos	Clark et al., 2007.
L107	GG14141 *[D. erecta]*	gi/190650911	149.991	5,99	39	2	4/142	QGRLMGITR, SPASSLKR	1351	Glicoproteína com atividade hidrolase.	Clark et al., 2007.
L110	GM26235 *[D. sechellia]*	gi/194120805	73.054	8,87	51	2	1/154	QEVGVGVK	671	Nucleoproteína com atividade de regulação da transcrição	Clark et al., 2007.
L165b	GF21882 *[D. ananassae]*	gi/190618410	54.254	5,15	471	27	18/128	LVLEVAQHLGENTVR, TIAMDGTEGLVR, VLDTGYPIR, IINVIGEPIDER, VVDLLAPYAK, IGLFGGAGVGK, VALTGLTVAEYFR, FTQAGSEVSALLGR, AIAELGIYPAVDPLDSTSR, ILQDYK, FLSQPFQVAEVFTGHAGK	506	Glicoproteína que produz ATP a partir de ADP, na presença de um gradiente de prótons através da membrana.	Clark et al., 2007.
L170	GM26391 *[D. sechellia]*	gi/194121077	123.269	6,65	39	2	1/141	SGGGGNGQTNGNGR	1153	Nucleoproteína ligante de DNA	Clark et al., 2007.
L183	CG1633 peroxidase tiorredoxina 1 *[D. melanogaster]*	gi/27734441	21.952	5,52	43	5	2/116	QITVNDLPVGR	194	Cromoproteína com atividade de decomposição de peróxidos de hidrogênio.	Rodriguez et al., 2000.
L33	GA25679 *[D. p. pseudoobscura]*	gi/198138580	38.876	5,59	43	2	3/131	KDEELKPK	326	Desconhecida	Richards et al., 2005.
L40	GH16934 *[D. grimshawi]*	gi/193898692	17.974	10,13	50	3	1/127	LAIDLMK	195	Desconhecida	Clark et al., 2007.
L83	GJ12046 *[D. virilis]*	gi/194154397	165.290	8,60	36	2	1/163	IADILRR	1447	Desconhecida	Clark et al., 2007.
L108	GF21365 *[D. ananassae]*	gi/190617812	89.993	8,17	43	2	2/171	ERGGEVR, VDQLESK	798	Desconhecida	Clark et al., 2007.
L174	AAEL002097 proteína hipotética conservada *[A. aegypti]*	gi/108882496	59.116	5,95	48	2	1/128	LSSLTQSLVQK	522	Desconhecida	Nene et al., 2007.

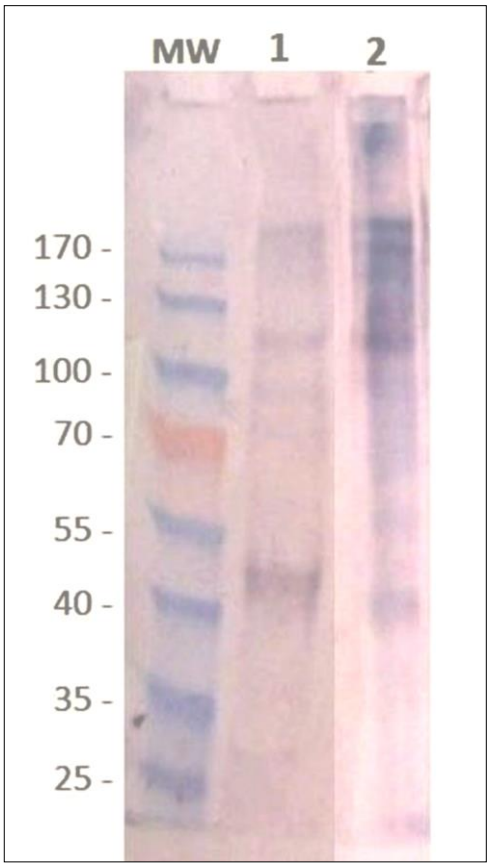

Figura 15. Resultados do western blot com anticorpo anti-peritrofina da MP de *P. papatasi* do tipo 1 (1); MP de *L. umbratilis* (2); escala de peso molecular (MW).

6. DISCUSSÃO

6.1- Formação da matriz peritrófica, análise ultraestrutural e histoquímia do intestino médio abdominal de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis.*

Neste estudo foram apresentados os primeiros resultados relacionados à estrutura de formação do IM e da MP de *L. umbratilis.* Nas dissecções à fresco, a MP de *L. umbratilis* foi observada que sua completa formação em 24 h, após o repasto sanguíneo, revelando uma coloração marrom de tonalidade ferruginosa, com espessura de cerca de 2-3 µm, separando completamente o alimento do epitélio intestinal e, sua degradação total, ocorrendo por volta de 72 h. Resultados parcialmente similares à formação da MP de *L. umbratilis* foram anteriormente relatados por Prates (2002) estudando a MP de *L. intermedia*, onde observou que esta estrutura é completamente formada em 12 h, após a alimentação de sangue e, em 24 h, já encontrava-se desprendida do epitélio do IM e, após 72 h, não foi mais observada. Esta mesma cinética de formação e degradação da MP, foram observados por Secundino et al. (2005) em *L. longipalpis*, onde verificaram que a completa formação da MP desta espécie ocorre em 24 h e sua degradação em 72 h. Estes últimos autores, verificaram também que após a alimentação com látex, a formação da MP ocorre em 12 h, da mesma forma observada por Prates (2002) e, sugeriram que os componentes fibrilares, são formados na parte externa da MP, e são principalmente sintetizados pelo epitélio do IM, sem qualquer associação com ou indução de proteínas do sangue. Reid e Lehane (1984) já haviam sugerido que a formação da MP passa por um processo de maturação que ocorre em três fases: (i)

secreção dos precursores das fibrilas de quitina; (ii) maturação deste material formando uma rede; e (iii) ligação à MP que se localiza entre as fibrilas de quitina.

A formação de uma segunda MP foi observada em alguns exemplares de *L. umbratilis*, coletados em campo já ingurgitados, quando foram submetidos a um novo repasto sanguíneo. Segundo Forattini (1996) se um segundo repasto sanguíneo ocorrer antes que o primeiro tenha sido totalmente digerido, se formará uma segunda MP circundando a primeira e o novo sangue ingerido. Observações realizadas por Baines (1978) estudando a formação da MP em outros grupos de insetos sugerem que a formação da MP pode ser contínua como em orthópteros ou em resposta à alimentação como, ocorre em dipteros fêmeas. Em insetos herbívoros vorazes como *Locusta migratória* (Orthoptera, Acrididae), a MP é secretada de 15 em 15 min. Esta MP é passada gradualmente para a parte posterior do intestino, antes da próxima ser adicionada, resultando em muitas camadas coletivamente arranjadas da MP, mais precisamente como um telescópio, chamado como envelope peritrófico (EP). Para Lee (1968) estudos evolvendo *Periplaneta americana* (Blattaria, Blatidae), considerados insetos oligófagos, o EP parece ser composto por pelo menos 10 MP. Segundo Araújo (2008) após estudou relativos a ultramorfologia da MP por MEV em várias espécies de abelhas (Hymenoptera, Apidae), revelou a presença das projeções na região endoperitrófica sugerindo que esta estrutura, possivelmente, são precursores da MP, assim como Richards e Richards (1977) propuseram que, a necessidade de renovação contínua ou repetida formação da MP é de grande importância para a proteção do IM e do bom funcionamento do processo digestivo, porque a MP permanece apenas durante algumas horas devido à ação de enzimas digestivas.

Em estudo realizado por Alvarenga (2005) foi constatado que a formação da MP em *A. gambie* e *A. aegypti* por MEV, após o repasto sanguíneo, demonstrou estruturas sob a forma de pequenos aglomerados arredondados, que são compatíveis com agregados de heme, também observados por MET. Estes dados sugerem que os grumos encontrados na superfície ectoperitrófica de *L. umbratilis* podem ser agrupamentos de heme, mas não são conclusivos. Segundo Walters et al. (1995), o Heme são agrupamento prostético de várias enzimas (por exemplo, catalase) e globina citocromos. Estudos baseados em o bservações por MET em outros insetos da ordem Diptera, como o realizado por Blackburn et al. (1988) e Walters et al. (1995), sugeriram que a MP de *L. spinicrassa* e *P. papatasi* são formadas por microfibrilas e grânulos. Com isso, acreditamos que a MP de flebotomíneos também se ligue ao heme, auxiliando na digestão de hemoglobina. Esta ligação, sugerem que a MP pode ter um papel no mecanismo de desintoxicação do heme e de defesa antioxidante no IM de insetos hematófagos, embora a identificação destas moléculas de ligação sejam desconhecida. Outros estudos demosntram que a formação da MP pode ser induzida e ter relação direta com os mecanismos da infecção natural, pois, os parasitos de *Leishmania* que se desenvolvem no interior do sangue, no compartimento endoperitrófico, precisam transpor a MP antes que sejam mortos pela ação digestiva no IM (Killick-Kendrick, 1979). Esta transposição de parasito pela MP foi observada em *L. major* Yakimoff e Schokhor, 1914 por Schlein et al. (1991) e sugeriram que, o escape do protozoário pela MP é, provavelmente, mediada por quitinase, secretada pela proliferação de promastigotas, com funções de degradar a MP, facilitando a fuga do parasito pelo epitélio colunar do IM para superfície exterior.

Os ensaios histoquímicos da MP de *L. umbratilis* demonstraram ser esta uma estrutura basicamente composta por glicoproteínas sulfatadas e carboxiladas além de glicoconjugados neutros e, em sua maior parte a constituição de proteínas, devido a visualização no contraste de coloração com os outros testes para a presença de glicoproteínas ácidas sulfatadas pH 1,0, glicoproteínas ácidas carboxiladas pH 2,5 e glicoconjugados neutros. De acordo com Peters (1992), estima-se que as proteínas constituem o principal componente da MP na maior parte dos insetos e que compreendem cerca de 21-55% da sua massa total, e da quitina responsável por cerca de 4-13% do peso total da MP. No entanto, ainda pouco se conhece sobre as proteínas presentes em MP de insetos. Estas proteínas, normalmente são designadas como peritrofinas, devido a sua forte interação com esta estrutura (Elvin et al*.,* 1996; Tellam et al*.,* 1999). Muitas destas proteínas são glicosiladas e têm um papel essencial na estrutura e permeabilidade da MP, principalmente por causa dos domínios ricos em cisteína que são responsáveis pela ligação das fibras para formar a rede estrutural de quitina da MP (Elvin et al*.,* 1996; Schorderet et al*.,* 1998; Shen e Jacobs, 1998; Tellam et al*.,* 1999), conferindo resistência à digestão proteolítica, que é característico de proteínas da MP (Elvin et al*.,* 1996; Wang e Granados, 1997a; Wang et al*.,* 2004) . Acredita-se que os proteoglicanos estão presentes na MP e contribuem para alcançar 13% do peso total da MP, este componente provavelmente tem grande importância na resistência, estrutura e permeabilidade da MP (Tellam, 1996).

De acordo com o modelo de estudo desta tese, não é possível estimar o conteúdo de quitina presente na MP de *L. umbratilis*. A quitina é um polissacarídeo linear de N-acetilglicosamina, encontrado no exoesqueleto e também na MP de inúmeras espécies de insetos (Kramer et al., 1993) que pode ocorrer em

quantidades variáveis na MP, e geralmente, corresponde de 3 a 13% (Ibrahim et al., 2000; Wang e Granados, 2001) da constituição da MP. A quitina da MP produz uma estrutura fibrosa, a fibrila de quitina que é a forma cristalizada deste polissacarídeo, capaz de se intercomunicar com moléculas de proteínas e, provavelmente contribui para a resistência da MP, de modo que esta possa suportar compressão e distensão (Terra, 1996; Lehane, 1997).

6.2- Perfil uni e bidimensional do intestino médio abdominal de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis.*

No perfil unidimensional (SDS-PAGE) do IM observou-se numerosas bandas protéicas acima de 30 kDa e no gel bidimensional foram identificadas 81 proteínas por EM utilizando o ESI-QTof. Deste total, 60 não apresentaram correlação com as proteínas já depositadas nos bancos de dados conhecidos (NCBI, UniProtKB, FlyBast)**,** isto provavelmente pode ser atribuído a três fatores: i) o baixo número (120) de amostras (IM) dissecadas utilizadas para análise proteica; ii) a sensibilidade do sistema de detecção de EM; iii) a não existência do sequenciamento do genoma do gênero *Lutzomyia*. Dinglasan et al. (2009) analisando as proteínas do IM de larvas de *Anopheles gambie* por meio de técnica em gel bidimensional também obtiveram um grande número (86/209) de *spots* não identificados. Segundo estes autores, as frações peptídicas do IM não correspondentes a de nenhum outro grupo de inseto em banco de proteínas possivelmente correspondam às verdadeiras proteínas desta estrutura, pois acreditam que o IM seja mal caracterizado molecularmente em qualquer organismo. A não correspondência peptídica a

qualquer organismo pode estar relacionada aos baixos *scores* dos *spots* analisados em banco de proteínas, que presumivelmente revelam que as proteínas são apenas ou vagamente associadas à matriz extracelular (Elvin et al., 1996). Neste ponto de vista, acreditamos que os poucos estudos envolvendo estudos proteômicos do IM ou MP e as suas sequências peptídicas não depositadas em bancos de proteínas limitam novas descobertas a cerca desta estrutura e dificultam seu entendimento, considerando que as proteínas envolvidas na constituição do IM e da MP podem variar de uma espécie para outra e, os cuidados empregados no momento da extração do IM e da MP, isso, de fato, pode ter influenciado na identificação das proteínas.

As 21 proteínas identificadas neste estudo do IM de *L. umbratilis* foram distribuídas nas seguintes famílias ou categorias: glicoproteínas, proteoglicanos, cromotoproteínas e nucleoproteínas, além de cinco proteínas com função desconhecida. Destas proteínas citaremos a importância e o envolvimento de algumas delas com o IM e a MP, durante o processo digestivo.

As nucleoproteínas foram as mais representativas com 33,3% de *spots* identificados e, possivelmente, estejam envolvidas na orientação de substâncias envolvidas formação da MP, assim como, na produção de substâncias que conduzirão todo o processo digestivo.

Neste estudo as glicoproteínas representaram 23,8%, estas proteínas são caracterizadas por conter um ou mais açúcares ligados covalentemente a estrutura peptídica da mesma, sem repetição de unidades em série, sendo os açúcares de grupos prostéticos, sendo responsáveis pelas produções de imunoglobulinas, hormônios folículo-estimulante, hormônios luteinizantes, gonodotrofinas coriônicas e protombinas, além de diversas glicoproteínas presentes nas secreções mucosas.

Estas macromoléculas, cujos grupos prostéticos são glicídios, impedem a ação proteolítica por não serem digeridas por enzimas digestivas e, portanto auxiliam na proteção do epitélio intestinal contra autodigestão (Elvin et al*.,* 1996; Wang e Granados, 1997a; Wang et al., 2004), portanto, devem ser constituintes da estrutura da MP, atuando nesta proteção. A glicoproteína, *spot* 35 (gi/108880077) revelou uma macromolécula desta família que, segundo Nene et al*.* (2007), auxilia no metabolismo da tirosina-quinase como receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF). Segundo Cabodi et al. (2004) em células aderentes, ligantes solúveis, como o EGF são ativados receptores do tipo tirosina-quinase que medeia uma cascata de eventos de sinalização “downstream” envolvendo a estimulação de receptores para integrinas e a conseqüente adesão à MP. Estas proteínas glicosiladas teriam um papel fundamental na estrutura e na permeabilidade da MP, principalmente por apresentarem domínios ricos em cisteína, responsáveis pela ligação às fibrilas de quitina formando a rede estrutural da MP (Elvin et al*.,* 1996; Schorderet et al., 1998; Shen e Jacobs Lorena, 1998; Tellam et al*.,* 1999). Estes domínios ricos em cisteína também podem ser importantes na resistência à digestão proteolítica, que é característica preponderante das proteínas de MP (Elvin et al*.,* 1996; Wang e Granados, 1997a; Wang et al., 2004). Estudos realizados por Elvin et al*.* (1996) sobre as proteínas da MP de larvas de *L. cuprina*, revelaram a presença da peritrofina Peritrophin-44, que tem distribuição uniforme em toda a MP larval e se liga especificamente a tri-N-acetil chitotriose e quitosano re-acetilado, assim, concluíram que os vários domínios ricos em cisteína na peritrophin-44 é responsável pela ligação a quitina e, provavelmente, desempenha papéis na manutenção da estrutura e porosidade da MP. Isto possivelmente facilitaria o transito de substâncias na MP contribuindo com sua manutenção ao longo do processo

digestivo. O *spot* 107 (gi/190650911) foi identificado como uma glicoproteína que, segundo Clark et al. (2007), está relacionada com atividade de hidrolases. Segundo Terra e Ferreira (1994), na fase inicial do processo enzimático do alimento, que ocorrem no espaço endoperitrófico, polímeros hidrolases, como amilases, celulases, hemicelulases e tripsinas, atuam na redução do peso molecular dos polímeros gerando oligômeros. Na fase intermediária, oligômeros são processados por polímeros hidrolases ou digeridos por oligômeros hidrolases (p. ex. aminopeptidases que atuam sobre fragmentos de proteínas). Esta etapa da digestão parece ocorrer no espaço ectoperitrófico e gera dímeros ou pequenos oligômeros como maltose, celobiose e dipeptídeos. Na fase final do processo digestivo, os dímeros são processados em monômeros pelos dímeros hidrolases como maltases, celobioses e dipeptidases. Estas enzimas parecem atuar ancoradas às microvilosidades da membrana celular do IM do inseto, que constitui a última unidade compartimentalizadora da digestão. Segundo Kramer et al. (1993), a endoglicosil-hidrolases são quitinases (EC 3.2.1.52) que clivam de forma específica as ligações glicosídicas da quitina que, teoricamente, podem ser de dois tipos: um é responsável pela degradação da quitina do exoesqueleto em períodos de muda e o outro é responsável pela degradação da MP.

Outra importante família de macromoléculas identificada no IM de *L. umbratilis* foi a dos proteoglicanos e que está presente na estrutura da MP da maioria dos insetos, chegando a contribuir com 13% da massa total da MP (Tellam, 1996) e são proteínas ligadas a glicosaminoglicanos (estruturas com dois açucares aminados e normalmente sulfatados). Esta macromolécula apresenta alta quantidade de carga negativa, e por isso acabam atraindo uma nuvem de cátions, onde o mais atraído é o sódio, que é ligado a moléculas de água. Essa capacidade

dos glicosaminoglicanos de atração de cátions e água confere aos proteoglicanos a função de dar a MP uma característica hidratada, auxiliando na dinâmica do processos digestivos, além disso, os proteoglicanos têm a função de dar rigidez a matriz, resistindo à compressão e preenchendo espaços (Tellam, 1996). Dos três proteoglicanos identificados no IM de *L. umbratilis*, a proteina GA15280 (*spot* L32) simbolizada como Dpse\GA15280 (GA15280, FBgn0075304/FlyBase) de *Drosophila pseudoobscura pseudoobscura*, com função molecular estrutural está envolvida no processo biológico de translação. Os outros dois proteoglicanos, a GG19547 (L45), com sequência observada em *Drosophila erecta* possuem função estrutural com domínio PDZ (**P**SD95, **D**lgA e **z**o-1) que auxiliam na ancoragem de proteínas transmembranais ao citoesqueleto e a organização do complexo de sinalização dos processos fisiológicos, e a GA14877 (L69) com função estrutural com domínio de ligação de actina, envolvido na consistência, rigidez e elasticidade da estrutura em formação (Clark et al*.,* 2007). Um dos *spots* associados a um proteoglicano foi o gi/54640329 (*spot* 32) e que segundo Richards et. al. (2005), tem por função atuar como sinalizador para divisão celular e, parece estar relacionado ao limite de velocidade de digestão. Contradizendo esta informação, Villalon et al. (2003) demonstraram que, mesmo rompendo a MP de fêmeas de *A. aegypti* e *Anopheles stephensi* Liston, 1901 por alimentação com quitinase ou com anticorpos anti-peritrofinas, havia uma aceleração no processo de digestão.

O *spot* 183, que vem a ser uma cromoproteína foi anteriormente identificada como sendo uma peroxidase tiorredoxina 1, extraída de *Drosophila melanogaster* (Rodriguez et al., 2000). As cromoproteínas desempenham papéis importantes na proteção contra a toxicidade dos organismos de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), podendo desempenhar um importante papel na proteção de lesão oxidativa

(Yu et al., 2011). Esta lesão oxidativa se dá devido a grande quantidade de sangue ingerida pelo inseto hematófago, pois causa da liberação de grandes quantidades de heme, proveniente da digestão da hemoglobina presente no sangue, no intestino destes insetos (Lehane, 1991). O heme é uma molécula capaz de promover a oxidação de lipídeos (Vincent et al., 1988), proteínas (Vincent, 1989) e a degradação do DNA (Aft e Mueller, 1983). Além disso, é capaz de desestabilizar membranas biológicas aumentando sua permeabilidade e até levando à sua ruptura (Schmitt et al., 1993) como ocorre com hemácias expostas a heme livre (Chiu e Lubin, 1989). Isto pode explicar a presença de supostos agrupamento de heme observados na superfície ectoperitrófica de *L. umbratilis*, ocasionado pela quantidade de repasto sanguíneo exercido pelo inseto.

6.3- Detecção de Peritrofina-1 da matriz peritrófica de *Lutzomyia* umbratilis, pela técnica de *Westen Blot*

As análises pela técnica de Westen Blot da MP de *L. umbratilis* revelaram a presença da peritrophin do tipo 1 (PpPer I), já identificada na MP de *P. papatasi* (Ramalho-Ortigão et al., 2007). O padrão apresentado foi composto por oito faixas acima de 35 kDa (Figura 15). Levando-se em consideração a massa molecular do papel eu sendo de 29,8 kDa, a presença espécies de maior massa molecular pode indicar glicosilação. Peritrofinas do tipo 1 tem foi descrita pela primeira vez em *P. papatasi* (Ramalho-Ortigão et al., 2007) e foram derivados de glicosilados identificados em três flebotomíneos: *P. papatasi*, *P. perniciosus*, e *L. longipalpis* (Dostálová et al., 2011; Ramalho-Ortigão et al., 2007; Jochim et al., 2008). A

glicosilação dessas proteínas pode resultar num aumento da estabilidade da MP contra a ação proteolítica por enzimas digestivas, além de, influenciar na seletividade dos poros da matriz e ajudar a manter o nível de hidratação da PM (Lehane, 1997). Uma vez que as peritrofinas são responsáveis pela integridade e permeabilidade da MP, podendo influenciar tanto o desenvolvimento dos flebotomíneos e da espécie de *Leishmania* no interior do inseto vetor (Coutinho-Abreu et al., 2013).

Várias proteínas descritas neste estudo podem estar relacionadas ao processo digestivo, produzidas pelas células do epitélio do IM, bem como, a formação, manutenção e degradação da MP. A descrição destas proteínas são os primeiros relatos para *L. umbratilis*, principal vetor de LTA no Amazonas. Porém, uma repetição das técnicas uni e bidimensionais, bem como de Westen Blot são sugeridas para a confirmação das proteínas aqui comentadas, antes de serem propostas a um banco de dados.

7. CONCLUSÕES

✓ Pelas dissecções à fresco do tubo digestório de *L. umbratilis*, foi possível analisar experimentalmente a cinética de formação da matriz peritrófica do intestino médio abdominal, onde ficou demonstrando sua formação em 24 h, após o repasto sanguíneo e, sua completa degradação em 72 h, como também, foi possível visualizar e definir seu aspecto nestas condiçãoes, apresentando coloração marrom de tonalidade ferruginosa;

✓ Em condições laboratoriais foi possível observar a formação de uma segunda matriz peritrófica em *L. umbratilis*, a partir de um novo repasto sanguíneo, antes mesmo que o primeiro tenha sido totalmente digerido, circundando a primeira e o novo sangue ingerido; este acontecimento possibilitaria uma nova infecção e a transmissão de populações/cepas distintas e hibridização de parasitos no interior do tubo digestório do inseto vetor;

✓ As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura da matriz peritrófica do intestino médio de *L. umbratilis*, formada 24 h após o repasto sanguíneo, permitiu demonstraram a composição de uma camada única, apresentando-se na face ectoperitrófica a presença de grumos, possivelmente ocasionados agrupamentos de heme;

✓ Os testes histoquímicos permitiram evidenciar na matrix peritrófica de *L. umbratilis*, a presença de proteínas, principalmente, glicoproteínas ácidas sulfatadas com pH 1,0, glicoproteínas ácidas carboxiladas com pH 2,5 e glicoconjugados neutros;

✓ As proteínas identificadas neste estudo do IM e da MP de *L. umbratilis* precisam ser confirmadas por outras técnicas, para que possam ser depositadas em

um banco de dados de Diptera; decidimos então, repetir o procedimento para melhor divulgarmos. Pois, acreditamos que os poucos estudos envolvendo estudos proteômicos do IM ou MP e as suas sequências peptídicas não depositadas em bancos de proteínas limitam novas descobertas a cerca desta estrutura e dificultam seu entendimento, considerando que as proteínas envolvidas na constituição do IM e da MP podem variar de uma espécie para outra e, os cuidados empregados no momento da extração do IM e da MP, isso, de fato, pode ter influenciado na identificação das proteínas.

- ✓ Assim, consideramos que o estudo da MP de flebotomíneos é extremamente importante porque a eficácia da colonização de *Leishmania* está diretamente dependente da sua formação e influencia a sobrevivência e multiplicação de algumas espécies, esta barreira natural pode influenciar a competência vetorial e especificidade da espécie de parasito, podendo promover a sua sobrevivência através do escape de enzimas digestivas para a produção de enzimas, tais como quitinase produzido pelo parasito favorecendo parte da degradação da MP, a sua fuga e a colonização do intestino. Assim, o presente estudo forneceu detalhes da estrutura da MP de *L. umbratilis* que pode ser importante em futuros estudos sobre a interação deste vetor com seus agentes patogênicos, tais como *L. (V.) guyanensis*, no qual o vetor é primário na infecção ou propor um modelo para outras interações de espécies de insetos a partir do melhor conhecimento de sua estrutura;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, A. 1999. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*. v. 402, p. 715-720.

Aft, R. L.; Mueller, G. C. 1983. Hemin mediated DNA Strand Scission. *J. Biol. Chem.,* 258: 12063-12072 p.

Alexander, B. 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford, v. 14, n. 2, p. 109-122.

Alexander, B.; Usma, M. C. 1994. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology,* 88: 543-549.

Almeida, F. B. 1970. Flebótomos da Amazônia. Boletin do INPA*; Patologia Tropical*, nº 3. Manaus, p. 15.

Alvar J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux,; P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5): e35671.

Alvarenga, P. H. 2005. Estudo dos mecanismos de ligação de heme à matriz peritrófica de *Aedes aegypti. Tese de Doutorado*. Rio de Janeiro, xvii, 154 p.

Anderson, J. R.; Rico-Hesse, R. 2006. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg,* v. 75, n. 5, p. 886-892.

Andrade-Coelho, C. A. J.; Santos-Mallet, N. A.; Souza, V.; Lins, M. N.; Meirelles, F; Rangel, E. 2001. Ultrastructural features of the midgut epithelium of females *Lutzomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 96: 1141-1151.

Araújo, S. M. 2008. Ultramorfologia e análise ultraestrutural sobre a origem da membrana peritrófica em abelhas (Hymenoptera). *Tese de Doutorado*. Viçosa (MG), ix, II, 63 p.

Arias, J. R.; Naiff, R. D. 1981. The reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus central Amazon of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 76 (3): 279-286.

Arias, J. R.; Freitas, R. A. 1977. On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the central Amazon of Brazil.I. Preliminary fidings. *Acta Amazônica*, 7:293-294.

Arias, J. R.; Freitas, R. A. 1978. Sobre os vetores da Leishmaniose cutânea na Amazônia Central do Brasil II. Incidência de flagelados em flebotomíneos selváticos. *Acta Amazônica*, 8 (3): 387-396.

Baines, D. M. 1978. Observations on the peritrophic membrane of *Locusta migratoria* (R. and F.) nymphs. *Acrida*, Vol. 7, 11-21 p.

Beerntsen, B. T.; James, A. A.; Christensen, B. M. 2000. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* v. 64, n. 1, p. 115-137.

Billingsley, P. F.; Lehane, M. J. 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In Lehane, M.J. & Billingsley, P.F. (Eds.), Biology of the insect midgut, Londres, *Chapman & Hall*, 1 a. edição, p. 86-114.

Blackburn, K.; Wallbanks, K. R.; Molyneux, D. H.; Lavin, D. R.; Winstanley, S. L. 1988. The peritrophic membrane of the female sandfly *Phlebotomus papatasi. Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 82 (6): 613-619.

Bolognesi, R. 2005. *Síntese, degradação e funções da membrana peritrófica dos insetos*. São paulo (SP). Tese de Doutorado*.* p. 167.

Brandão-Filho S.P.; Carvalho F.G.; Brito M.E.F.; Almeida F.A.; Nascimento L.A. 1994. American Cutaneous Leishmaniasis in Pernanbuco: Eco-epidemilogical aspects in Zona da Mata Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89:445-449.

Brasil, Ministério da Saúde. 2014. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : *Ministério da Saúde*, 120 p.

Brasil, Ministério da Saúde 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2ª ed. atual. – Brasília: *Editora do Ministério da Saúde*, p. 180.

Brasil, Ministério da Saúde 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: *Editora do Ministério da Saúde*, p. 60.

Cameron, M. M.; Pessoa, F. A.; Vasconcelos, A. W. E Ward, R. D. 1995. Sugar meal sources for the phlebotomine sandflies *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. *Medicine and Veterinary Entomology,* 9: 263-272.

Castellón, E. G.; Fé, N. F.; Buhrnheim, P. F.; F. A. Fé. 2000. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) na Amazônia. II. Listagem das espécies coletadas na bacia petrolífera no Rio Urucu, Amazonas, Brasil, utilizando diferentes armadilhas e iscas. *Revista Brasileira de Zoologia,* 17: 455-462.

Casu, R.; Eisemann, C.; Pearson, R.; Riding, G.; Oriente, I; Tellam, RL. 1997. Antibody-mediated inhibition of the growth of larvae from an insect causing cutaneous myiasis in a mammalian host. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, Vol. 94. 8939–8944.

Chiu, D.; Lubin, B. 1989. Oxidative hemoglobin denaturation and RBC destruction: the effect of heme on red cell membranes. *Seminars in Hematology*, 26(2): 128-135.

Christensen, H. A.; Arias, J. R.; Vasquez, A. M.; Freitas, R. U. 1982. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the central Amazon of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 239-242.

Christensen, H. A.; Herrer, A. 1976. Neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae), invertebrate hosts of *Endotrypanum schaudinni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J. Med. Entomol.,* 13: 299-303.

Clark, A. G.; Eisen, M. B.; Smith, D. R.; Bergman, C. M.; Oliver, B.; Markow, T. A.; et al. 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, 450: 203-218.

Consoli, R. A. G. B.; Lourenço-de-Oliveira, R. L. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 2a. ed. Rio de Janeiro: *Fiocruz Editora*, 226p.

Corn, J. L.; Comer, J. A.; Erickson, G. A.; Nettles, V. F. 1990. Isolation of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype from phlebotomine sandflies in Georgia. *A. J. Trop. Med. Hug.,* 42: 476-482.

Coutinho-Abreu, I.V.; Sharma, N. K.; Robles-Murguia, M.; Ramalho-Ortigão, M. 2013. Characterization of Phlebotomus papatasi Peritrophins, and the Role of PpPer1 in Leishmania major Survival in its Natural Vector. *PLoS Negl Trop Dis*, **7**(suppl 3): e 2132. doi:10.1371/journal.pntd.0002132.

Dostálová, A.; Votýpka, J.; Favreau, A. J.; Barbian, K. D.; Volf, P.; Valenzuela, J. G.; Ryan, C.; Jochim, R. C. 2011. The midgut transcriptome of *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies. *BMC Genomics*, **12**: 223 p.

Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 27: 305-318.

Devenport, M.; Jacobs-Lorena, M. 2005. The Peritrophic Matrix of Hematophagous Insects. In: Marquardt W, editor. Biology of Disease Vectors. 2nd. *Elsevier Academic Press*. New York, p. 297–310.

Devenport, M.; Fujioka, H.; Donnelly-Doman, M.; Shen, Z.; Jacobs-Lorena, M. 2005. Armazenamento e Secreção de Ag-Aper14, um romance de proteína matriz peritrófica, e Ag-MUC1 do mosquito*Anopheles gambiae*. *Res tecido celular*, 320: 175-185.

Dillon, R. J.; Dillon, V. M. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 71-92.

Dinglasan, R. R.; Devenport, M.; Florens, L.; Johnson, J. R.; McHugh, C. A.; Donnelly-Doman, M.; Carucci, D. J.; Yates, J. R.; Jacobs-Lorena, M. 2009. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 125–134.

East, I. J.; Fritzgerald, C. J.; Pearson, R. D.; Donaldson, R. A.; Vacuolo, T. Cadogan, L. C.; Tellam, R. L.; Eiseman, C. H. 1993. *Lucilia cuprina*: inhibition of growth induced by immunization of hist sheep with extracts of larval peritrophic membrane. *International Journal of Parasitology*, v. 24, 221-229.

Elvin, C. M.; Vuocolo, T.; Pearson, R. D.; East, I. J.; Riding G. A.; Eisemann C, H.; Tellam, R. L. 1996. Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-4, from the larvae of *Lucilia cuprina*. *The Journal of Biological Chemistry,* 271 (15): 8925-8935 p.

Filho, B. P. D.; Lemos, F. J. A.; Secundino, N. F. C.; Páscoa, V.; Pereira, S. T.; Pimenta, P. F. P. 2002. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti* A chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 32: 1723-1729.

Forattini, O. P. 1973. *Entomologia Médica.* IV. Psychodidae. Leishmaniose. Bartonelose. *Edgard Blucher*, São Paulo, p. 658.

Forattini, O. P. 1996. *Culicidologia médica. Princípios gerais, morfologia e glossário taxonômico*. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, Vol. 1, 547 p.

Franco, A. M. R.; Pereira, M. A. S.; Freitas, R. A. 2010. Diversidade da fauna de flebotomíneos em área de assentamento no município de Rio Preto da Eva, Estado do Amazonas. In: In: Castellon, E.G.B.; Ronchi-Teles, B.; Ale-Rocha, R. Org. (Org.). *Entomologia na Amazônia Brasileira*. Manaus: Editora INPA, v. 01, p. 183-205.

Freitas, R. A.; Naiff, R. D.; Barret, T. V. 2002. Species Diversity and Flagellate Infections in the Sand Fly Fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera:

Psychodidae: Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 53-59p.

Funasa 2000. Fundação Nacional da Saúde. Disponível em: http://www.funasa.gov.br. Acesso: 25 de setembro de 2005.

Gemetchu, T. 1974. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 68 (1): 111-124.

Gharahdaghi, F; Weinberg, C. R.; Meagher, D. A.; Imai, B. S.; Mische, S. M. 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stainned polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis.* 20(3): 601-605.

Gil, L. H. S.; Araújo, M. S.; Villalobos, J. M.; Camargo, L. M. A.; Ozaki, L. S.; Fontes, C. J. F.; Ribolla, P. E. M.; Katsuragawa, T. H.; Cruz, R. M.; Silva, A. A.; Silva, L. H. P. 2009. Species structure of sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in the Brazilian western Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol.104, p. 20-24.

Gomes, L. H. M. 2003. Variação Mensal e Infecção Natural em *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha, 1977, *Lutzomyia anduzei* Rozeboom, 1942, *Lutzomyia flaviscutellata* Mangabeira, 1942 e *Lutzomyia olmeca nociva* Young & Arias, 1982 (Diptera: Psychodidae) por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em área de treinamento militar da Amazônia, Amazonas, Brasil. *Dissertação de Mestrado*, INPA/UFAM, p. 76.

Gomes, L. H. M.; Nery, L. C. R.; Pinheiro, F. G.; Freitas, R. A.; Franco, A. M. R. 2009. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em terra firme e planície fluvial na área de influência do gasoduto Coari-Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica.* vol. 39(1) 2009: 233–236.

Graf, R., Binz, H., Briegel, H., 1986. Monoclonal antibodies as probes for *Aedes aegypti* trypsin. *Insect Biochem*. 18, 463-470.

Grimaldi, G. Jr.; Tesh, R. B. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews,* 6 (3):230-250.

Guerra, J. A. O.; Prestes, S. R.; Silveira, H.; Coelho, L. I. D. A. R. C.; Gama, P.; Moura, A.; Amato, V.; Barbosa, M. G. V.; Ferreira, L. C. L. 2011. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon*. PLoS Neglected Tropical Diseases,* p. 5: e980.

Guo, W.; Li, G.; Pang, Y.; Wang, P. 2005. A novel chitin-binding protein identified from the peritrophic membrane of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 1224-1234.

Holt; R. A., Subramanian, G. M.; Halpern, A.; Sutton, G. G.; Charlab, R.; Nusskern, D. R.; Wincker, P.; Clark, A. G.; Ribeiro, J. M.; et al*.* 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 298 (5591): 129-49 p.

Huber, M.; Cabib, E.; Miller, L. H. 1991. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA. 88;1-4.

Ibrahim, G. H.; Smartt, C. T.; Kiley, L. M.; Christensen, B.M. 2000. Cloning and characterization os a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 30:1213-1222.

Jochim, R. C.; Teixeira, C. R. 2009. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol*, 25: 145-157.

Jochim, R. C.; Teixeira, C. R.; Laughinghouse, A.; Mu, J. B.; Oliveira, F.; Gomes, R. B.; Elnaiem, D. E.; Valenzuela, J. G. 2008. The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum chagasi*-infected sand flies. *BMC Genomics*, **9**:15.

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

Kamhawi, S.; Ortigão-M, R.; Pham, V. M.; Kumar, S.; Advogado, P. G.; Turco, S. J.; Barillas-Mury, C.; Sacks, D. L.; Valenzuela, J. G. 2004. A Role for Insect Galectins in Parasite. *Cell*. 119(3), 329-341.

Kato, N.; Mueller, C. R.; Fuchs, J. F.; Wessely, V. 2006. Mecanismos de regulação da biossíntese de quitina e papéis de quitina na formação da matriz peritrófica do intestino médio de adultos de *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 36: 1-9.

Kato, N.; Dasgupta, R.; Smartt, C. T.; Christensen, B. M. 2002. Glucosamine: frutose-6-phosphate aminotransferase: gene characterization, chitin biosynthesis and peritrophic matrix formation in *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol*. 11(3): 207-216.

Killick-Kendrick, R. 1979. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand fly, in: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), Biology of the kinetoplastida. *Academic Press* Vol. 2, 396-449 p.

Kramer, K. J.; Corpuz, L.; Choi, H.; Muthukrishnan, S. 1993. Sequence of a cDna and expression of the genes encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23: 691-701 p.

Lainson, R.; Shaw, J. J.; Ward, R. D.; Ready, P. D.; Naiff, R. D. 1979. Leishmaniasis in BraziI; XIII. Isolation of *Leishmania* from armadilhos (*Dasypus novemcintus*) and observations on the epidemiology of cutaneos leishmaniasis in north Pará State. *Trans. R. Soe. Trop. Med. Hyg.* 73 (2): 239-242.

Lainson, R. 1983. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77:569-596.

Lainson, R.; Shaw, J. J.; Pôvoa, M. 1981. The importance of edentates (sloths and anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of “pian-bois” in north Brazil. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.*, 75: 611-612.

Lainson, R.; Shaw, J. J. 2005. Chapter 17. New World leishmaniasis. *In*: Cox, F. E. G.; Kreier, J. P.; Wakelin, D. eds. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, *Parasitology*. Arnold, London, Sydney, Auckland; p. 313–349.

Landim, C. C. 2009. *Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas*. São Paulo: Ed. UNESP, 408 p.

Lee, R. F. 1968. The histology and histochemistry of the anterior midgut of *Periplaneta Americana* (Dictyoptera: Blattidae) with reference to the formation of the peritrophic membrane. *Proc. R. entomol. Soc. Lond. Ser. A.,* Vol. 43, 122-134 p.

Lehane, M. J. 1991. In: Biology of Blood-Sucking Insects, Harper Collins Academic, United Kingdon.

Lehane, M. J. 1997. Peritrophic matriz structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42: 525-550 p.

Lemke, T.; Stingl, U.; Egert, M.; Friedrich, M. W.; Brune, A. 2003. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6650-6658.

Lerner, E. A.; Ribeiro, J. M. C.; Nelson, R. J.; Lerner, M. R. 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol. Chem.* 266: 11234-6.

Lilburn, T. G.; Kim, K. S.; Ostrom, N. E.; Byzek, K. R.; Leadbetter, J. R.; Breznak, J. A. 2001. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. *Science,* 292: 2495-2498.

Mann, M.; Hendrickson, R. C.; Pandey, A. 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*. v. 70, p. 437-473.

Marinotti, O.; de Brito, M.; Moreira, C. K. 1996. Apyrase and alphaglucosidase in the salivary glands of Aedes albopictus. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 113:675– 679.

Marquardt, W. C. 2004. Biology of Disease Vectors. Burlington: *Elsevier Academic Press*, p. 377-386.

Marquardt, W. C.; Kondratieff, B. C. 2005. Biology of Disease Vectors. *Elsevier Academic Press*, 785 p.

Mittal, P. S.; Mittal, A. K. 2008. Glycoproteins in the Epithelium of Lips and Associated Structures of a Hill Stream Fish Garra lamta (Cyprinidae, Cypriniformes): A Histochemical Investigation. *Anat. Histol. Embryol*. 37: 101–113.

Nene, V.; Wortman, J. R.; Lawson, D.; Haas, B.; Kodira, C.; Tu, Z. J.; Loftus, B.; Xi, Z.; Megy, K.; Grabherr, M.; Ren, Q.; et al. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 316 (5832): 1718-23 pp.

Nery, L. C. R. ; Freitas, R. A. ; Franco, A. M. R. 2010. Fauna de flebotomíneos em fragmento florestal urbano no Amazonas. In: Castellón, E.G.B.; Ronchi-Teles, B.; Ale Rocha, R. (Org.). *Entomologia na Amazônia Brasileira*. Manaus: Editora *INPA*, v. 01, p. 247-261.

Nery, L. C. R. 2003. Distribuição, Diversidade e Biologia de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) da Área do Campus da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, Brasil, *Dissertação de Mestrado*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 107 pp.

Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis,* 9: 255-262.

Nyman, T. A. 2001. The role of mass spectrometry in proteoma studies. *Biomol. Eng.* v. 18, p. 221-227.

O'Farrell, P. Z.; Goodman, H. M.; O'Farrel, P. H. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12: 1133-1142.

Oliveira, R. L. 2005b. *Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura, J. R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 75-98 pp.

Pascoa, V.; Oliveira, P. L.; Dansa-Petretski, M.; Silva, J. R.; Alvarenga, P. H.; Jacobs-Lorena, M.; Lemos, F. J. A. 2002. *Aedes aegypti* peritrophic matriz and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 32: 517-523.

Pechan, T.; Cohen, A.; ; Williams, W. P.; Luthe, D. S. 2002. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matriz of caterpillars. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 99: 13319–13323.

Pessoa, F. A. C.; Medeiros, J. F.; Barrett, T. V. 2007. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 102, n. 5, p. 593-599.

Pessoa, S. B.; Martins, A. V. 1982. *Parasitologia Médica,* 11ª ed. Guanabara koogan, Rio de Janeiro, p. 872.

Peters, W. 1992. Peritrophic membranes. Zoophysiology Series. Vol. 30. Springer, Berlin, G.; Pimenta, P.F.P.; De Souza, W.. 1983. *Leishmania mexicana amazonensis* surface charge amastigote and promastigote forms. *Exp. Parasitol*. 56: 194-206.

Pimenta, P. F. P.; Freitas, V. C.; Secundino, N. F. C. 2012. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. 14: 1-45. Disponível em http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1. Acesso em 25 de junho de 2012.

Pimenta, P. F. P.; Modi, G. B.; Pereira, S. T.; Shahabuddin M.; Sacks D.;L. 1997. A novel role for the perithrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolitic activities of the sandfly midgut. *Parasitology,* 115: 359-369.

Pimenta, P. F. P.; Saraiva, E. M.; Rowton, E.; Mogi, G. G.; Garraway, L. A.; Beverley, S. M.; Turco, S.; 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* USA. 91, 9155-9159.

Pimenta, P. F. P.; Turco, S. J.; McConville, M. J.; Lawyer, P. G.; Perkins, P. V.; Sacks, D. L. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotas to the sand fly midgut. *Science*, 234: 212-214.

Prates, D. B. 2002. Aspectos da formação da matriz peritrófica de *Lutzomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae), vetor da leishmaniose tegumentar americana. Disponível em: http://twiki.ufba.br/twiki/pub/Biologia/ MonografiasEco20022/e2002-23.pdf. Acesso em 10 de Julho de 2012.

Ramalho-Ortigão, M.; Jochim, R. C.; Anderson, J. Mm; Lawyer, P. G.; Pham, V. M.; Kamhawi, S.; Valenzuela, J. G. 2007. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania major*-infected sandflies. *BMC Genomics*, **8:** 300 p.

Ranganathan, R.; Ross, E. 1997. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol.* 7(12): 770-773.

Rangel, E. F; Lainson, R. 2003. Transmissores de leishmaniose tegumentar Americana. In: Rangel. E. F; Lainson, R. editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: editora Fiocruz, 2003. 291-309.

Rayms-Keller, A.; McGraw, M.; Oray, C.; Carlson, J. O.; Beaty, B. J. 2000. Molecular cloning and characterization of a metal responsive *Aedes aegypti* intestinal mucin cDNA. *Insect Mol. Biol*. 9 (4): 419-426.

Ready, P. D.; Lainson, R.; Shaw, J. J.; Ward, R. D. 1986. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha (Diptera: Psychodidae). The major vector to man of *Leishmaniasis guyanensis* in north-easter Amazonia Brazil. *Bull. Ent. Res*., 76: 21-40.

Reid, G. D. F.; Lehane, M. J. 1984. Peritrophic membrane formation in three temperate simuliids, *Simulium ornatum, S. equinum* and *S. lineatum* with respect to the migration of onchocercal microfilariae. *Ann. Trop. Med. Parasitol.,* v. 78, 527-539.

Reznik, E. P.; Kuznetsova, L. A. 1983. The migration of microfilarians *Thamugadia ivaschkini* from the intestine to haemocoel of sand flies of the genus *Phlebotomus*. *Parazitologiya*, 17:36–41.

Richards, A. G.; Richards, P. A. 1977. The peritrophic membranes of insects. *Annu. Rev. Entomol*. 22: 210-240 p.

Richards, S.; Liu, Y.; Bettencourt, B. R.; Hradecky, P.; Letovsky, S.; Nielsen, R.; Thornton, K.; Hubisz, M. J.; Chen, R.; Meisel, R. P.; et al. 2005. Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: chromosomal, gene, and cis-element evolution. *Genome Res*. 15(1): 1-18 pp.

Rodriguez, J; Agudo, M.; Van Damme, J.; Vandekerckhove, J.; Santarén, J. F. 2000. Polypeptides differentially expressed in imaginal discs define the peroxiredoxin family of genes in *Drosophila*. *Eur J Biochem*. 267 (2): 487-97 p.

Romoser, W.S. 1996. The vector alimentary system. BJ Beaty, WC Marquardt, The Biology of Disease Vectors. 1a. edição. Colorado: University.

Rose, K.; Curtis, J.; Baldwin, T.; Mathis, A.; Kumar, B.; Sakathianandeswaren, A.; Spurck, T.; Low Choy, J.; Handman, E. 2004. Cutaneous leishmaniasis in red kangoroos isolation and characterization of the causative organism. *Int. J. Parasitol*., v. 34, p. 655-664.

Rozeboom, L. E. 1942. *Phlebotomus anduzei*, a new *Phlebotomus* from Venezuela. *Bol. Entomology,* Venezuela, 1: 91-94.

Ryter, R. W.; Tyrrel, R. M. 2000. Heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med*. 28: 289-309.

Sacks, D. L.; Saraiva, E. M.; Rowton, E.; Turco, S. J.; Pimenta, P. F. 1994. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competente. *Parasitology.* 108: 55-62.

Sádlová, J., Volf, P., 2009. Peritrophic matriz of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell Tissue Res*. 337(2), 313-325.

Sanders, H. R.; Evans, A. M.; Ross, L. S.; Gill, S. S. 2003. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem*. *Mol. Biol*. 33, 1105-1122.

Saraiva, L.; Andrade-Filho, J. D.; Falcão, A. L.; Carvalho, D. A. A.; Souza, C. M.; Freitas, C. M.; Lopes, C. R. G.; Moreno, E. C.; Melo, M. N. 2011. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral *Leishmania*sis: Characterization of favored locations as determined by spatial analysis. *Acta Tropica*, 117: 137-145.

Sarauer, B. L.; Gillott, C.; Hegedus, D. 2003. Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Mol. Biol*. 12(4): 333-343.

Savill, J; Johnson, R. J. 1995. Glomerular remodelling after inflammatory injury. *Exp Nephrol* 3: 149–158.

Schaefer, C. H.; Miura, T. 1972. Sources of energy utilized by natural populations of the mosquito, Culex tarsalis, for overwintering. *J Insect Physiol*. 18, 797–805.

Schlein, Y.; Jacobson, L.; Shlomai, J.. 1991. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc. R. Soc*. Lond. 245: 121-126 p.

Schmitt, T. H.; Frezzatti Jr, W. A.; Schereier, S. 1993. Hemin induced lipid membrane disorder and increased permeability: a model for the mechanism of cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys*. 307: 96 103.

Schorderet, S.; Pearson, R. D.; Vuocolo, T.; Eisemann, C.; Riding, G. A.; Tellam, R. L. 1998. cDNA and deduced amino acid sequence of a peritrophic membrane glycoprotein, peritrophin-48 from the larvae of *Lucilia cuprina. J. Biol. Chem* 273 (28): 17665-17670.

Shimabukuro, P. H. F.; Galati, E. A. B. 2010. Checklist of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) from São Paulo State, Brazil, with notes on their geographical distribution. *Biota Neotropica*, 11: 1-20.

Secundino, N. F. C.; Eger-Mangrich, I.; Braga, E. M.; Santoro, M. M.; Pimenta, P. F. P. 2005. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, chemical composition. *J Med Entomol*, 42: 928–938.

Shahabuddin, M.; Toyoshima, T.; Aikawa, M.; Kaslow, D. C. 1993. Transmission blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc. Natl. Acad. Sci*. U.S.A. 90: 4266-4270.

Shao, L.; Devenport, M.; Fujioka, H.; Ghosh, A.; Jacobs-Lorena, M. 2005. Identificação e Caracterização de uma nova proteína peritrófica Matriz, Ae-Aper50, ea proteína de membrana microvilares, AEG12, a partir do mosquito, *Aedes aegypti* . *Insect Biochem Mol Biol* . de 2005; 35 :947-959.

Shao, L.; Devenport, M.; Jacobs-Lorena, M. 2001. The Peritrophic Matrix of Hematophagous Insects. *Arch Insect Biochem Physiol*, 47:119–125.

Shaw, J. J. 1992. *Endotrypanum*, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. An evolutionary link or na evolutionary backwater? *Ciência Cultura,* 44: 107-116.

Shen, Z.; Dimopoulos, G.; Kafatos, F. C.; Jacobs-Lorena, M. 1999. A cell surface mucin specifically expressed in the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambie. Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA. 96: 5610-5615.

Shen, Z.; Jacobs-Lorena, M. 1998. A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin - clonig, expression and characterization. *J. Biol. Chem*. 273: 17665-17670.

Shi, X.; Chamankhah, M.; Visal-Shah, S.; Hemmingsen, S. M.; Erlandson, M.; Braun, L.; Alting-Mees, M.; Khachatourians, G. G.; O´Grady, M.; Hegedus, D. D. 2004. Modeling the structure of the Type I peritrophic matrix:characterization of a *Mamestra*

configurata intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect Biochem. Mol*. Biol. 34(10):1101-1115.

Silva, D. F.; Freitas, R. A.; Franco, A. M. R. 2007. Diversidade e Abundância de Flebotomíneos do Gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) em Áreas de Mata do Nordeste de Manacapuru, AM. *Neotropical Entomology* 36(1):138-144.

Silveira, F. T.; Ishikawa, E. A. Y.; De Souza, A. A. A.; Lainson, R. 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*, 85: 43-50.

Sinan net. 2014. Sistema de informação de agravos de notificação (Brasil). Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan net. Disponível em: <http://dtr2014.saude.gov.br/sinanweb> . Acesso em: 10 setembro 2014.

Skraba, C. M.; Pedroso, R. B.; Fiorini, A.; Rosado, F. R.; Aristides, S. M. A.; Lonardoni, M. V. C.; Teixeira, J. J. V.; Silveira, T. G. V. 2014. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of Leishmania (Viannia) braziliensis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, New York, v. 78, n. 4, p. 411-417.

Soares, F. V. 2012. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar e a descrição da população flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no município de Tabatinga, Amazonas, Br. Manaus. *Dissertação de Mestrado*, INPA/FUA, p. 119.

Soares, R. P. P.; Cardoso, T. L., Barron, T.; Araújo, M. S. S.; Pimenta, P. F. P.; Turco, S. J. 2005. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol*. 35: 245-253.

Tellam, R. L.; Vuocolo, T.; Eisemann, C.; Briscoe, S.; Riding, G.; Elvin, C.; Pearson, R. 2003. Identification of an immuno-protective mucin-like protein, peritrophin-55, from the peritrophic matrix of *Lucilia cuprina* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 33: 239-252.

Tellam, R. L.; Wijffels, G.; Willadsen, P.. 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem.Mol. Biol*. 29: 87-101.

Tellam, R. L. 1996. The peritrophic matrix. MJ Lehane, PF Billingsley, Biology of the insect midgut. 1a. edição. London, *Chapman & Hall*, 86-114.

Terra, W. R.; Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. B,* 109: 1-62 p.

Terra, W.R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev. Entomol*. 35: 181- 200.

Terra, W. R. 1996. Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Ciência e Cultura*, 48: 317-324.

Trayhurn, P. 2000. Proteomics and Nutrition – A science for the first decade of the new Millennium. *British J. of Nutrition,* v. 83, p. 1-2.

van Zandbergen, G.; Klinger, M.; Mueller, A.; Dannenberg, S.; Gebert, A.; Solbach, W.; Laskay, T. 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*. 173, 6521-6525.

Vincent, S. H. 1989. Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids. *Seminars in Hematology*, 26: 105-113 p.

Vincent, S. H.; Grady, R. W.; Shaklai, N.; Snider, J. M. and Muller Eberhard, U. 1988. The influence of heme binding proteins by heme catalysed oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 265: 539-550 p.

Volf, P.; Myskova, J. 2007. Sand flies and Leishmania: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology*: 23, 91-92.

Vuocolo, T.; Eisemann, C. H.; Pearson R. D., Willadsen P.; Tellam, R. L. 2001. Identification and molecular characterization of a peritrophin gene, peritrophin-48, from the myiasis fly *Chrysomya bezziana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 919-932.

Walters L. L.; Irons K. P.; Modi, G.;B.; Tesh R.;B. 1992. Refractory barriers in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 46:211-218.

Walters, L. L.; Irons, K. P.; Guzman, H.; Tesh, R. B. 1993. Formation and composition of the peritrophic membrane in the sandfly, *Phebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol*. 30: 192-197.

Walters, L. L.; Irons, K. P.; Guzman, H.; Tesh, R. B. 1995. Peritrophic envelops of *Lutzomyia spinicrasa* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 32 (5): 711-725 p.

Wang, P.; Granados, R. R. 2001. Molecular structure of peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. *Archives fo Insect Biochemistryand Physiology*, 47:110-118.

Wang, P.; Li, G.; Granados, R. R. 2004. Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 215-227.

Wang, P; Granados, R. R. 1997a. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancing. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 94: 6977-6982.

Warburg, A. 1991. Entomopathogens of phlebotomine sand flies: laboratory experiments and natural infections. *J. Invert. Pathol.*, 58: 189-202.

Ward, R. D.; Fraiha, H. 1977. *Lutzomyia umbratilis*, a new species of sand fly from Brazil (Diptera: Psychodidae). *Journ. Med. Entomol.,* 14(3): 313-317.

Wijffels, G.; Eiseman, C.; Riding, G.; Pearson, R.; Jones, A.; Willadsen, P.; Tellam, R. 2001. A novel family of chitin-binding proteins from insect type 2 peritrophic matrix cDNA sequences, chitin binding activity, and cellular localization. *J. Biol. Chem* 276: 15527-15536.

WHO, World Health Organization 2010. Leishmaniasis: background information. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/en/. (Acesso em 2 julho de 2012).

Yin, J.; Zhong, T.; Wei, Z.-Jun.; Li, K.-B.; Cao, Y.-Z.; Guo, W. 2011. Molecular characters and recombinant expression of the carboxylesterase gene of the meadow moth *Loxostege sticticalis L*. (Lepidoptera: Pyralidae). *African Journal of Biotechnology,* Vol. 10 (10): 1794-1801.

Young, D. G.; Duncan, M. A. 1994. *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sanflies in Mexico, West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. Memoirs of the American Entomological Institute, nº 54, Associated Publishers, Gainesville, p. 881.

Yu, Z.; Zeng, G. M.; Chen, Y. N.; Zhang, J. C.; Yu, Y.; Li, H.; Liu, Z. F.; Tang, L.; 2011. Effects of inoculation with Phanerochaete chrysosporium on remediation of pentachlorophenol-contaminated soil waste by composting. *Process Biochem.* 46: 1285–1291 p.

9. ANEXO

INPA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

PPG/ENT
Programa de Pós Graduação em Entomologia

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

ATA DE DEFESA PRESENSIAL PÚBLICA

DOUTORADO

Aos **vinte e um** dias do mês de **setembro** do ano de **2012**, às 14h, na Sala de Aula de Microorganismos/CSAS, reuniu-se a Banca Examinadora de Defesa Pública, composta pelos seguintes Professores Doutores: Jorge Luis López-Lozano (FMT); Sônia Rolim Reis (INPA); Felipe Arley da C. Pessoa (FIOCRUZ-AM); Ormezinda Celeste C. Fernandes (FIOCRUZ-AM) e Flavia Regina A. C. Naief Moreira (UFAM), tendo como suplentes: Gislene Almeida Carvalho-Zilse (INPA) e Wallice Paxiuba Duncan (UFAM), a fim de proceder a argüição pública da **TESE DE DOUTORADO** de **Luís Henrique Monteiro Gomes**, intitulada: "Diversidade de flebotomíneos e características morfológicas e protéicas da matriz peritrófica de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*", cujo trabalho foi conduzido sob a orientação da Dra. Antonia Maria Ramos Franco – INPA e co-orientação da Dra. Liliane Coelho da Rocha.

Após a exposição, a discente foi argüida oralmente pelos membros da Banca Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES	PARECER		ASSINATURA
Jorge Luis López-Lozano	(X) Aprovado	( ) Reprovado	
Sônia Rolim Reis	(X) Aprovado	( ) Reprovado	
Felipe Arley da C. Pessoa	(X) Aprovado	( ) Reprovado	
Ormezinda C. C. Fernandes	(X) Aprovado	( ) Reprovado	
Flavia Regina A. C. N. Moreira	(X) Aprovado	( ) Reprovado	Flavia R. A. C. N. Moreira
Gislene Almeida Carvalho-Zilse	( ) Aprovado	( ) Reprovado	
Wallice Paxiuba Duncan	( ) Aprovado	( ) Reprovado	

(X) **A**provada (indica que as modificações mesmo extensas podem ser incluídas a juízo do orientador)
( ) **A**provada com "**D**istinção" ( ) **A**provada com "**D**istinção e **L**ouvor"

( ) **R**eprovada (indica que o material não é adequado para uma Dissertação/Tese e que o aluno não deve receber o título pleiteado)

JUSTIFICATIVA (Obrigatória em caso de reprovação)

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora.

José Wellington de Morais
Coord. do PPG-ENT/INPA

INPA/PPGENT – Av. André Araújo, 2936 – Aleixo,
Caixa Postal: 478 – CEP: 69060-001 Manaus-AM.
Fone – Fax: (+55) 92 3643-3203
E-mail: cursoent@inpa.gov.br http://pg.inpa.gov.br