

JULIANA MALTA

**EFEITOS DE ANTISSOROS ESPECÍFICOS PARA PROTEÍNAS
ASSOCIADAS A MATRIZ PERITRÓFICA, SILENCIAMENTO GÊNICO DA
QUITINASE 1 E MORFOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DURANTE A
METAMORFOSE DE FLEBOTOMÍNEOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Malta, Juliana, 1985-
M261e Efeitos de antissoros específicos para proteínas associadas a
2016 matriz peritrófica, silenciamento gênico da quitinase 1 e
morfologia do intestino médio durante a metamorfose de
flebotomíneos / Juliana Malta. – Viçosa, MG, 2016.
xi, 97f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Flebotomíneos. 2. *Phlebotomus papatasi*. 3. *Lutzomyia longipalpis*. 4. Proteínas. 5. Silenciamento gênico. 6. Quitinases. 7. Intestino médio - Morfologia. 8. Leishmaniose. 9. *Leishmania*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

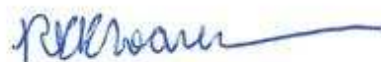
CDD 22. ed. 595.772

JULIANA MALTA

**EFEITOS DE ANTISSOROS ESPECÍFICOS PARA PROTEÍNAS ASSOCIADAS
A MATRIZ PERITRÓFICA, SILENCIAMENTO GÊNICO DA QUITINASE 1 E
MORFOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DURANTE A METAMORFOSE DE
FLEBOTOMÍNEOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de julho de 2016.



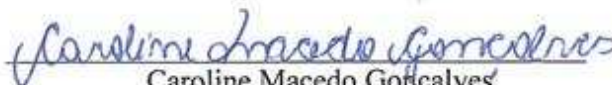
Rodrigo Pedro Pinto Soares



Clóvis Andrade Neves



Ricardo Nascimento Araujo



Caroline Macedo Gonçalves



Gustavo Ferreira Martins
(Orientador)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

- Martin Luther King -

Aos meus amados pais, exemplos de humildade, força de vontade e de firmeza no trabalho. Pelo incentivo e encorajamento de sempre, por todas as vezes em que se privaram de muitos dos seus anseios em função dos meus sonhos e dos meus irmãos.

Pela sabedoria com a qual nos educaram.

Ao meu querido Vicente, pelo amor, respeito e cuidado.

Com muito amor dedico...

AGRADECIMENTOS

De fato tenho muito que agradecer a Deus por este período em Viçosa. Nos últimos 4 anos Deus me permitiu valiosas experiências pessoais: meu casamento, amizades verdadeiras, um estágio no exterior (embora doloroso, foi também tempo de muito aprendizado), despedida de Viçosa. Em todos esses momentos tive o apoio e carinho de pessoas especiais, por isso agradeço...

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Geral (DBG) pela oportunidade, à CAPES pelo suporte financeiro durante o doutorado incluindo a Bolsa de estudos para doutorado sanduíche.

Ao meu orientador, Gustavo Martins, pela confiança, por todas as oportunidades cedidas ao longo do meu doutorado, pela paciência quando a vida pessoal interferiu nos experimentos, pelo jeito sério e honesto de trabalhar, que sempre me servirá de inspiração. Por auxiliar meu crescimento intelectual e profissional com seu exemplo de dedicação e esforço ao trabalho. Minha gratidão, admiração e respeito.

Ao meu co-orientador, Marcelo Ortigão, pelo auxílio durante a realização deste trabalho, por me receber em seu laboratório durante o estágio no exterior, pela paciência de sempre, por me encorajar e animar quando as coisas não saíram da forma que planejei.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular de Insetos do DBG-UFV, pela convivência agradável, em especial à Carol Macedo, Kenner e Renata, pela presteza de sempre. Agradeço também à Nadja pela parceria nos cursos de ultramicrotomia.

Aos amigos do *Biology of Disease Vectors Laboratory*, Luciana, Tatiana, Ju Lin e Matt por todo auxílio nos experimentos, pelas risadas, pelos conselhos e bons momentos compartilhados.

Aos professores da disciplina Laboratório de biologia celular (BIO112) pela oportunidade de ministrar aulas durante dois semestres, foram, certamente, os meses mais felizes do meu doutorado.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pela estrutura para a realização dos experimentos.

À Beth secretária da Pós-Graduação, pela presteza e gentileza.

Ao meu querido amigo Rúdo pela amizade, pela valiosa contribuição nas análises estatísticas, pelas conversas e conselhos. À minha querida amiga Samira, pela cumplicidade e por nossa amizade recente que mais parece ser de infância.

Aos estudantes do Laboratório de Ultraestrutura Celular pelo auxílio em alguns experimentos e por compartilharmos reagentes e equipamentos. Ao Professor Serrão por ter cedido alguns anticorpos.

Às amigas conquistadas em Viçosa durante o mestrado e doutorado, Juliana Silveira, Wemerson, em especial à Dodora e Patrícia, pela amizade e por terem compartilhado comigo momentos importantes.

À Dorinha pelas orações e pelo carinho que tem comigo.

Aos amigos de Manhattan, Ana Julia, Maurícia, Tatiana, Mandy, Erick, Zainab e outros, pelo apoio e boa convivência durante o estágio no exterior.

À minha família, meus pais Genício e Madalena, por sempre fazerem da educação dos filhos uma prioridade, mesmo com tantas dificuldades que a vida nos impôs. Pela sabedoria e humildade com a qual educaram seus quatro filhos. Agradeço também aos meus queridos irmãos Lé, Juninho e Gui, pelo apoio, pelas palavras de incentivo e carinho, pela amizade que temos e por todas as vezes que disseram que se orgulham de mim, saibam que o orgulho é todo meu pelas pessoas que são, amo vocês!

À minha sobrinha, Maria Alice, pela semelhança e por alegrar meus dias desde que veio ao mundo.

Ao meu amor, Vicente, pelo amor e cumplicidade, por me apoiar e acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava. Agradeço por me ensinar todos os dias com suas atitudes o significado das palavras companheirismo, otimismo, respeito e paciência. Ter você ao meu lado me faz refletir sobre o verdadeiro sentido da vida: amar e ser amada. Obrigada meu amor, por não medir esforços para me fazer feliz, saiba que reconheço cada gesto seu e sou imensamente grata a Deus por ter você em minha vida, te amo!

Ao meu querido avô Alexandre, pela sabedoria com a qual tem vivido seus 95 anos de idade e por ser um exemplo de vida para mim. Às minhas queridas avós Alzira e Tarcila (*in memoriam*), pela ternura e carinho e pela presença constante no meu coração em forma de saudade.

Às amigas de longa data: Ivny, Micheli, Tamara, Leilane, Leila, Aloirta e Flaviane pela amizade e por sempre torcerem por mim e comemorarem comigo as minhas conquistas, mesmo que à distancia.

Aos meus familiares, em especial a minha querida Tia Isabel e meu primo Marcelo, pelo carinho e cuidado durante o período que morei nos EUA.

Enfim, agradeço à todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e peço perdão aos que não foram citados.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 - Introdução e revisão bibliográfica	1
1.1- Flebotomíneos	1
1.2 - Interação vetor-parasito	3
1.3 - O intestino médio dos insetos	7
1.4 - Renovação do epitélio do intestino médio durante o desenvolvimento pós- embrionário de insetos	10
1.5 - Matriz peritrófica (MP).....	13
1.5.1 - Tipos e papéis da MP.....	13
1.5.2 - Estrutura e composição da MP	15
1.5.3 - Degradação da MP.....	17
2- Referências bibliográficas	19
3 - Objetivos	30
4 - Capítulo 1 - Artigo - Effects of specific antisera targeting peritrophic matrix- associated proteins in the sand fly vector <i>Phlebotomus papatasi</i>.	31
5 - Capítulo 2 - Silenciamento gênico por rna de interferência da quitinase <i>PpChit1</i> no intestino médio de <i>Phlebotomus papatasi</i>.	41
1 - Introdução	42
2 - Material e métodos.....	45
3 - Resultados e discussão.....	49
4 - Referências bibliográficas.....	54
6 - Capítulo 3 - Morfologia do intestino médio de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e <i>Phlebotomus papatasi</i> durante a metamorfose	577
1 - Introdução	58
2 - Material e métodos.....	61
3 - Resultados	64
4 - Discussão	69
5 - Referências bibliográficas.....	92
7 - Considerações finais	96

RESUMO

MALTA, Juliana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Efeitos de antissoros específicos para proteínas associadas a matriz peritrófica, silenciamento gênico da quitinase 1 e morfologia do intestino médio durante a metamorfose de flebotomíneos.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins. Coorientador: José Marcelo Ramalho Ortigão.

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são importantes vetores das leishmanioses, doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, distribuídos em dois grandes gêneros de importância médica: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Após a ingestão de sangue o bolo alimentar é envolto por uma matriz quitino-proteica, chamada matriz peritrófica (MP). Em uma infecção por *Leishmania*, o intestino do vetor tem papel crucial, pois, para se estabelecer, o protozoário deve escapar do espaço endoperitrófico e se fixar na parede do intestino para evitar sua eliminação durante a excreção. Nesse sentido, a MP funciona como barreira ao desenvolvimento do parasito, sendo um componente importante na competência vetorial de flebotomíneos. Neste trabalho foi estudado o efeito da alimentação com células sanguíneas reconstituídas com anti-soros específicos para duas proteínas associadas à MP, a quitinase PpChit1 e a peritrofina PpPer2, na morfologia da MP de fêmeas de *Phlebotomus papatasi*. A MP foi avaliada por microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (24, 42–46, 48 e 72 h após a alimentação), microscopia de força atômica (MFA) (30 h após a alimentação) e microscopia confocal (WGA-FITC) (72 horas após a alimentação). Nesta mesma espécie, também foi estudado a inibição da expressão de PpChit1 pela técnica de RNA de interferência (RNAi) após a injeção de dsPpChit1 (24, 48, 72 e 96 h após a alimentação sanguínea). Adicionalmente, o desenvolvimento pós embrionário do intestino médio foi investigado nas seguintes fases/estágios: larvas de 4º instar com três dias (L4-3) e com cinco dias (L4-5) após a ecdise, pré-pupa, pupa 24 horas e 72 horas após início da metamorfose e adulto recém-emergido, nos flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e *P. papatasi*. Amostras de intestinos médios dissecados de cada fase foram avaliados por microscopias de luz (ML), eletrônica de transmissão (MET) e fluorescência. Verificamos que a alimentação de fêmeas de *P. papatasi* com antissoros específicos para PpChit1 e PpPer1, levou a um aumento na espessura da MP 72 h após a alimentação, bem como um aumento na amplitude da rugosidade na superfície da MP 30 h após a

alimentação. A detecção de quitina com WGA-FITC, identificou que 72 h após a alimentação com anti-PpChit1, o conteúdo de quitina associada a MP no intestino médio do inseto era maior que nos insetos alimentados com soro *naïve*. A alimentação com antisoros específicos contra as proteínas associadas a MP (PpChit1 e PpPer2) afetam a cinética de maturação e degradação da MP, evidenciando o papel dessas proteínas na estruturação da MP de *P. papatasi*. A injeção de dsPpChit1 levou a uma redução nos níveis de transcritos em todos os horários analisados, sendo esses resultados o primeiro passo para contribuir futuramente para o entendimento do papel de PpChit1 na MP *P. papatasi*. As mudanças morfológicas no intestino médio das duas espécies tiveram início no quarto instar larval, no entanto, em *P. papatasi* o processo degenerativo das células epiteliais iniciou um pouco antes em L4-3 enquanto que em *L. longipalpis* em L4-5. Durante a metamorfose, células regenerativas foram vistas na base do epitélio, nas duas espécies. Além disso, as marcações positivas para a histona fosforilada H3, em ambas, sugerem que as células regenerativas se dividem durante o processo de remodelamento do intestino médio em flebotomíneos. A histólise do epitélio intestinal larval se dá possivelmente por autofagia, pela presença de numerosos vacúolos autofágicos, bem como por marcações positivas para a proteína LC3, entretanto, a detecção de caspase-3 sugere que a apoptose possa acontecer durante o processo de troca do epitélio larval pelo do adulto. Finalmente, o estudo do remodelamento do intestino médio em *P. papatasi* e *L. longipalpis* mostrou de forma inédita que o processo é conservado nas duas espécies, se diferenciando apenas no tempo do início do processo degenerativo entre as duas espécies. Os conhecimentos relacionados as proteínas da MP, bem como ao desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio em flebotomíneos, o qual tem papel fundamental na transmissão de *Leishmania*, são importantes para uma melhor compreensão do inseto vetor.

ABSTRACT

MALTA, Juliana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Effects of specific antisera targeting PM associated proteins, knockdown of chitinase 1 and midgut morphology during metamorphosis in sandflies.** Adviser: Gustavo Ferreira Martins. Co-adviser: José Marcelo Ramalho Ortigão.

Sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are vectors of Leishmaniasis, a disease caused by parasitic protozoa of the genus *Leishmania*. They are distributed in two large medical importance genus: *Phlebotomus* from the Old World, and *Lutzomyia* from the New World. *Leishmania* suprapilarian life cycle in the vector midgut begins when insect females intake infected blood with amastigotes forms from the vertebrate host. After the blood meal, the food bolus is surrounded by a chitin-protein layer, called peritrophic matrix (PM). Sand fly midgut plays a crucial role during a *Leishmania* infection. In order to survive and develop, *Leishmania* parasites must escape from endoperitrophic space and attach themselves in the intestinal epithelium, preventing excretion with the fecal pellets. The PM can act as a barrier to parasite development, working as a relevant component in the vector competence. This study investigated the effects of reconstituted blood cells feeding with specific antisera targeting two PM associated proteins, chitinase PpChit1 and peritrophin PpPer2 in the PM formation. The PM was studied under light (LM) and transmission electron (TEM) microscopies (24, 42-46 , 48 and 72 h after blood meal), under atomic force microscopy (AFM) (30 h after blood meal) and under confocal microscopy (WGA-FITC) (72 hours after blood meal) in *Phlebotomus papatasi*. PpChit1 knockdown was performed in *P. papatasi* by means RNA interference technique (RNAi) after dsPpChit1 injection (24, 48, 72 and 96 h after blood meal). Additionally, the post-embryonic development of the midgut was investigated in the following life-stages: 4th instar larvae three days (L4-3) and five days (L4-5) after molting, pré-pupae, pupae 24 hours and 72 hours, and newly emerged adult in *Lutzomyia longipalpis* and *P. papatasi*. Midgut samples from each stage were dissected and assessed by LM, TEM and immunofluorescence. *P. papatasi* females feeding with anti-PpChit1 and anti-PpPer1 had the PM thickness increased at 72 h after blood meal, as well as a PM roughnes's amplitude increase at 30 hr after feeding. WGA-FITC staining indicates that PM chitin content on insect midgut was higher in treated individuals than those treated with naïve serum. The

feeding of *P. papatasi* females with red blood cells reconstituted with antisera targeting PM associated proteins (PpChit1 and PpPer2) affected the PM maturation and degradation, indicating the role of these proteins on PM structure. Injection of dsPpChit1 led to significant decrease in corresponding mRNA levels. These results are the first step on contribution to understand PpChit1 role in *P. papatasi* PM. The midgut metamorphosis in of the two species begins in the 4th instar, however, in *P. papatasi*, epithelial cells degeneration started shortly, in L4-3, while in *L. longipalpis* it began in L4-5. Larval gut epithelium degeneration was intensified in pré-pupa in both species by the presence of numerous autophagic vacuoles. During metamorphosis, midgut remodeling occurs by differentiation of stem or regenerative cells to replace larval digestive cells. Regenerative cells were seen at the epithelium basal region in both species. Furthermore, the detection of phosphohistone H3-positive cells suggested that the stem cells can divide during the remodeling process of the midgut. Stem cells in proliferation and differentiation were seen forming the new digestive epithelium in the pupae. Larval midgut replacement possibly occurs by autophagy by the presence of numerous autophagic vacuoles, as well as by the detection of LC3-positive cells. Additionally, cells positive for caspase-3 suggested that the apoptosis may occur during the elimination of larval epithelium. Finally, the study of midgut remodeling in *P. papatasi* and *L. longipalpis* was showed for the first time, and this process is conserved in these species, differing only in the time of th beginning of the degenerative processof the midgut epithelium. The study of MP formation as well as the post-embryonic development of the midgut of sandflies represent important steps for a better vector biology understanding.

1 – Introdução e revisão bibliográfica

1.1- Flebotomíneos

Flebotomíneos são insetos dípteros da subordem Nematocera pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, são considerados vetores naturais de alguns agentes etiológicos de doenças humanas e animais, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (revisado por Killick-Kendrick, 1990). Possuem também capacidade vetorial para bactéria *Bartonella bacilliformis* e agentes de algumas arboviroses também de importância médica (Shaw et al, 2003; Sherlock, 2003). O protozoário *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) é o agente etiológico causador das leishmanioses. As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas por protozoários do gênero *Leishmania* e constituem uma doença com complexo e variado espectro clínico e epidemiológico, desde lesões cutâneas, até sua forma visceral potencialmente fatal. Presente em mais de 98 países, as leishmanioses re-emergem como um grave problema de saúde pública, atingindo principalmente pessoas de baixa renda. Cerca de 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção e estima-se que a cada ano, a incidência de novos casos das diferentes formas clínicas seja de 1,5 a 2 milhões. Entretanto, esse número pode estar subestimado, uma vez que as leishmanioses não são notificadas em todos os países nos quais elas ocorrem (Desjeux, 2004; WHO, 2015).

De aproximadamente 800 espécies conhecidas de flebotomíneos em todo mundo, cerca de 90 tem sido implicadas na transmissão de Leishmanioses (Aguiar e Medeiros, 2003; WHO, 2015). Devido a importância médica e veterinária que apresentam, os flebotomíneos são distribuídos em dois grandes gêneros, onde a transmissão da leishmaniose no Novo Mundo (América Central e do Sul) está associada a espécies do gênero *Lutzomyia* e, no Velho Mundo, a espécies do gênero *Phlebotomus* (Young e Duran, 1994). A maioria das espécies de flebotomíneos tem ampla distribuição geográfica, sendo mais abundantes principalmente nas zonas temperadas ao nível do mar (Rangel e Lainson, 2003), no entanto podem também ser encontrados em elevadas altitudes como na cordilheira dos Andes (Aragão e Lima, 1987).

Flebotomíneos, assim como os demais dípteros, são insetos holometábolos, passam pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Killick-Kendrick,

1999). As formas imaturas têm habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. Os adultos são alados, apresentam cor amarelados ou castanhos, são insetos de pequeno porte com aproximadamente dois a três mm de comprimento (Rangel e Lainson, 2003). Na natureza os criadouros de flebotomíneos são de difícil localização, as larvas são terrestres e alimentam-se de matéria orgânica do solo. Já as pupas fixam-se ao substrato e não se alimentam, sofrem metamorfose e atingem a fase adulta. Os flebotomíneos adultos, tanto machos como fêmeas, vivem em abrigos úmidos como fendas de árvores, tocas de animais e fendas de pedras. Utilizam a seiva de plantas e secreções açucaradas de afídeos na alimentação como fonte de energia para as suas atividades de voo, acasalamento e postura (Brazil e Brazil, 2003). Esses insetos possuem características peculiares que facilitam seu reconhecimento: corpo densamente coberto por pelos, quando pousam mantém suas asas semiabertas acima do abdome e seu voo é curto, baixo e saltitante (Killick-Kendrick, 1999, Rangel e Lainson, 2003).

O ciclo de vida de flebotomíneos é mostrado esquematicamente na figura 1, diferentemente de outros dípteros hematófagos, o desenvolvimento das formas imaturas não ocorre na água, os ovos, larvas e pupas de flebotomíneos se desenvolvem em locais úmidos e ricos em matéria orgânica (Killick-Kendrick, 1999). A duração precisa de cada fase do desenvolvimento é difícil de ser estabelecida, pois pode ser afetada pela temperatura ambiente, em baixas temperaturas a duração de cada fase pode se estender, enquanto em altas temperaturas a duração pode ser mais curta (Macedo-Silva et al, 2014). Sob condições experimentais, os ovos de *L. longipalpis* eclodem comumente após seis a nove dias a partir da oviposição. Os quatro estágios larvais tem duração de cerca de 14 a 19 dias e após o quarto estágio larval, os insetos entram na fase de pupa por oito a nove dias até os adultos emergirem. O período do desenvolvimento desta espécie é de 35 dias, sendo que uma média de 25 a 42 dias é considerada (Rangel et al, 1986).

Somente as fêmeas dos flebotomíneos necessitam da alimentação sanguínea, e portanto, são responsáveis pela transmissão de patógenos. No entanto, para servir como vetoras, as fêmeas devem viver tempo suficiente para conseguirem realizar um segundo repasto sanguíneo e assim serem capazes de transmitir o patógeno a um novo hospedeiro (Sherlock, 2003). O sangue ingerido pelas fêmeas é uma importante fonte de proteínas, necessária para a maturação do folículo ovariano e produção de

ovos (Soares e Turco, 2003; Munstermann, 2004). Componentes do sangue também são importantes para os patógenos no interior dos insetos. Os carboidratos do sangue, por exemplo, além de servirem como fonte de energia, podem interferir no desenvolvimento e na infecciosidade de *Leishmania* que dependem desta dieta para sustentar o seu crescimento no tubo digestivo dos flebotomíneos (Jacobson e Schlein, 2001).

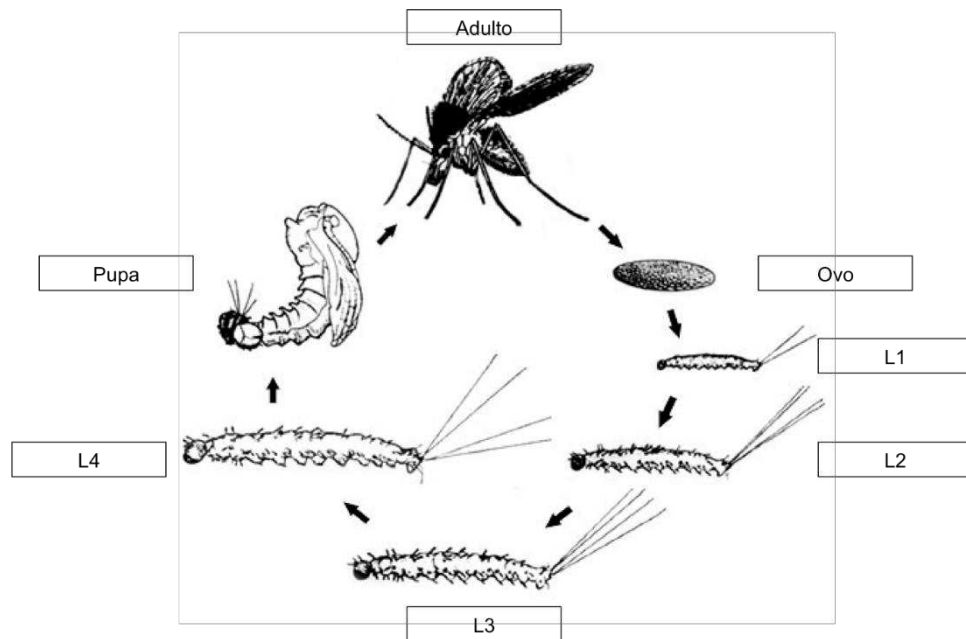


Figura 1 - Desenho esquemático do ciclo biológico de flebotomíneos. Mostrando o estágio inicial de ovo, os quatro estágios larvais de L1 a L4, pupa e adulto. Fonte: http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm.

Os flebotomíneos, em sua maioria, tem o hábito de realizarem a hematofagia durante o crepusculo ou à noite. No processo de telmofagia, o inseto dilacera pequenos vasos presentes na derme do hospedeiro produzindo micro-hemorragias. Durante a hematofagia o inseto libera saliva que apresenta diferentes substâncias, tais como anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios, imunossupressores e vasodilatadores, que além de facilitarem a obtenção de sangue, reduzem o mecanismo de defesa do vertebrado (Ribeiro et al, 1995, Kamhawi, 2000).

1.2 - Interação vetor-parasito

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida digenético, alternando entre o mamífero vertebrado e o flebotomíneo vetor. No vertebrado, a forma amastigota intracelular, reside e se multiplica dentro de fagolisossomas de células do sistema mononuclear fagocitário do vertebrado. No flebotomíneo, a forma

promastigota flagelada, coloniza o trato intestinal do inseto (Sacks e Kamhawi, 2001; Dedet, 2002).

A colonização do intestino de flebotomíneos por *Leishmania spp* pode variar conforme o gênero do parasito, e a distribuição diferencial forma “micro-habitats”, de acordo com as partes colonizadas no intestino médio. Esta observação levou Lainson e Shaw (1987) a classificar os parasitos em três categorias: suprapilária, peripilária e hipopilária. As espécies de *Leishmania* que colonizam e desenvolvem-se na porção do trato digestivo anterior ao piloro, são ditas suprapilárias e pertencem ao subgênero *Leishmania*. Os parasitos com hábitos peripiláricos estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e na porção abdominal do intestino médio, e pertencem ao subgênero *Viannia*, seus representantes são restritos ao Novo Mundo. Parasitos com desenvolvimento do tipo hipopilárico, são restritos ao intestino posterior, e ocorrem em espécies de *Leishmania* que infectam répteis e são do subgênero *Sauroleishmania* (Croan e Ellis, 1997; Momen e Cupolillo, 2000). A maioria das espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos é de comportamento suprapilárico (Rangel e Lainson, 2003).

O estabelecimento de uma infecção por *Leishmania* suprapilárica ocorre no lúmen do intestino médio do flebotomíneo após a ingestão de sangue, contendo formas amastigotas dentro de macrófagos (Handman e Bullen, 2002). Em seguida, se inicia o ciclo de vida do parasito no vetor, que envolve diferentes formas de desenvolvimento (Oliveira et al, 2009). Essas formas representam adaptações às mudanças sofridas pelos parasitos dentro do flebotomíneo, como aumento de pH e diminuição da temperatura (revisado por Bates e Rogers, 2004 e Kamhawi, 2006). O sucesso do desenvolvimento de *Leishmania* em flebotomíneos resulta na geração e transmissão de formas promastigotas metacíclicas aos hospedeiros vertebrados (Saraiva et al, 1995).

As formas amastigotas ingeridas pelo vetor alcançam o intestino médio e diferenciam-se em promastigotas entre seis e 12 horas após o repasto, nesse momento inicia-se a formação de uma matriz peritrófica (MP) que envolve o bolo alimentar. Essa matriz consiste em uma mistura de quitina e proteínas secretadas pelo epitélio do intestino do vetor (revisado por Sacks e Kamhawi, 2001; Secundino et al, 2005). Cerca de 18 a 24 horas depois, inicia-se uma intensa multiplicação das formas promastigotas, que são encontradas formando estruturas chamadas de rosetas com seus flagelos voltados para o centro. Algumas horas depois, os parasitos começam a

replicação e se diferenciam em formas alongadas e móveis chamadas nectomonas (revisado por Sacks e Kamhawi, 2001). Em um segundo estágio do desenvolvimento, entre 60 a 72 horas, um grande número de nectomonas, localizam-se no espaço ectoperitrófico. Nesse estágio ocorre a degradação da MP na parte anterior do intestino pela ação de quitinases secretadas pelo parasito (Shakarian e Dwyer, 2000) e, por quitinases endógenas dos flebotomíneos (Ramalho-Ortigão et al, 2005). As leishmanias nectomonas ancoram-se às microvilosidades do epitélio intestinal e dessa forma, evitam sua expulsão durante a defecação. Essa etapa é a que determina, de fato, o sucesso da infecção (revisado por Bates, 2008).

A competência vetorial de uma espécie de flebotomíneo é determinada pela capacidade da *Leishmania* em sobreviver, se multiplicar e diferenciar no trato digestivo do inseto, de modo que seja transmitida aos vertebrados. A capacidade de se fixar ao epitélio intestinal é uma importante propriedade das formas promastigotas nectomonas, pois a adesão dos parasitos permite a sua permanência no intestino durante o peristaltismo e evita sua expulsão durante a defecação (revisado por Sacks e Kamhawi, 2001). O principal responsável por essa adesão é o glicoconjugado lipofosfoglicano (LPG) (Pimenta et al, 1992; Kamhawi et al, 2004). O LPG é uma molécula ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), cobrindo toda superfície das promastigotas, incluindo flagelo, organizado como um glicocálice densamente filamentosos (Sacks et al, 2000).

O LPG foi primeiramente descrito em 1984 (Handmam et al, 1984). Posteriormente, seu papel na adesão de formas promastigotas ao epitélio do intestino de flebotomíneos, foi melhor caracterizado através da utilização de técnicas de interação *in vitro*. Foi demonstrado a fixação de *L. major* ao epitélio intestinal de *P. papatasi* e sua posterior liberação é dependente do estágio do desenvolvimento do parasito e é controlada pela modificação nas cadeias de açúcar terminais do LPG (Pimenta et al, 1992). Desde então, essa molécula tem sido considerada um importante fator de virulência entre diferentes espécies de *Leishmania* (Turco et al, 2001).

Os flebotomíneos foram classificados de acordo com a susceptibilidade em desenvolver (experimentalmente) uma ou mais espécies de leishmanias: (1) vetores permissivos (ou não-específicos), são aqueles podem suportar o desenvolvimento de diferentes espécies de *Leishmania*, como por exemplo o vetor *L. longipalpis*, que transmite *Leishmania infantum chagasi* e *Leishmania mexicana*; por outro lado, (2)

vetores restritivos (ou específicos), são aqueles que permitem o desenvolvimento somente da espécie de *Leishmania* que eles comumente carregam na natureza, por exemplo *Phlebotomus papatasi*, que transmite *Leishmania major*, e *Phlebotomus sergenti* que transmite *Leishmania tropica* (Pimenta et al, 1994; Kamhawi et al, 2000). O mecanismo utilizado por vetores específicos envolve um receptor no intestino médio do flebotomíneo que se liga à molécula de lipofosfoglicano no parasita (LPG). Após a descoberta de que *Leishmania* interage com o vetor através da cobertura celular contendo LPG (Pimenta et al, 1992), faltava explicar como essas moléculas eram reconhecidas pelo vetor. A fixação do parasito ao intestino médio no vetor é mediada pela interação do LPG com a molécula receptora de LPG do tipo galectina (PpGalec) presente no epitélio intestinal de flebotomíneos, como por exemplo, na fixação de *L. major* no intestino de *P. papatasi*. O gene que codifica para PpGalec ocorre em repetições em tandem e é expresso exclusivamente no intestino médio de *P. papatasi* (Kamhawi et al, 2004).

No caso de vetores não específicos, eles também utilizam uma molécula com atividade semelhante à lectina para permitir a ligação dos parasitos. No entanto, essa relação não depende de LPG, e a interação nesse caso está relacionada com a presença de glicoproteínas com um terminal N-acetil-galactosamina (GalNAc) na superfície da *Leishmania* (Myskova et al, 2007).

A fase final do desenvolvimento resulta na colonização da porção entre o intestino anterior e o intestino médio torácico, a válvula estomodeal. As formas nectomonas diferenciam-se em formas curtas e largas chamadas haptomonas e têm capacidade de se dividir e aderir à cutícula da válvula estomodeal via hemidesmossomos flagelares, enquanto são embebidas em um material gelatinoso, que restringe sua mobilidade, chamado PSG (*promastigote secretory gel*) (Stierhof et al, 1999, Rogers et al, 2002). Essa etapa do desenvolvimento é acompanhada pelo desenvolvimento de promastigotas metacíclicas (infecciosa), que possuem corpo celular pequeno, flagelo longo, não se dividem, são altamente ativas e livres no processo chamado metaciclogênese. As formas metacíclicas movem-se para a porção anterior do tubo digestivo, chegando ao esôfago, faringe e probóscide. Nesse momento, o flebotomíneo está pronto para realizar outro repasto sanguíneo e assim transmitir a forma infecciosa do parasito em um vertebrado (revisado por: Sacks e Kamhawi, 2001; e Bates, 2008).

O PSG é constituído em grande parte por proteofosfoglicanos. Tem sido proposto que o PSG pode aumentar a eficiência da transmissão de *Leishmania* por obstruir o lúmen do intestino anterior e da válvula estomodeal, forçando a regurgitação das promastigotas metacíclicas no momento do repasto (Stierhof et al, 1999; Rogers, 2002; Bates, 2008). A obstrução do lúmen do sistema digestivo causada pelo PSG altera o comportamento do flebotomíneo, aumentando o número de tentativas de picada, e com isso, o tempo de repasto (Rogers et al, 2002; Rogers e Bates, 2007), o que pode favorecer a deposição de mais parasitos, PSG e saliva antes que o flebotomíneo possa realizar o repasto com sucesso (Rogers et al, 2004). O PSG regurgitado com *L. mexicana* por *L. longipalpis*, pode exacerbar a leishmaniose cutânea, por recrutar macrófagos ao local da infecção e aumentar a expressão de arginase, intensificando a síntese de moléculas requeridas para o crescimento do parasito internalizado, resultando em um aumento da sobrevivência e multiplicação do parasito durante o início da infecção (Rogers et al, 2009).

Embora a exata interação que leva à capacidade vetorial em flebotomíneos, ainda necessite ser completamente esclarecida (revisado em Ramalho-Ortigão et al, 2010), essa especificidade, pode ser explicada por diferenças no mecanismo de adesão de leishmanias ao intestino do flebotomíneo, controlado por polimorfismo da molécula de LPG entre as espécies (Pimenta et al, 1994, Myskova et al, 2007). Dessa forma, cada uma das quase 30 espécies de *leishmania* de importância médica (revisado em Kato et al, 2010), é, usualmente, transmitida somente por poucas espécies de flebotomíneos (Killick-Kendrick, 1999; Sacks et al, 2008).

1.3 - O intestino médio dos insetos

A organização do trato digestivo dos insetos, usualmente mostra-se constante, formado por uma monocamada de tecido epitelial apoiada em uma lamina basal, formando um tubo que se estende da boca ao ânus (Chapman, 2013), sustentado na cavidade corporal por uma musculatura composta de músculos longitudinais e circulares (Park et al, 2000). Em geral, o trato digestivo é dividido em três regiões principais, que diferem quanto a sua origem embrionária: intestino anterior (ou estomodeu), de origem ectodérmica, intestino médio (ou mesenterio) de origem mesodérmica e intestino posterior, também de origem ectodérmica (Snodgrass, 1935;

Chapman, 2013). Por serem de origem ectodérmica, as células dos intestinos anterior e posterior secretam cutícula que é contínua àquela encontrada do lado de fora do corpo (Chapman, 2013).

O intestino médio é o principal sítio de digestão e absorção de nutrientes nos insetos. As células epiteliais deste órgão possuem a porção apical voltada para o lúmen e a porção basal é apoiada na lâmina basal (Lehane e Billingsley, 1996). Há três tipos principais de células epiteliais no intestino médio: enterócitos ou células digestivas/absortivas, células endócrinas e células regenerativas (células-tronco), com predominâncias das primeiras. As células digestivas possuem microvilosidades e estão envolvidas com a absorção e secreção de água, produção e secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (Cruz-Landim et al, 1996; Neves et al, 2003; Chapman, 2013).

Outro tipo celular do intestino médio dos insetos são as células endócrinas ou enteroendócrinas, envolvidas na secreção de hormônios que regulam os processos digestivos. Elas são relativamente pequenas e possuem formas variadas como piramidal, oval ou fusiforme (Terra e Ferreira, 1994; Chapman, 2013). As células regenerativas são consideradas células indiferenciadas, distribuídas de forma isolada ou em ninhos por entre a base das células digestivas são capazes de substituir as células digestivas mortas, sendo responsáveis pela manutenção da integridade do epitélio do intestino médio (Billingsley e Lehane, 1996; Neves et al, 2003; Martins et al, 2006; Fernandes et al, 2014).

De modo geral, o epitélio intestinal de fêmeas de flebotomíneos é constituído por uma camada de células digestivas que são colunares, chamadas predominantemente de células principais (Rudin e Hecker, 1982). Estas células estão apoiadas em uma lamina basal e na porção apical apresentam microvilosidades bem desenvolvidas e dispostas paralelamente (Gemetchu, 1974; Rudin e Hecker, 1982; Andrade-Coelho et al, 2001). As células digestivas atuam na absorção de nutrientes e liberação de água para o lúmen intestinal, síntese e secreção de enzimas digestivas (Terra e Ferreira, 1994). Além das células digestivas, dois tipos de células endócrinas existem em *L. longipalpis*, e estão dispersas na monocamada do epitélio do intestino médio posterior. O primeiro tipo consiste em um formato triangular e foi chamado de células “fechadas”, os grânulos secretados por este tipo celular parecem ser enviados para a hemolinfa via membrana celular. O segundo tipo foi chamado de células

“abertas”, as quais parecem se abrir para o lúmen secretando seus produtos através das microvilosidades (Leite e Evangelista, 2001).

O tubo digestivo em flebotomíneos é importante não apenas na fisiologia digestiva do inseto, mas também no aspecto vetorial da transmissão de *Leishmania* e outros patógenos, como bactérias do gênero *Bartonella* e arbovírus. De maneira geral, o intestino médio de flebotomíneos se subdivide em duas regiões distintas: o intestino médio torácico e o médio abdominal. O intestino médio torácico é uma porção estreita, para onde os açúcares ingeridos, que estavam armazenados no divertículo, são pouco a pouco enviados, para então serem digeridos e absorvidos (Tang e Ward, 1998). Na porção inicial do intestino médio torácico, ligando o intestino anterior ao intestino médio do inseto há uma válvula, chamada de válvula estomodeal (Davis, 1967). O intestino médio abdominal consiste de uma porção mais dilatada onde o sangue é armazenado e digerido (Andrade-Coelho et al, 2001) (ver figura 2).

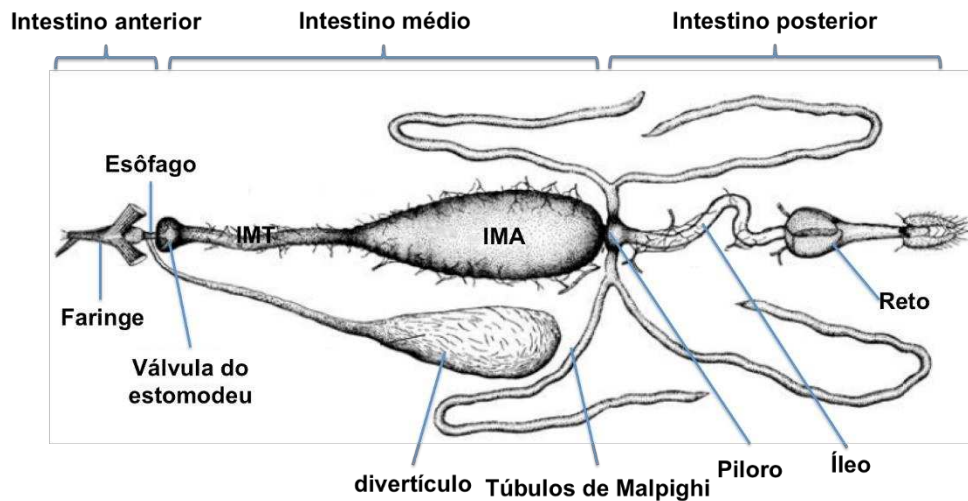


Figura 2 – Desenho esquemático do tubo digestivo dissecado de *P. papatasi*. IMT: Intestino médio torácico. IMA Intestino médio abdominal. Adaptado de Jobling, 1997.

Após a ingestão de sangue, a atividade proteolítica do intestino dos flebotomíneos aumenta, com a síntese e secreção de enzimas digestivas no lúmen do intestino médio, incluindo tripsinas, quimotripsinas, aminopeptidases e alfa-glicosidases (revisado em Sacks e Kamhawi 2001). No processamento enzimático do alimento em insetos hematófagos, as serino-proteases como as tripsinas e quimotripsinas, são as principais proteases envolvidas na digestão, visto que o sangue é constituído principalmente de proteínas (Muller et al, 1993). Tais enzimas agem na fase inicial da digestão, com a quebra de polímeros em oligômeros, reduzindo assim, o peso molecular dos compostos (Terra e Ferreira, 1994).

1.4 - Renovação do epitélio do intestino médio durante o desenvolvimento pós-embriônico de insetos

Em insetos holometábolos, o trato gastrointestinal sofre mudanças drásticas durante a metamorfose, o que inclui o remodelamento do intestino médio. O remodelamento é importante para a adaptação do inseto às mudanças que geralmente ocorrem nos hábitos alimentares, os quais diferem entre larva e adulto (Wigglesworth, 1972). O processo de renovação do intestino médio ocorre pela

histólise de células do epitélio larval seguido da proliferação e diferenciação de células regenerativas (revisado em Hakim et al, 2010).

A troca do epitélio do intestino médio em holometábolos inicia-se na transição larva-pupa e é um evento dependente de hormônio (Lee et al, 2002). As transformações são induzidas por um aumento nos níveis de ecdisona, na ausência do hormônio juvenil, no final do último instar larval (Riddiford, 1993). O hormônio ecdisona é considerado um hormônio chave na indução da morte celular programada para remoção de células digestivas larvais, além da proliferação e diferenciação de células regenerativas durante a metamorfose em insetos (Lee et al, 2002; Nishiura, 2002; Wu et al, 2006).

O processo de remodelamento do intestino médio tem sido estudado em holometábolos, principalmente em *Drosophila melanogaster*, e em algumas espécies de mosquitos (Nishiura e Smouse, 2000; Lee et al, 2002; Nishiura et al, 2002; Wu et al, 2006; Parthasarathy et al, 2007; Ray et al, 2009; Fernandes et al, 2014). Em *A. aegypti* o remodelamento do intestino médio inicia-se no último estágio larval, observado pela morte celular programada de células epiteliais e pelo aumento no número de células regenerativas logo após a última ecdise larval (Nishiura, 2003). O aumento do número de células regenerativas se dá pela ocorrência de divisões celulares no intestino médio de *A. Aegypti* a partir do quarto estágio larval. As divisões celulares ocorreram em regiões específicas durante o desenvolvimento do órgão, iniciando na região anterior em L4 e terminando na região posterior do intestino médio no estágio de pupa e adulto recém emergido (Fernandes et al, 2014).

Dois processos estão envolvidos na degeneração e morte de células epiteliais intestinais durante o remodelamento do intestino médio, em insetos holometábolos. O primeiro processo é a apoptose, um processo que leva a morte pela condensação da cromatina e fragmentação nuclear, e ocorre pela ativação de enzimas caspases (revisado por Hakin et al, 2010). Caspases são o principal componente da maquinaria de morte celular por apoptose e estão envolvidas na eliminação de tecidos durante a transição larva-pupa pela indução de eventos proteolíticos que levam a fragmentação do DNA e conseqüentemente morte da célula (Remillard e Yuan, 2004).

Outro tipo de morte celular é a autofagia, processo no qual ocorre acúmulo de vesículas de dupla membrana que englobam componentes citoplasmáticos (autofagossomos), fusionam-se com lisossomos (autolisossomos) que digerem o conteúdo luminal (revisado em Malagoli et al, 2010). Um conjunto conservado de genes estão diretamente envolvidos no processo, são chamados de genes *Atg* (“autophagy-related”) (Klionsky et al, 2003). Autofagia é um processo normalmente utilizado por células como um mecanismo de reciclagem de componentes, e sobrevivência da célula sob condições de estresse, tais como privação de nutrientes (revisado por Denton et al, 2012). O processo de morte celular envolvendo autofagia tem sido comumente associado com a renovação do intestino médio durante o desenvolvimento em insetos holometábolos (Nishiura e Smouse, 2000; Lee e Baehrecke, 2001; Denton et al, 2009; Fernandes et al, 2014).

Durante a histólise no intestino médio de *D. melanogaster* caspases são ativadas, porém, a inibição da atividade de caspases via *knockdown* do gene efetor de caspases *decay*, não suprimiu a morte celular programada. Entretanto, quando os genes *Atg1* e *Atg18* foram silenciados, ocorreu um atraso significativo no processo de morte e eliminação das células intestinais larvais. Parece existir uma interação entre o mecanismo de morte celular autofágica e apoptótica no intestino médio deste inseto (Denton et al, 2009 e 2010). Por outro lado, durante o remodelamento do intestino médio em *A. aegypti* genes envolvidos no processo de morte celular dependente de caspase (apoptose) foram identificados (Wu et al, 2006; Margan et al, 2006; Parthasarathy e Palli, 2007).

O exato controle molecular que leva as células a sofrer apoptose ou autofagia não é totalmente compreendido no sistema digestivo dos insetos. Em *D. melanogaster* a morte de células do intestino médio e de glândulas salivares envolve componentes da via apoptótica, mesmo quando as células exibem características de morte celular autofágica (Lee et al, 2002). A ocorrência simultânea de autofagia e apoptose tem sido implicada na degeneração de tecidos em insetos durante a metamorfose (revisado por Baehrecke, 2005; Neufeld et al, 2008). Entretanto, permanece como uma questão aberta, como as células que morrem por autofagia também apresentam mecanismos apoptóticos (revisado por Denton et al, 2012).

1.5 - Matriz peritrófica (MP)

1.5.1 - Tipos e papéis da MP

No intestino médio de muitos insetos, incluindo insetos hematófagos, o bolo alimentar é envolvido por uma matriz extracelular e semipermeável, que consiste de fibrilas de quitina embebidas em uma matriz de proteínas/glicoproteínas, chamada de matriz peritrófica (MP). Dois tipos de MPs foram descritos e diferem-se de acordo com o local de síntese: MP1 (tipo 1) e MP2 (tipo 2) (Figura 2) (Peters, 1992). A MP tipo I é produzida pelas células epiteliais do intestino médio do adulto. No caso das espécies hematófagas, seus componentes são secretados em resposta a distensão do epitélio, ocorrida após a ingestão de sangue. Porém, em insetos não hematófagos, ela é geralmente constitutiva (Peters, 1992; Lehane, 1997; Shao et al, 2001). A MP tipo II é continuamente produzida nas larvas dos dípteros, independente da ingestão de alimento, a partir de um pequeno grupo de células altamente especializadas, na junção do intestino anterior com o médio, uma região chamada cardia (ver Figura 3). Estágios diferentes do ciclo de vida da mesma espécie de inseto podem produzir os dois tipos diferentes de MP. Por exemplo, em mosquitos, a MP tipo 2 é encontrada no intestino da larva e MP tipo 1, no adulto após a ingestão de sangue (Peters, 1992).

A MP1 envolve o alimento ingerido, e delimita o espaço ectoperitrófico, entre o epitélio e a MP, e o espaço endoperitrófico, em torno do bolo alimentar, separando o conteúdo luminal em dois compartimentos funcionais. A compartimentalização promovida pela MP1 é fundamental para que ocorra a ação das enzimas digestivas tornando o processamento e absorção do alimento eficientes (Terra e Ferreira, 1994, Toprak et al, 2010). Além disso sua semipermeabilidade e porosidade, permitem o trânsito seletivo de pequenas moléculas, bem como regula o movimento de enzimas secretadas pelas microvilosidades para o lúmen (Lehane, 1997).

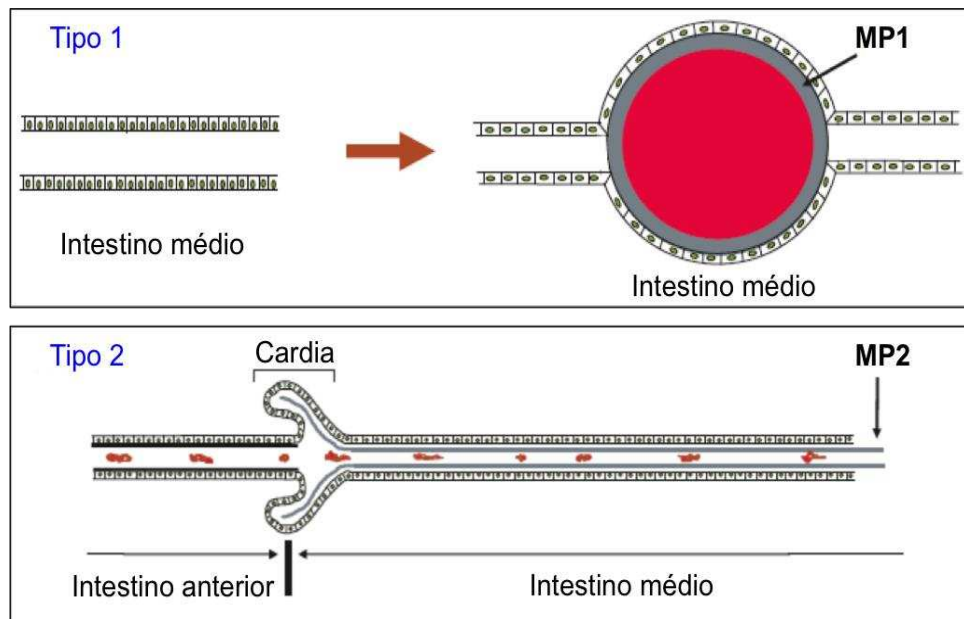


Figura 2- Desenho esquemático mostrando a síntese de MP1 e MP2. Adaptado de Devemport & Jacobs-Lorena (2005).

Além do papel na compartimentalização da digestão, a MP tipo1 atua como barreira protegendo o epitélio intestinal contra patógenos em muitos insetos vetores, contra a abrasão por partículas bolo alimentar, além de controlar a difusão de enzimas digestivas do lúmen para o epitélio (Lehane, 1997; Toprak et al, 2010). Adicionalmente, a MP protege contra agentes nocivos produzidos pela digestão da hemoglobina (Walters et al, 1995). Em *Aedes aegypti*, foi mostrado que a MP e/ou proteínas associadas a MP, são capazes de se ligar ao heme, atuando na desintoxicação desse composto (Pascoa et al, 2002). Em *A. aegypti*, a proteína associada a MP, AeIMUC1, é capaz de se ligar ao heme (Devenport et al, 2006), enquanto em *P. papatasi*, as peritrofinas PpPer1 e PpPer2 provavelmente também são capazes de atuar na desintoxicação de heme (Coutinho-Abreu et al, 2013).

O papel da MP tipo 1 em insetos hematófagos, é de especial interesse, uma vez que a MP limita a passagem de parasitos para o espaço ectoperitrofico. Em mosquitos do gênero *Anopheles*, a MP previne o escape e o desenvolvimento de *Plasmodium* (Billingsley e Rudin, 1992; Shahabuddin et al, 1993). De modo semelhante, em flebotomíneos a MP também é considerada um importante componente da competência vetorial, por funcionar como uma barreira, dificultando o estabelecimento da *leishmania* no intestino médio. Parasitos que não ultrapassam a MP, não conseguem se fixar no epitélio intestinal e são eliminados com

remanescentes do bolo fecal (Pimenta et al, 1997, Sacks e Kamhawi 2001; Coutinho-Abreu et al, 2010).

1.5.2 - Estrutura e composição da MP

Quitina

A MP consiste de uma rede de quitina em uma matriz composta de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos. A quitina é um polímero linear de N-acetilglicosamina (GlcNAc), ligados através de ligações β - (1 - 4) perfazendo de três a 13% da massa total da MP, proporcionando resistência e servindo como um arcabouço para a deposição dos componentes proteicos da MP. Quitina tipicamente apresenta-se na forma de microfibrilas que podem variar em diâmetro e comprimento (revisado por Merzendorfer, 2006).

As cadeias de quitina associam-se em três diferentes conformações: como cadeias arranjadas em orientação antiparalela (α -quitina) cadeias paralelas (β -quitina), ou por alguma combinação das duas formas (γ -quitina). O arranjo antiparalelo das cadeias em α -quitina, são mais estáveis termodinamicamente, em razão de um maior número de pontes de hidrogênio entre os polímeros. Este arranjo das microfibrilas em α -quitina é mais prevalente em MPs, embora γ -quitina também seja encontrado (Peters, 1992; Lehane, 1997).

A síntese de quitina da MP ocorre via células epiteliais intestinais, e inicia-se com a produção de glicose a partir de trealose pela enzima trealase. No último passo da via biossintética, a enzima quitina-sintase cataliza a formação de quitina pela transferência de N-acetilglicosamina da uridina difosfato N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), promovendo o crescimento da cadeia de quitina. Quitina-sintases são proteínas integrais de membrana, presentes na membrana plasmática das células epiteliais intestinais e em membranas de vesículas trans-Golgi especializadas, chamadas quitosomos (Bracker et al, 1974). Acredita-se que o início da síntese da MP tipo1, ocorra utilizando a superfície das microvilosidades como molde para a deposição de sucessivas lamelas concêntricas ao longo do intestino (Peters, 1992; Hegedus, 2009). O processo de montagem da MP 1, não está bem esclarecido, embora admita-se que ocorra em sucessivos passos. O primeiro, iniciando com a secreção de fibrilas de quitina pelas microvilosidades das células epiteliais intestinais, seguido pela maturação e formação de uma rede por ligações cruzadas

entre peritrofinas e finalmente pela associação de proteínas e proteoglicanos interligando as fibrilas de quitina (Merzendorfer e Zimoch, 2003).

Em flebotomíneos a síntese dos componentes da MP inicia-se com cerca de um dia após a alimentação sanguínea em *L. longipalpis* (Secundino et al, 2005), *P. argentipes* e *P. orientalis* (Pruzinova et al, 2015). Entretanto, em *P. papatasi* essa formação inicia com cerca de quatro horas após a alimentação sanguínea (Blackburn et al, 1988; Pruzinova et al, 2015).

Peritrofinas

Proteínas compreendem de 21 a 55% da massa total da MP em insetos. As proteínas da MP foram inicialmente classificadas de acordo com a facilidade com que elas podem ser removidas da MP, em quatro classes: (1) classe I, aquelas fracamente associadas a MP, que podem ser removidas com tampões fisiológicos; (2) classe II, incluem aquelas extraídas com detergentes suaves; (3) classe III, removidas apenas com o uso de desnaturantes fortes; e (4) classe IV, as proteínas que não podem ser removidas e permanecem na estrutura da MP após os tratamentos para extração de proteínas. O termo peritrofina foi primeiramente descrito para as proteínas da MP as quais podem ser removidas apenas pela ação de detergentes fortes, classe III (revisado em Tellam et al, 1999).

Peritrofinas são proteínas que exibem ao menos um domínio de ligação à quitina e possuem também um ou mais domínios de ligação à mucina (revisado em Tellam et al, 1999; Toprak et al, 2010). Uma característica comum de peritrofinas com domínios de ligação à quitina é a ocorrência de resíduos conservados ricos em cisteína, que presumivelmente são responsáveis pela ligação à quitina, além de mediar a interação de glicoproteínas com a MP. Desta forma, as peritrofinas estão comumente, envolvidas na determinação da porosidade, força e elasticidade da MP, auxiliando na sua formação e manutenção da sua estrutura (Shao et al, 2005; Toprak et al, 2010). Proteínas da MP com domínio de ligação à mucina são ricas em aminoácidos serina, treonina, prolina e alanina, em alguns casos esses três últimos aminoácidos representam 51.5% do total de aminácidos da proteína (Wang e Granados, 1997). Estas proteínas são altamente glicosiladas, o que auxilia na consistência gelatinosa da MP, sendo importante para seu papel de proteger o epitélio da abrasão por partículas de alimento, além de conferir resistência às enzimas hidrolíticas (Wang e Granados, 1997; Toprak et al, 2010).

A expressão de diferentes peritrofinas já foi verificada no intestino médio de insetos (Shen e Jacobs-Lorena 1998; Shao et al, 2005). Em *P. papatasi* a expressão de três peritrofinas, *PpPer1*, *PpPer2* e *PpPer3*, foi constatada no intestino médio das fêmeas dos insetos após o repasto sanguíneo. Duas delas, *PpPer1* e *PpPer2*, estão envolvidas na cinética e formação da MP e *PpPer3* pode estar envolvida na proteção do epitélio intestinal (Ramalho-Ortigão et al, 2007).

1.5.3 - Degradação da MP

A degradação da MP ocorre pela ação das quitinases e β -N-acetilglucosaminidases, que atuam despolimerizando as fibrilas de quitina. Essas enzimas catalizam a hidrólise das ligações glicosídicas β -(1-4) na molécula. As quitinases clivam a estrutura do polissacarídeo quitina para produzir oligossacarídeos menores, que são então convertidos em monômeros pela ação das β -N-acetilglucosaminidases (Merzendorfer e Zimoch, 2003). As quitinases e β -N-acetil-D-glucosamidases pertencem à família 18 e 20 das glicosilhidrolases, respectivamente. Quitinases de insetos possuem massa molecular de 40 a 90 kDa, e podem apresentar multidomínios, sendo um domínio catalítico, um domínio rico em serina/treonina que pode estar altamente glicosilado e um último domínio rico em cisteína (Arakane e Muthukrishnan, 2010).

Genes de quitinases tem sido caracterizados em muitos insetos, incluindo espécies de lepidoptera, tais como *Manduca sexta* (Kramer et al, 1993), *Bombyx mori* (Kim et al, 1998), *Spodoptera frugiperda* (Bolognesi et al, 2005), bem como em algumas espécies de dípteras: *Aedes aegypti* (De la Vega et al, 1998), *Anopheles gambiae* (Shen e Jacobs-Lorena, 1998), *Glossina morsitans* (Yan et al, 2002), *Lutzomyia longipalpis* (*LlChit1*) (Ramalho-Ortigão e Traub-Cseko 2003) e em *P. papatasi* (*PpChit1*), onde está envolvida na formação e degradação da MP (Ramalho-Ortigão et al, 2005; Sádlova et al, 2009).

O equilíbrio entre a síntese e a degradação de quitina da MP I é um dos principais fatores que controlam sua espessura em dípteras (revisado em Shao et al, 2001). A principal enzima que atua na quebra da MP são as quitinases. A atividade quitinolítica no intestino de flebotomíneos é induzida após a ingestão de sangue e o pico de produção é em torno de 48 h após a alimentação. A ação de quitinases sobre

a MP I influencia a infecção por *leishmania*, uma vez que quitinases em flebotomíneos podem induzir a quebra da MP (Ramalho-Ortigão et al, 2005). O envolvimento das quitinases nas mudanças físicas da MP em *P. papatasi* foi mostrado por Pimenta et al, (1997). A MP não se formou no intestino médio do inseto alimentado com sangue contendo uma quitinase exógena. Por outro lado, flebotomíneos alimentados com sangue contendo o inibidor de quitinase, alosamidina, a MP foi formada, porém, de forma desorganizada.

A adição de uma quitinase exógena foi capaz de diminuir a produção de ovos em *L. longipalpis*. Os insetos alimentados com sangue contendo quitinases tiveram a produção de ovos acelerada quando comparados ao controle. Entretanto, o número de fêmeas que morreram sem realizar postura foi maior, além disso, o número de ovos postos foi menor, no grupo alimentado com quitinase. A ausência de MP acelerou a aquisição de nutrientes, o que levou a uma precoce produção de ovos e oviposição. Finalmente, a redução na fecundidade na ausência de MP pode estar relacionada à conversão de nutrientes ineficiente ou a perda da função protetora da MP (Araújo et al, 2012). Em *P. papatasi* a alimentação com soro anti-PpChit1 levou a um atraso de um dia na oviposição, além de estender em três dias a sobrevivência das fêmeas. Os autores especulam que esses resultados estão ligados à mudanças na permeabilidade da MP, retardando a absorção de nutrientes utilizados para o desenvolvimento de ovos, bem como uma proteção aos efeitos deletérios do heme durante da digestão sanguínea (Robles-Murguía et al, 2014).

A ação da enzima PpChit1 em *L. major* foi verificada pela inibição da expressão da mesma via RNAi em *P. papatasi*. Os dsRNA de PpChit1 silenciaram a expressão dessa proteína, o que levou a uma significativa redução ou a eliminação dos parasitos no intestino médio após uma alimentação sanguínea, sugerindo que a redução da expressão de PpChit1 altera a conformação da MP, o que é capaz de interferir na transmissão da *leishmania* em *P. papatasi* (Coutinho-Abreu et al, 2010).

2- Referências bibliográficas

- Aguiar, G. M. D., & Medeiros, W. M. D. (2003). Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: *Flebotomíneos no Brasil*. Rio de Janeiro. FIOCRUZ. (pp. 207-255).
- Andrade-Coêlho, C. A., Santos-Mallet, J., Souza, N. A., Lins, U., Meirelles, M. N. L., & Rangel, E. F. (2001). Ultrastructural features of the midgut epithelium of females *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (8), 1141-1151.
- Arakane, Y., & Muthukrishnan, S. (2010). Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67 (2), 201-216.
- Araújo, A. P. O. D., Telleria, E. L., Dutra, J. D. M. F., Júlio, R. M., & Traub-Csekö, Y. M. (2012). Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in *Lutzomyia longipalpis* females. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107 (4), 543-545.
- Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (6), 505-510.
- Bates, P. A. (2008). *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 11 (4), 340-344.
- Bates, P. A., & Rogers, M. E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, 4 (6), 601-609.
- Billingsley, P. F., & Lehane, M. J. (1996). Structure and ultrastructure of the insect midgut. Springer Netherlands. (pp. 3-30).
- Billingsley, P. F., & Rudin, W. (1992). The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *The Journal of Parasitology*, 430-440.
- 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., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Terra, W. R., & Ferreira, C. (2005). Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (11), 1249-1259.
- Bracker, C. E., Ruiz-Herrera, J., & Bartnicki-Garcia, S. (1976). Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril

synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73 (12), 4570-4574.

Brazil, R. P., & Brazil, B. G. (2003). Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: *Flebotomíneos no Brasil*. Rio de Janeiro. FIOCRUZ. (pp. 257-274).

Chapman, R. F. (2013). Alimentary canal, digestion and absorption. In: *The insects structure and function*. (pp. 46-78).

Coutinho-Abreu, I. V., Sharma, N. K., Robles-Murguía, M., & Ramalho-Ortigão, M. (2010). Targeting the midgut secreted PpChit1 reduces *Leishmania major* development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 4 (11), e901.

Coutinho-Abreu, I. V., Sharma, N. K., Robles-Murguía, M., & Ramalho-Ortigão, M. (2013). Characterization of *Phlebotomus papatasi* peritrophins, and the role of PpPer1 in *Leishmania major* survival in its natural vector. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 7 (3), e2132.

Croan, D., & Ellis, J. (1997). Monophyletic origin of the genus *Sauroleishmania*. *Archiv Für Protistenkunde*, 148 (3), 269-275.

Cruz-Landim, C., Silva-De-Moraes, R. L. M., & Serrão, J. E. (1996). Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Comparative Biology*, 1 (1/2), 29-40.

De la Vega, H., Specht, C. A., Liu, Y., & Robbins, P. W. (1998). Chitinases are a multi-gene family in *Aedes*, *Anopheles* and *Drosophila*. *Insect Molecular Biology*, 7 (3), 233-239.

Dedet, J. P. (2002). Current status of epidemiology of leishmaniasis. In: *Leishmania*. Springer US. (pp.1-10).

Denton, D., Nicolson, S., & Kumar, S. (2012). Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation*, 19 (1), 87-95.

Denton, D., Shrivage, B. V., Simin, R., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. (2010). Larval midgut destruction in *Drosophila*: not dependent on caspases but suppressed by the loss of autophagy. *Autophagy*, 6 (1), 163-165.

Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. (2009). Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, 19 (20), 1741-1746.

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27 (5), 305-318.

- Devenport, M., Alvarenga, P. H., Shao, L., Fujioka, H., Bianconi, M. L., Oliveira, P. L., & Jacobs-Lorena, M. (2006). Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCI as a heme-binding protein. *Biochemistry*, *45* (31), 9540-9549.
- Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. (2014). *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, *63* (3), 506-512.
- Forattini, O. P., Pattoli, D. B., Serra, O. P., da Rocha, E. O., & Rabello, E. X. (1973). Nota sobre leishmaniose tegumentar no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, *7* (4), 447-452.
- Gemetchu, T. (1974). The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *68* (1), 111-28.
- Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, *55*, 593-608.
- Handman, E., & Bullen, D. V. (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, *18* (8), 332-334.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology*, *54*, 285-302.
- Jacobson, R. L., & Schlein, Y. (2001). *Phlebotomus papatasi* and *Leishmania major* parasites express α -amylase and α -glucosidase. *Acta Tropica*, *78* (1), 41-49.
- Kamhawi, S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and Infection*, *2* (14), 1765-1773.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. *Trends in Parasitology*, *22* (9), 439-445.
- Kamhawi, S., Modi, G. B., Pimenta, P. F. P., Rowton, E., & Sacks, D. L. (2000). The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*, *121* (01), 25-33.
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Barillas-Mury, C., Sacks, D. L., & Valenzuela, J. G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, *119* (3), 329-341.

- Kato, H., Gomez, E. A., Cáceres, A. G., Uezato, H., Mimori, T., & Hashiguchi, Y. (2010). Molecular epidemiology for vector research on Leishmaniasis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7 (3), 814-826.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17 (3), 279-289.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the Leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4 (1), 1-24.
- Kim, M. G., Shin, S. W., Bae, K. S., Kim, S. C., & Park, H. Y. (1998). Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28 (3), 163-171.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subraman, S., Thumm, M., Veenhuis, M., & Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, 5 (4), 539-545.
- Kramer, K. J., Corpuz, L., Choi, H. K., & Muthukrishnan, S. (1993). Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23 (6), 691-701.
- Lainson, R., Shaw, J. J., Peters, W., & Killick-Kendrick, R. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. Academic Press (pp. 1-120).
- Lee, C. Y., & Baehrecke, E. H. (2001). Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development*, 128 (8), 1443-1455.
- Lee, C. Y., Cooksey, B. A., & Baehrecke, E. H. (2002). Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. *Developmental Biology*, 250 (1), 101-111.
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42 (1), 525-550.
- Leite, A. C. R., & Evangelista, L. G. (2001). Ultrastructure of endocrine cells from the abdominal midgut epithelium of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 38 (5), 749-752.
- Macedo-Silva, V. P., Martins, D. R., De Queiroz, P. V. S., Pinheiro, M. P. G., Freire, C. C., Queiroz, J. W., Dupnik, K. M., Pearson, R. D., Wilson, M. E., Jeronimo, S. M. B., & Ximenes, F. M. (2014). Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Journal of Medical Entomology*, 51 (1), 237-244.

- Malagoli, D., Abdalla, F. C., Cao, Y., Feng, Q., Fujisaki, K., Gregorc, A., Matsuo, T., Nezis, I. P., Papassideri, I. S., Sass, M., Silva-Zacarin, E. C.M., Tettamanti, G., & Umemiya-Shirafuji, R. (2010). Autophagy and its physiological relevance in arthropods: current knowledge and perspectives. *Autophagy*, 6 (5), 575-588.
- Margam, V. M., Gelman, D. B., & Palli, S. R. (2006). Ecdysteroid titers and developmental expression of ecdysteroid-regulated genes during metamorphosis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Physiology*, 52 (6), 558-568.
- Martins, G. F., Neves, C. A., Campos, L. A. O., & Serrão, J. E. (2006). The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron*, 37 (2), 161-168.
- Merzendorfer, H. (2006). Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology*, 176 (1), 1-15.
- Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206 (24), 4393-4412.
- Momen, H., & Cupolillo, E. (2000). Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (4), 583-588.
- Moskalyk, L. A., Oo, M. M., & Jacobs-Lorena, M. (1996). Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 5 (4), 261-268.
- Müller, H. M., Crampton, J. M., Della Torre, A., Sinden, R., & Crisanti, A. (1993). Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. *The EMBO Journal*, 12 (7), 2891.
- Munstermann, L.E. 2004. Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. In: Marquardt WC, editor. *Biology of Disease Vectors*. 2 ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press. (pp. 141-151).
- Myskova, J., Svobodova, M., Beverley, S. M., & Volf, P. (2007). A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection*, 9 (3), 317-324.
- Neufeld, T. P., & Baehrecke, E. H. (2008). Eating on the fly: function and regulation of autophagy during cell growth, survival and death in *Drosophila*. *Autophagy*, 4 (5), 557-562.

- Neves, C. A., Gitirana, L. B., & Serrao, J. E. (2003). Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Brazilian Journal of Biology*, 63 (4), 683-690.
- Nishiura, J. T. (2002). Coordinated morphological changes in midgut, imaginal discs, and respiratory trumpets during metamorphosis of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95 (4), 498-504.
- Nishiura, J. T., & Smouse, D. (2000). Nuclear and cytoplasmic changes in the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) alimentary canal during metamorphosis and their relationship to programmed cell death. *Annals of the Entomological Society of America*, 93 (2), 282-290.
- Nishiura, J. T., Ho, P., & Ray, K. (2003). Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *Journal of medical entomology*, 40 (4), 498-507.
- Nishiura, J. T., Ray, K., & Murray, J. (2005). Expression of nuclear receptor-transcription factor genes during *Aedes aegypti* midgut metamorphosis and the effect of methoprene on expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (6), 561-573.
- Oliveira, F., Jochim, R. C., Valenzuela, J. G., & Kamhawi, S. (2009). Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. *Parasitology International*, 58 (1), 1-5.
- Park, S. S., & Shahabuddin, M. (2000). Structural organization of posterior midgut muscles in mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Journal of Structural Biology*, 129 (1), 30-37.
- Parthasarathy, R., & Palli, S. R. (2007). Stage-and cell-specific expression of ecdysone receptors and ecdysone-induced transcription factors during midgut remodeling in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 53 (3), 216-229.
- Pascoa, V., Oliveira, P. L., Dansa-Petretski, M., Silva, J. R., Alvarenga, P. H., Jacobs-Lorena, M., & Lemos, F. J. (2002). *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32 (5), 517-523.
- Peters, W. (1992). Peritrophic membranes. Springer Science & Business Media. (Vol. 30).
- Pimenta, P. F., Modi, G.B., Pereira, S.T., Shahabuddin, M., & Sacks, D.L. 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. 115 (04), 359-369.

- Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., Rowton, E., Modi, G. B., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91* (19), 9155-9159.
- Pimenta, P. F., Turco, S. J., McConville, M. J., Lawyer, P. G., Perkins, P. V., & Sacks, D. L. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, *256* (5065), 1812-1815.
- Pruzinova, K., Sadlova, J., Seblova, V., Homola, M., Votypka, J., & Volf, P. (2015). Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. *PloS One*, *10* (6), e0128203.
- Ramalho-Ortigao, J. M., & Traub-Csekö, Y. M. (2003). Molecular characterization of LlcHit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *33* (3), 279-287.
- Ramalho-Ortigão, M., Jochim, R. C., Anderson, J. M., 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), 1-17.
- Ramalho-Ortigao, M., Saraiva, E. M., & Traub-Csekö, Y. M. (2010). Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *The open parasitology journal*, *1* (4), 195-204.
- Ramalho-Ortigão, J. M., Kamhawi, S., Joshi, M. B., Reynoso, D., Lawyer, P. G., Dwyer, D. M., D. L. Sacks., & Valenzuela, J. G. (2005). Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Molecular Biology*, *14* (6), 703-712.
- Rangel, E. F., & Lainson, R. (2003). Flebotomíneos no Brasil. Rio de Janeiro. FIOCRUZ.
- Rangel, E. F., Souza, N. A., Wermelinger, E. D., Barbosa, A. F., & Andrade, C. A. (1986). Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Phychodidae), em condições experimentais. In. Aspectos da alimentação de larvas e adultos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *81* (4), 431-438.
- Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y., & Nishiura, J. T. (2009). Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *Journal of Insect Science*, *9* (55), 1-13.

- Remillard, C. V., & Yuan, J. X. J. (2004). Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286 (1), 49-67.
- Ribeiro, J. M. C. (1995). Insect saliva: function, biochemistry, and physiology. In: *Regulatory mechanisms in insect feeding*. Springer US. (pp. 74-97).
- Riddiford, L. M., & Truman, J. W. (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *American Zoologist*, 33 (3), 340-347.
- Robles-Murguía, M., Bloedow, N., Murray, L., & Ramalho-Ortigão, M. (2014). Effect of mouse antisera targeting the *Phlebotomus papatasi* midgut chitinase PpChit1 on sandfly physiology and fitness. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109 (8), 1064-1069.
- Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2007). *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens*, 3 (6), e91.
- Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124 (05), 495-507.
- Rogers, M. E., Hajmová, M., Joshi, M. B., Sadlova, J., Dwyer, D. M., Volf, P., & Bates, P. A. (2008). *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular Microbiology*, 10 (6), 1363-1372.
- Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A., & Bates, P. A. (2004). Transmission of cutaneous Leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 430 (6998), 463-467.
- Rudin, W., & Hecker, H. (1982). Functional morphology of the midgut of a sandfly as compared to other hematophagous nematocera. *Tissue and Cell*, 14 (4), 751-758.
- Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J., & Beverley, S. M. (2000). The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (1), 406-411.
- Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Reviews in Microbiology*, 55 (1), 453-483.
- Sacks, D., Lawyer, P., & Kamhawi, S. (2008). The biology of *Leishmania*-sand fly interactions. *Leishmania: after the genome*, 205-238.
- Sádlová, J., & Volf, P. (2009). Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell and Tissue Research*, 337 (2), 313-325.

Saraiva, E. M. B., Pimenta, P. F. P., Brodin, T. N., Rowton, E., Modi, G. B., & Sacks, D. L. (1995). Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, *111* (03), 275-287.

Secundino, N. F. C., Eger-Mangrich, I., Braga, E. M., Santoro, M. M., & Pimenta, P. F. P. (2005). *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *Journal of Medical Entomology*, *42* (6), 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90* (9), 4266-4270.

Shakarian, A. M., & Dwyer, D. M. (2000). Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by *Leishmania major* promastigotes. *Experimental Parasitology*, *95* (2), 79-84.

Shao, L., Devenport, M., & Jacobs-Lorena, M. (2001). The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *47* (2), 119-125.

Shao, L., Devenport, M., Fujioka, H., Ghosh, A., & Jacobs-Lorena, M. (2005). Identification and characterization of a novel peritrophic matrix protein, Ae-Aper50, and the microvillar membrane protein, AEG12, from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *35* (9), 947-959.

Shaw, J., Rosa, A. T. D., Souza, A., & Cruz, A. C. (2003). Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro. FIOCRUZ. (pp. 337-351).

Shen, Z., & Jacobs-Lorena, M. (1998). A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin cloning, expression, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, *273* (28), 17665-17670.

Sherlock, Í. A., & Lainson, R. (2003). A importância dos flebotomíneos. In: *Flebotomíneos no Brasil*. Rio de Janeiro. FIOCRUZ. (pp. 15-23).

Snodgrass, R. E. (1935). *Principles of insect morphology*. Mcgraw-Hill book company, New York and London.

Soares, R. P., & Turco, S. J. (2003). *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *75* (3), 301-330.

Stierhof, Y. D., Bates, P. A., Jacobson, R. L., Rogers, M. E., Schlein, Y., Handman, E., & Ilg, T. (1999). Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European Journal of Cell Biology*, 78 (10), 675-689.

Tang, Y., & Ward, R. D. (1998). Sugar feeding and fluid destination control in the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology*, 12 (1), 13-19.

Tellam, R.L., Wijffels, G., & Willadsen, P. 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29 (2), 87-101.

Terra, W.R., & Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 109 (1), 1-62.

Toprak, U., Erlandson, M., & Hegedus, D. 2010. Peritrophic matrix proteins. *Trends in Entomology*, (6), 23-51.

Turco, S. J., Späth, G. F., & Beverley, S. M. (2001). Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends in Parasitology*, 17 (5), 223-226.

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*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46 (2), 211-228.

Wang, P., & Granados, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (13), 6977-6982.

Wigglesworth, V. B. (1972). Digestion and nutrition. Springer Netherlands. (pp. 476-552).

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>

Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H., & Palli, S. R. (2006). Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mechanisms of Development*, 123 (7), 530-547.

Yan, J., Cheng, Q., Narashimhan, S., Li, C. B., & Aksoy, S. (2002). Cloning and functional expression of a fat body-specific chitinase cDNA from the tsetse fly,

Glossina morsitans morsitans. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32 (9), 979-989.

Young, D. G., & Duran, M. A. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*. 54.

3 - Objetivos

- Estudar a morfologia da MP após a alimentação de fêmeas de *P. papatasi* com anti-soro específico contra a quitinase PpChit1 e peritrofina PpPer2.
- Analisar a expressão de transcritos para PpChit1 em fêmeas alimentadas de *P. papatasi* (24, 48, 72 e 96 h após a alimentação) após a microinjeção de dsPpChit1.
- Estudar o processo de remodelamento do intestino médio de *L. longipalpis* e *P. papatasi* durante a metamorfose.
- Investigar a ocorrência de mitose, apoptose e autofagia durante a metamorfose do intestino médio nas duas espécies por imunofluorescência com diferentes anticorpos.

CAPÍTULO 1

Artigo publicado na revista Acta Tropica

**EFFECTS OF SPECIFIC ANTISERA TARGETING PERITROPHIC
MATRIX-ASSOCIATED PROTEINS IN THE SAND FLY VECTOR
Phlebotomus papatasi.**



Effects of specific antisera targeting peritrophic matrix-associated proteins in the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*



Juliana Malta^a, Gustavo Ferreira Martins^a, Ju-Lin Weng^b, Kenner Moraes Fernandes^a, Maximiliano Luis Munford^c, Marcelo Ramalho-Ortigão^{b,c,*}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (DFG/UFV), Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais CEP 36570-000, Brazil

^b Department of Entomology, Kansas State University (KSU), Manhattan, KS 66506, USA

^c Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa (DFG/UFV), Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais CEP 36570-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2016

Received in revised form 8 March 2016

Accepted 20 March 2016

Available online 22 March 2016

Keywords:

Chitinase

Peritrophins

Peritrophic matrix

Sand flies

PM-associated proteins

ABSTRACT

In many hematophagous insects, the peritrophic matrix (PM) is formed soon after a blood meal (PBM) to compartmentalize the food bolus. The PM is an important component of vector competence, functioning as a barrier to the development of many pathogens including parasites of the genus *Leishmania* transmitted by sand flies. PM morphology and permeability are associated with the proteins that are part of the PM scaffolding, including several peritrophins, and chitin fibers. Here, we assessed the effects of specific antisera targeting proteins thought to be an integral part of the PM scaffolding and its process of maturation and degradation. *Phlebotomus papatasi* sand flies were fed with red blood cells reconstituted with antisera targeting the chitinase PpChit1, and the peritrophin PpPer2. Sand fly midguts were dissected at different time points and processed for light microscopy (LM), confocal and transmission electron (TEM) microscopies (24, 42–45, 48 and 72 h PBM), scanning electron (SEM) (48 h PBM) and atomic force (AFM) (30 h PBM) microscopies. TEM and WGA-FITC staining indicate PM degradation was significantly delayed following feeding of flies on anti-PpChit1. AFM analysis at 30 h PBM point to an increase in roughness/amplitude of the PM of flies that fed on either anti-PpChit1 or anti-PpPer2. Collectively, our data suggest that antibodies targeting PM-associated proteins affects the kinetics of PM maturation, delaying its degradation and disruption and are potential targets on transmission-blocking vaccines strategies.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The peritrophic matrix (PM) is a non-cellular semi-permeable layer composed of chitin fibrils associated with glycoproteins and secreted in the midgut of most of insects. It forms an envelope surrounding food bolus in the midgut lumen separating luminal contents into two functional compartments, the endo and the ectoperitrophic spaces (Lehane and Billingsley, 1996). The PM is characterized as either type 1 when it is secreted by digestive cells in response to the epithelium distension that occurs following a blood meal or type 2 when secreted continuously by specialized cells present in the cardia (Peters, 1992; Lehane, 1997; Shao et al., 2001; Devenport and Jacobs-Lorena, 2005). The PM plays a key role associated with the efficiency of digestion and absorption of

nutrients, as its permeability and porosity allow for a selective movement of molecules, such as digestive enzymes, from the gut lumen into endoperitrophic space (Lehane and Billingsley, 1996; Hegedus et al., 2009). The PM also functions as a limiting barrier to microorganisms, including many pathogens, and protects the microvilli from abrasion during digestion (Teillac et al., 1999; Lehane, 1997).

Phlebotomine sand flies are vectors of leishmaniasis, a multi-spectrum disease ranging from mild cutaneous to an often-fatal visceral form caused by parasites of the genus *Leishmania*. Such parasites display a complex developmental cycle within the sand fly vector that is limited to the midgut of the insect. Infection of the sand fly occurs when the parasites present primarily in macrophages and other cells of the mononuclear phagocyte system are picked up during a blood meal on an infected vertebrate. However, for subsequent transmission certain steps and criteria typically associated with the *Leishmania* ability to multiply and undergo metacyclogenesis in the vector must be met. Among such steps are the capacity of parasites to survive a proteolytic attack in the gut, escape from the endoperitrophic space presumably by

* Corresponding author.

E-mail address: mortigao@gmail.com (M. Ramalho-Ortigão).

[†] Special Visiting Faculty, Science without Borders—CAPES, Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa (DFG/UFV).

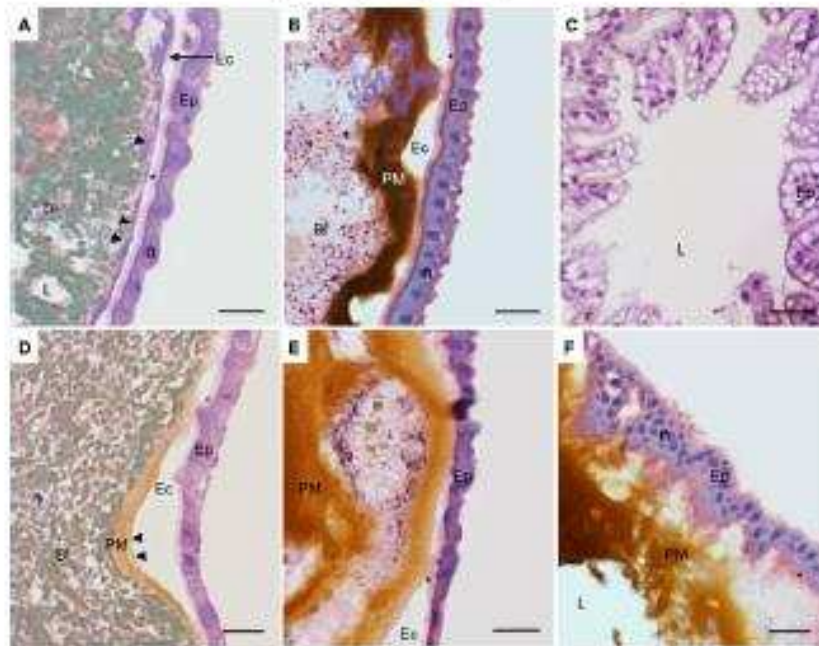


Fig. 1. Histological sections of midgut of *P. papatasi* (PPS), stained with hematoxylin and eosin (HE), insects fed with RBC reconstituted with native sera (control) (A–C) or fed with RBC reconstituted with anti-PpChit1 (D–F). The midguts were dissected 24 h (A and D), 48 h (B and E) and 72 h (C and F) PPM, respectively. Midgut epithelium (Ep) with digestive cell nuclei (n) and brush border (b) is shown. The blood bolus (B) containing the blood cells is seen at 24 h and 48 h PPM. The peritrophic matrix (PM), and black arrows) is thin and thick 24 h and 48 h PPM, respectively. Note that the PM is still thick in the treatments with anti-PpChit1 72 h PPM. Ectoperitrophic space (Ec). Lumen (L). Bar = 30 μ m.

crossing the PM, and bind to the midgut epithelium, preventing excretion (Bates and Rogers, 2004; Ramalho-Ortigão, 2010). Hence, in sand flies, the PM is an important component of the vector competence, (Sacks and Kamhawi, 2001; Coutinho-Abreu et al., 2010).

It has been shown that in sand flies, the speed in which the PM components are secreted (Secundino et al., 2005; Pracinova et al., 2015) and the PM kinetics (Sádlová and Volf, 2009; Pracinova et al., 2015) can vary according to species. However, it is generally accepted that a balance between synthesis and degradation, presumably through the actions of chitin synthases and chitinases, determines PM thickness (Shao et al., 2001). It has also been shown that a thicker PM, produced by the addition of chitinase inhibitors to the blood meal, can trap of *Leishmania* within the endoperitrophic space (Pimenta et al., 1997).

We previously characterized the midgut chitinases IChit1 and PpChit1 from the sand flies *L. longipalpis* (Ramalho-Ortigão and Traub-Czeko, 2003) and *P. papatasi*, respectively, and showed that PpChit1 is involved in the formation and degradation of the PM (Ramalho-Ortigão et al., 2005; Coutinho-Abreu et al., 2010). Further, out of three peritrophins we also identified in *P. papatasi*, two were shown to be involved in the formation and the scaffolding of the PM in sand flies (Ramalho-Ortigão et al., 2007; Coutinho-Abreu et al., 2013). Peritrophins bind to chitin via their cysteine-rich chitin binding domains (CBD), and have a crucial role determining the elasticity and permeability of the PM (Lehane, 1997; Shan et al., 2005).

Here, we investigated aspects of PM structure and kinetics in the sand fly *P. papatasi* following feeding on blood (RBCs) containing

antisera targeting the proteins PpChit1 and PpPer2. PM morphology was assessed by means several microscopy techniques, including TEM, confocal, and atomic force. Our results indicate that feeding the specific antisera anti-PpChit1 or anti-PpPer2 led to changes of the PM structure and kinetics, specifically with regards to its overall thickness and degradation kinetics. Our data provides further support to transmission blocking approaches to prevent *Leishmania* transmission by sand flies by targeting molecules involved in the formation and degradation of the sand fly PM.

2. Materials and methods

2.1. Mice

BALB/c mice, 8–12 weeks in age, were raised and maintained under pathogen-free conditions at the Kansas State University animal facility. The use of animals during this study was reviewed and approved by the Kansas State University IACUC under protocol number #4484.

2.2. Antisera production

Specific antisera to PpChit1 and PpPer2 were produced and purified as previously described (Coutinho-Abreu et al., 2010). Plasmids encoding each mature protein were purified and then sterilized by filtration using a 0.2- μ m filter (Millipore). A volume of 10 μ l (10 μ g/ μ l) of the purified plasmid was injected subcutaneously into the ears of isoflurane-anesthetized female BALB/c mice 8–12

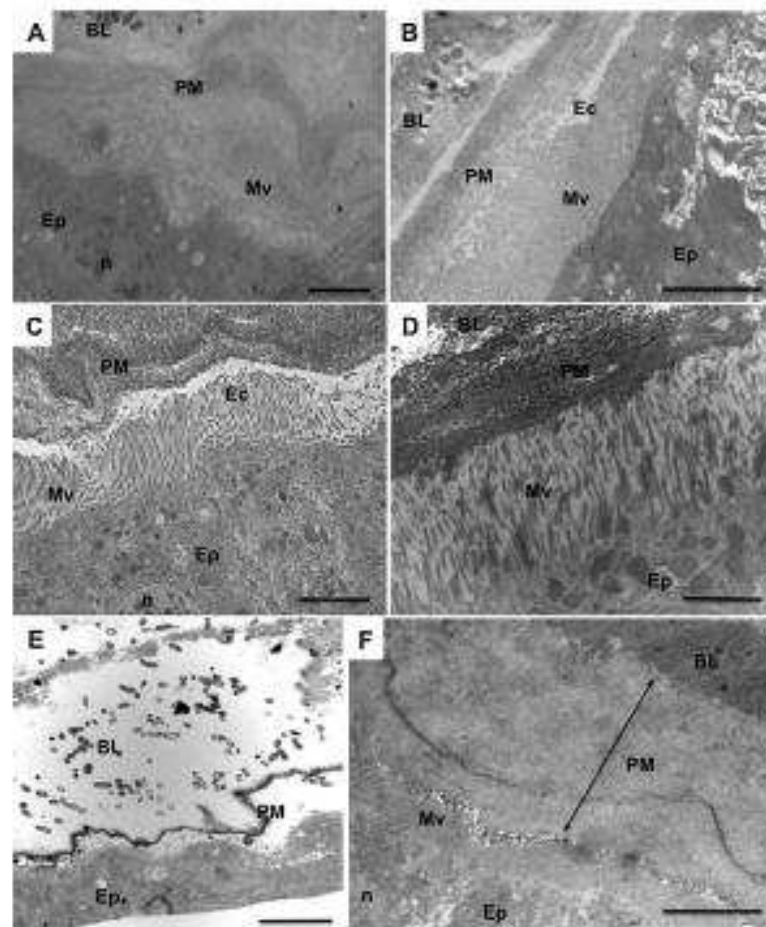


Fig. 2. Transmission electron micrographs of the midgut of *P. papatasi*. Sand flies fed with RBC reconstituted with naive sera (A, C, E) or with RBC reconstituted with anti-PpChit1 (B, D, F). The midguts were dissected 24, 48 and 72 h PPM. Epithelium (Ep), Extraperitrophic space (Ec), Peritrophic Matrix (PM), Microvilli (Mv), Nuclei of the digestive cells (n), Food bolus (BL), PM thickness (black arrow) (F). Bars—5 μ m (A, B, E and F); 9 μ m (C); 3 μ m (D).

weeks of age, using a 29.5 gauge needle. A total of three injections per mouse ear were done, each two weeks apart. Two weeks after the last DNA immunization, about 300 μ l of blood was collected from the sub-mandibular vein from each mouse. Collected serum was separated by centrifugation at 750 rpm for 10 min (Eppendorf, USA). The titer of antibody obtained was measured with the Easy-Titer Kit IgG Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) following the manufacturer's recommendations and kept at -20°C until use.

2.3. Rearing and feeding of sand flies

Phlebotomus papatasi Israeli strain (PPIS) were reared in the Department of Entomology, Kansas State University, under 12 h by 12 h (12h:12h) light/dark cycles and at 25°C and 80% RH. Two groups, one experimental and one control, with roughly 150 females (3–5 days old) each were used. Each experiment was

conducted separately. Red blood cells (RBC) were collected by centrifugation from blood obtained from a naive (non immunized) mouse and reconstituted with 195 μ l of serum naive (control) or with 195 μ l of specific antisera, either anti-PpChit1 or anti-PpPer2. Sand flies were allowed to feed for 1 h using chicken skin membranes placed on glass feeders attached to a circulating water bath set at 37°C .

2.4. Morphology

2.4.1. Dissection

Adult *P. papatasi* females were anesthetized with CO_2 , washed briefly in soapy water and transferred ice cold 0.1 M PBS immediately prior to dissection. Dissections were done under a Zeiss 2000 stereoscope. Midguts were dissected in 0.1 M PBS and placed in fixative solution (either 0.25% glutaraldehyde, 2.5% glutaraldehyde or

4% paraformaldehyde) and maintained at 4 °C for at least 2 h until use.

2.4.2. Light microscopy

For histological analysis, five midguts per time point were dissected from flies fed on anti-PpChit1 sera at 24 h, 48 h and 72 h PBM, and transferred to a fixative solution (glutaraldehyde 2.5X, 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4) for at least 2 h. Guts were washed 2X in PBS and dehydrated in graded ethanol series for 5 min each bath (30–100%), infiltrated in Ethanol/histo-resin Leica® (Leica, Nussloch, Germany) (1:1) for 10 min and histo-resin without hardener for at least 1 h. Samples were embedded in histo-resin and hardener solution at room temperature according to the manufacturer's protocol. Slices 3 µm-thick obtained using glass blades and microtome were stained with hematoxylin and eosin (HE). The dried slides were mounted in Eukitt® mounting medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and photographed under an optical microscope Olympus BX 53 coupled with an Olympus DP73 digital camera.

2.4.3. Transmission electron microscopy (TEM)

Eight midguts each fed either with anti-PpChit1, anti-PpPer2, or naïve sera were dissected in PBS, transferred to fixative (2.5X glutaraldehyde, 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4) and held for 2 h at room temperature to the subsequent steps. Guts were washed in cacodylate buffer and post-fixed for 2 h in 1X osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer. Following five washes in PBS guts were dehydrated in graded ethanol series (30–100%), pre-infiltrated in LRWhite® acrylic resin (London Resin Company Ltd., England) and 100% ethanol 2:1, 1:1, and embedded in 100% resin overnight. The inclusion of resin was carried out at 60 °C in gelatin capsules for 48 h. Ultrathin sections (70–90 nm) were contrasted with 2% aqueous uranyl acetate and 1% lead citrate and analyzed using a Zeiss EM 109 transmission electron microscope.

2.4.4. Atomic force microscopy (AFM)

Five PMs were dissected intact, 30 h PBM, from females treated with anti-PpChit1, anti-PpPer2 and control in 50% ethanol in PBS 1X and fixed in 0.25X glutaraldehyde. Dissection of PMs from flies treated with anti-PpPer2 at times later than 30 h PBM proved to be extremely difficult, as the PM were highly degraded and completely falling apart during the dissection. PMs were dehydrated in graded ethanol series (30–100%) and dried HMDS. The inner surface (corresponding to the endoperitrophic space) was positioned under a cover slip of 1 cm² and evaluated in semi-contact mode in a scanning probe microscope model (Integrates Probe Nanolaboratory Molecular Devices and Tools made Nanotechnology) (NT-MDT, Moscow, Russia).

2.4.5. Laser confocal microscopy/WGA-FTC labeling

To assess for the presence of polysaccharides containing β-1-4 N-acetyl-glucosamine residues, sand flies were fed with anti-PpChit1, anti-PpPer2, and naïve sera and guts dissected at 48 h and 72 h PBM. Six midguts from each group were dissected and fixed in Zamboni's solution (picric acid and formaldehyde), washed 3× for 30 min each in PBS containing 1X Tween (PBST), incubated 1 h at room temperature with FTC-conjugated wheat germ agglutinin (WGA) (Sigma-Aldrich, #L4895, Israel) diluted 1:1000 in 0.1 M PBS. Guts were washed 3 times in PBS for 5 min each and the cells' nuclei were labeled with TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) diluted 1:1000 in 0.1 M PBS for 1 h. Following a final set of three 5 min washes in PBS, slides were mounted with Mowiol solution and analyzed under confocal microscope Zeiss 510 LSM NMM/JUV. Fluorescence intensity was quantified using the Zeiss LSM Image Examiner (version 4.0.0).

2.4.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Statistica 7.0 software (Copyright Statsoft Inc, USA). For all treatments, mean and standard deviation were calculated and considered significant at 5% ($P < 0.05$). Initially, data distribution was assessed for normality by the Shapiro-Wilk's test. However, due to its non-normal distribution, differences between treatments were assessed using the nonparametric Kruskal-Wallis test and Wilk Cox-Mann-Whitney.

3. Results

3.1. Histology

The midgut epithelium in *P. papatasi* is formed by a typical single layer of columnar cells with central nuclei. These cells are supported by a basal lamina and display a well-developed brush border on the apical portion (Fig. 1). Following the blood meal, at 24 h PBM, the secreted PM appeared to be similar between sand flies fed on RBCs that were reconstituted either in the anti-PpChit1 or the control naïve sera, with a thin layer separating the blood bolus just above the midgut epithelium. At 48 h PBM, the PM appeared completely formed in all three groups, and with much thicker and with darker aspect than at 24 h PBM. The dark coloration present throughout the PM (Fig. 1) is likely due to heme that can be bound to heme-binding motifs present in *P. papatasi* peritrophins (Coutinho-Abreu et al., 2013). Interestingly, differences in the PM were noted at 72 h PBM between flies that fed on either specific antisera anti-PpChit1 or flies that fed on the naïve serum. The PM of the individuals fed on either antisera was still very much preserved and considerably thicker than in the control sera fed flies, and suggestive of a delay in the degradation of the PM in the specific antisera fed flies. In addition, traces of blood and blood cells were still visible within the food bolus of such flies (Figs. 1 and 2). In stark contrast, the PM of flies that fed on the naïve sera significantly degraded (Fig. 1A–C).

3.2. Transmission electron microscopy (TEM)

The TEM confirmed the midgut epithelium cells of *P. papatasi* are supported by a basal lamina, with the apical portion covered with numerous microvilli arranged in parallel (Fig. 2). The overall thickness of the PM at 24 h and 48 h PBM was similar for flies fed either with the specific antisera or fed on the control serum (Fig. 2A–D). Curiously, at 72 h PBM, the anti-PpChit1 fed flies had a thicker PM and greater numbers of blood cells compared to the naïve sera-fed flies (Fig. 2E and F). The PM was also evaluated in sand flies fed with the anti-PpPer2 specific antiserum at 30 h and between 42 and 46 h PBM. Thirty hours after feeding, the general structuring of the epithelia and the PM were similar for both anti-PpPer2 fed and naïve serum fed; for the former, cells rich in mitochondria, and covered with microvilli on the apical portion; and for the latter, the well-structured PMs. However, between 42-to-46 h PBM, sand flies fed with anti-PpPer2 displayed a porous PM in comparison to the naïve sera fed flies (Fig. 3D).

3.3. Atomic force microscopy (AFM)

Next we compared the topography of the PM dissected at 30 h PBM from sand flies fed on anti-PpChit1, anti-PpPer2 and naïve sera reconstituted RBCs using AFM in semi-contact mode. For flies fed on either of the two specific antisera, an increase of the amplitude of the PM surface roughness was observed compared to the PM obtained from the naïve sera fed flies. Furthermore, the PM thickness was also significantly altered, with flies that fed on the anti-PpPer2 antisera being twice as thick as flies that fed on naïve

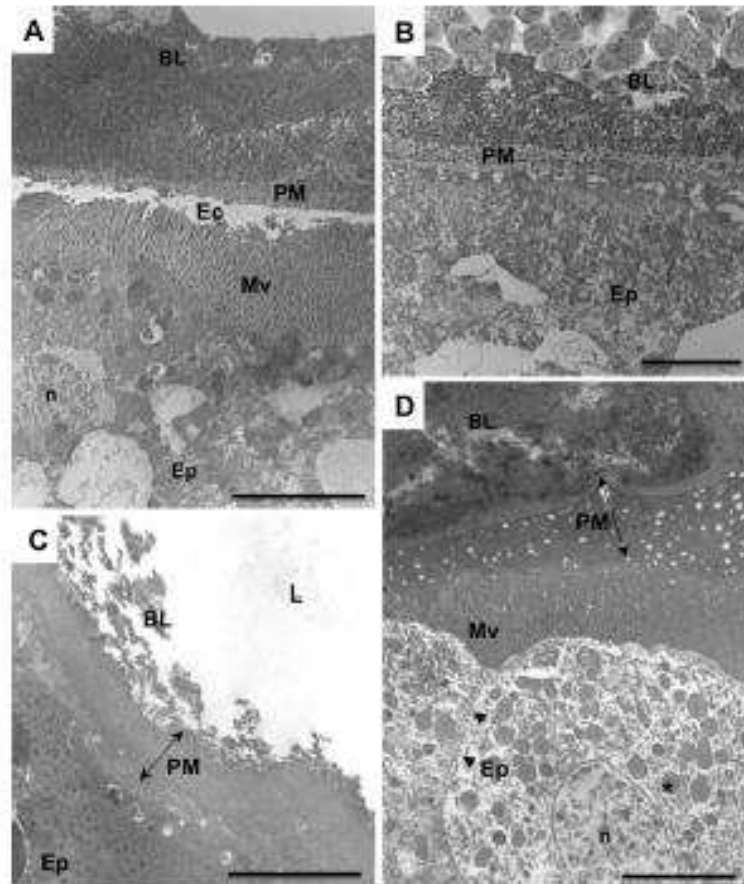


Fig. 3. Transmission electron micrographs of the midgut of *P. papatasi*. Sand flies fed with RBC reconstituted with native sera (A and C) or with RBC reconstituted with anti-PpPer2 sera (B and D). The midguts were dissected at 30 h PBM (A and B) or between 42 and 46 h PBM (C and D). Cell membrane (arrowheads), Epithelium (Ep), Schopenitrophic space (S), Peritrophic matrix (PM), PM thickness (black arrows) (C–D), Microvilli (Mv), Nuclei of the digestive cells (n), Mitochondria (*), Food bolus (BL), Lumen (L). Bar = 5 μm (A, C and D), Bar = 2 μm (B).

Table 1
PM internal face roughness for each area analyzed. Mean and standard deviation (sd) are also shown for each area measured.

Treatment	Amplitude:			
	Area 50 μm ²	Area 20 μm ²	Area 10 μm ²	Area 10 μm ²
Control-native sera	230 nm (mean 242.5; sd 64.1)	110 nm (mean 225; sd 53.8)	175 nm (mean 180; sd 36.7)	105 nm (mean 135; sd 42.4)
Anti-PpChit1	650 nm (mean 675; sd 88.4)	600 nm (mean 570; sd 40.4)	400 nm (mean 225; sd 112.5)	550 nm (mean 370; sd 105.4)
Anti-PpPer2	450 nm (mean 420; sd 42.4)	325 nm (mean 307.5; sd 66.1)	300 nm (mean 440; sd 106)	250 nm (mean 250; sd 14.1)

sera, and the flies that fed on anti-PpChit1 displaying a PM approximately 3-fold as thick as the control flies (Table 1 and Fig. 4). The amplitude was measured using the roughness profile of each sample, by subtracting the lowest point of the profile from the highest point. To our knowledge this is the first time AFM is used to define the effects of anisera targeting insect PM, or for that matter any proteinaceous structure.

3.4. FITC-conjugated WGA labeling of sand fly midguts (confocal microscopy)

Finally, we assessed the overall amount of chitin present in the PM of sand flies, according to the different feeding regimens in this study, by using FITC-WGA. FITC-WGA binds to the N-acetyl-glucosamine (NAG) residues. Analysis of the images and the intensity of fluorescence signal indicate that, by 7.2 h PBM, the PM

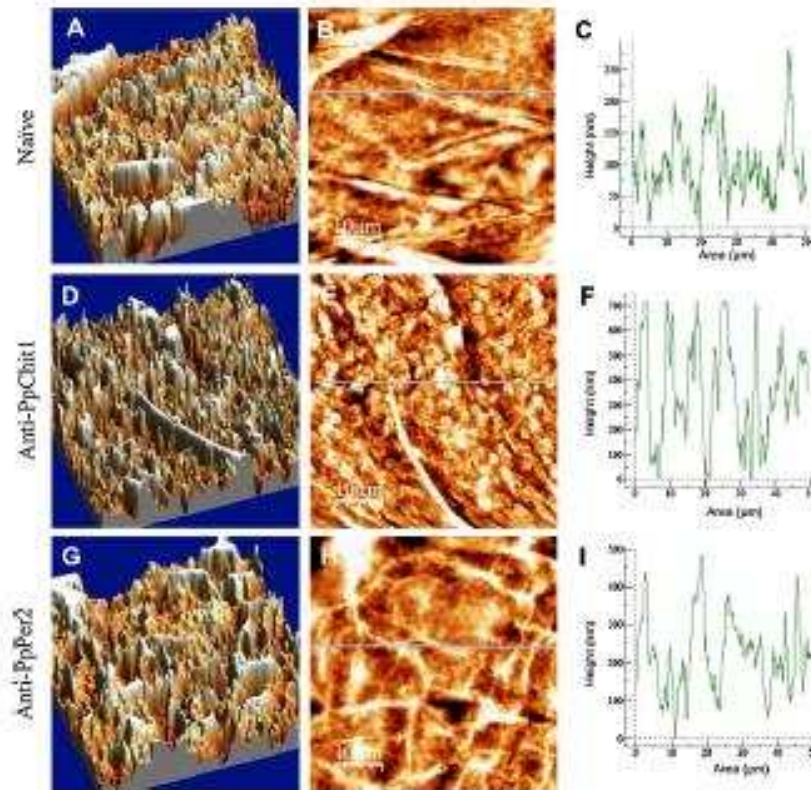


Fig. 4. Atomic force microscopy showing the topography of the inner face of *P. papatasi* peritrophic matrix 30 h PBM. A, B and C correspond to the control. In D, E and F sand flies were fed with blood containing antiserum anti-PpChit1. In G, H and I sand flies were fed with blood containing antiserum anti-PpPer2. The left column represents the 3D image, the middle column represents the digital image of sample topography and the right column represents the amplitude chart of roughness in 50 μm^2 PM area.

of sand flies fed with anti-PpChit1 or anti-PpPer2 were significantly more intensely stained than the naive sera fed flies ($P < 0.05$) (Figs. 5 and 6). In this study, the FITC-WGA labeling served as a proxy to determine PM stability.

4. Discussion

We investigated the effects of specific antisera targeting the PM-associated proteins PpChit1 and PpPer2 on the kinetics of PM formation and degradation in the sand fly *P. papatasi*. Whereas PpChit1 is a midgut-specific chitinase involved in the maturation and degradation of PM (Rantala-Ostigjo et al., 2005), the peritrophins PpPer1 and PpPer2 likely are integral to the PM scaffolding in *P. papatasi* (Coutinho-Abreu et al., 2013).

We show that feeding sand flies with RBCs reconstituted with antisera targeting PpChit1 and PpPer2 lead to a delay in the degradation of PM in comparison to flies fed on RBCs reconstituted with naive sera. Such delay in the PM degradation was verified through the persistence and increased thickness of the PM at 72 h PBM compared to controls. A concomitant delay in the excretion of the blood bolus, as shown by presence of blood remains in the gut lumen, also was observed. Further, the comparative microscopy analy-

ses of PMs obtained either by feeding flies on RBCs reconstituted with naive sera or with the anti-PpChit1 or anti-PpPer2 sera indicated that the feeding using either specific antisera led to structural changes of the PM not observed in the naive sera-fed flies. Such changes include a significantly thicker PM that is maintained in the anti-PpChit1 fed flies by 72 h PBM, as observed from the TEM, and with significant alterations to the PM surface, represented by the roughness detected with the AFM.

It is generally accepted that the synthesis of the PM relies on a balance between chitin deposition and chitin (Pimenta et al., 1997). PM degradation is achieved by cleavage of the β -(1–4) glycosidic bonds present in the chitin microfibrils (Merzendorfer, 2003), and catalyzed by midgut chitinases such as PpChit1. It has been shown that addition of an exogenous chitinase in the blood meal leads to lack of PM formation in *P. papatasi* midgut (Pimenta et al., 1997; Araújo, 2012). Conversely, when sand flies were fed with blood containing the chitinase inhibitor allosamidin the PM formed was more dense and thicker (Pimenta et al., 1997). From the AFM analysis and in consonance with these data, the thickening of the PM after feeding anti-PpChit1 may be due to the lack of structural organization caused by the imbalance during chitin deposition without the modulating effect expected of the chitinase PpChit1.

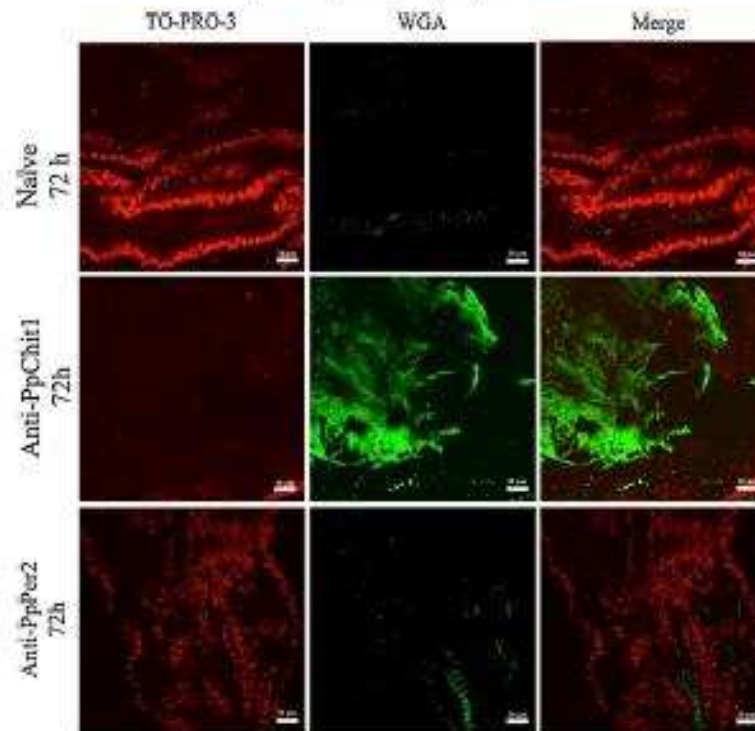


Fig. 5. *F. pipiens* female midgut stained with WGA-FITC (green) and TO-PRO-3 (red). Panels show midguts dissected from sand flies 72 h after feeding on RBC reconstituted with naive sera, or with anti-PpChit1 or anti-PpPer2 antisera, and hybridized with FITC-labeled WGA. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

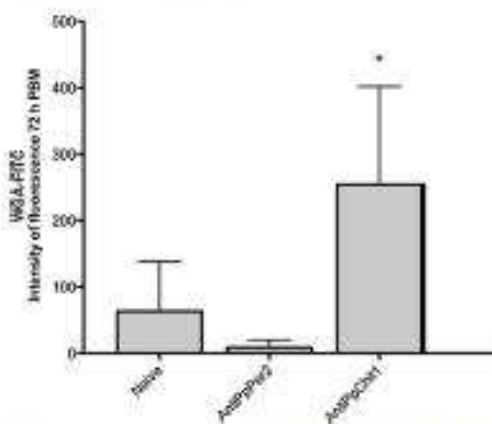


Fig. 6. WGA-FITC fluorescence intensity in the midgut of *F. pipiens*. Mean and standard deviation are shown (bars). A significant difference ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis) was observed in the FITC fluorescence intensity flies fed on the naive sera, the anti-PpChit1 sera.

The interaction of CBDs present in peritrophins with the glycoproteins that make up a large portion of the components of the PM is critical for the scaffolding that maintains the PM molecular structure and its three-dimensional network (Shao et al., 2005; Ramalho-Ortigao et al., 2007). Feeding sand flies with the anti-PpPer2 sera led to a thicker but at the same time more porous PM compared to the PM in flies fed the control sera. We speculate that such structural disruption of the PM was possibly caused by the disruption of the peritrophin-glycoprotein interactions, either by direct blocking or by allosteric change of the CBDs following binding of the antisera targeting the two peritrophins.

The WGA-FITC labeling points to the presence of significant amounts of PM-associated chitin 72 h PBM in sand flies fed anti-PpChit1. Much less PM-associated chitin is detected in naive sera-fed flies. The accumulation of chitin in the anti-PpChit1 fed flies potentially is the result of the imbalance between synthesis and degradation, which typically occurs during PM maturation (Shao et al., 2001), caused by the antisera. Whereas chitin is an essential component of the PM scaffolding (Kelkenberg et al., 2015), the chitin accumulation this late in the digestive process evidenced by WGA-FITC binding points to a reduction of the chitinolytic activity in the gut with a corresponding increase in PM thickness and reduction in its permeability.

It has been suggested that a delay in digestion and absorption of nutrients can be caused by changes in the PM (Terra, 2001; Hegedus

et al., 2009). In the sand fly *L. longipalpis*, addition of exogenous chitinase was linked to a faster acquisition of nutrients due to the lack of the PM (Araújo, 2012). Hence, PM thickness and permeability (or porosity) may be associated with effects on digestion and insect fitness (Shen and Jacobs-Lorena, 1997). Fitness parameters such as egg laying, rate of excretion, and survival, among others, were investigated previously (Robles-Murguía et al., 2014). Interestingly, flies fed on anti-PpChit1 sera lived longer than flies fed on native sera. The anti-PpChit1 sera also had a negative effect on the ability of flies to lay eggs. These effects were linked to the thicker and longer lasting PM, presumably able to scavenge more heme thus reducing its toxicity (Pavoa et al., 2002; Devenport et al., 2006), and reducing the flow of nutrients towards egg development.

We demonstrated that whereas the RNAi knockdown (KD) of PpChit1 significantly reduced *Leishmania major* load within the midgut of its natural vector *P. papatasi* (Coutinho-Almeida et al., 2010), PpPer1 KD led to an increase in the parasite load (Coutinho-Almeida et al., 2013). These results highlighted the role played by PpChit1 and PpPer1 during formation, including scaffolding, and degradation of PM, and the PM role as a barrier to *Leishmania*. The data also supported targeting sand fly midgut chitinases, such as PpChit1, in vector based approaches for transmission blocking. The feeding of specific antisera targeting sand fly molecules associated with *Leishmania* development was demonstrated in the seminal study by Kamhawi et al. (2004) targeting the *L. major* LPG receptor in *P. papatasi*. In *P. papatasi*, midgut chitinolytic activity reaches a peak at approximately 48 h PBM, presumably when *Leishmania* escape from the endoperitrophic space is also occurring. We also previously demonstrated that the anti-PpChit1 serum was effective in significantly reducing the activity of recombinant as well as native forms of PpChit1, with a cross-species activity (Ilamatho-Ortigão et al., 2005). Although we have yet to demonstrate a direct effect of anti-PpChit1 in the transmission of *Leishmania* by sand flies to naive vertebrates, for example by trapping parasites within the PM, the thicker and longer lasting PM produced by feeding sand flies anti-PpChit1 is a step towards such goal. As altering aspects of the PM structure can lead to reduction in the load of *Leishmania* within the sand fly vector, we believe that PpChit1, its orthologs, or peritrophins involved in the scaffolding of the PM, can provide meaningful target(s) for transmission reduction. It is also conceivable that, in combination with current strategies such as vaccination of dogs against transmission of *Leishmania infantum* (Nogueira et al., 2005; Saraiva et al., 2006; Borja-Cabrera et al., 2008), transmission elimination for certain *Leishmania* species may be achieved.

Acknowledgements

To the "NMMUFV" for technical assistance. Financial support from the "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)" and "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/PVE 88881.030429/2013-01".

References

Araújo, D., 2012. Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in *Latrodectus longipalpis* females. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 540–545. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02752012000400016>.

Bates, F.A., Rogers, M.L., 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* 4, 601–609. <http://dx.doi.org/10.2174/15662640430230285>.

Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Bazar, F.S., Parra, L.E., Menez, I., Mergalo, A.A., Soares, I.S., Batista, L.M.M., Palatnik-de-Sousa, C.B., 2008. Immunogenicity assay of the *Leishmania*® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 26, 4601–4607. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.020>.

Coutinho-Almeida, L.V., Sharma, N.K., Robles-Murguía, M., Ramalho-Ortigão, M., 2010. Targeting the midgut secreted PpChit1 reduces *Leishmania major*

development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000301>.

Coutinho-Almeida, L.V., Sharma, N.K., Robles-Murguía, M., Ramalho-Ortigão, M., 2012. Characterization of *Phlebotomus papatasi* peritrophins, and the role of PpPer1 in *Leishmania major* survival in its natural vector. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–16. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0021121>.

Devenport, M., Jacobs-Lorena, M., 2005. The peritrophic matrix of hematophagous insects. In: *Biology of Disease Vectors*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, New York, pp. 307–310. <http://dx.doi.org/10.1002/978047042>.

Devenport, M., Alvaranga, P.H., Zhao, L., Rajkovic, H., Blanton, M.L., Oliveira, F.L., Jacobs-Lorena, M., 2006. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AePM13 as a heme-binding protein. *Biochemistry* 45, 9540–9548. <http://dx.doi.org/10.1021/bi060994t>.

Hegstad, O., Edlandsson, M., Gilotti, C., Toprak, U., 2008. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 285–302. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110607.060250>.

Kamhawi, S., Ramalho-Ortigão, M., Van, M.P., Kumar, S., Lawyer, P.G., Tauxe, S.J., Baillon-Mary, C., Sacks, D.L., Valenzuela, J.G., 2004. A role for insect gut flora in parasite survival. *Cell* 118, 329–341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.008>.

Kellensberg, M., Othman-Naweh, J., Muthalibshawi, S., Merendovler, H., 2015. Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 56, 21–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsect.2014.11.005>.

Lehane, M.J., Hillenkamp, F.F., 1986. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, pp. 486. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-1216-0_11.

Lehane, M.J., 1987. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* 42 (1), 525–550. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>.

Merendovler, H., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthase and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4463–4472. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.00596>.

Nogueira, F.S., Moreira, M. A. B., Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Menez, I., Parra, L.E., Xu, Z., Chu, H.J., Palatnik-de-Sousa, C.B., Lovisato, M.C.R., 2005. *Leishmania*® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 23, 4805–4810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.03.011>.

Pavoa, V., Oliveira, P.L., Dama-Petrolini, M., Silva, J.R., Alvaranga, P.H., Jacobs-Lorena, M., Lorenz, F.J.A., 2002. *Aedes* gaggie peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 517–523. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3748\(02\)00130-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3748(02)00130-6).

Peters, W., 1982. *Peritrophic Membranes*. Springer, Berlin, pp. 238. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-84414-0>.

Pimenta, P.F., Meak, G.B., Pereira, S.T., Shubshudin, M., Sacks, D.L., 2017. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115, 358–368. <http://dx.doi.org/10.1017/S00222688160001510>.

Pratolera, K., Saldou, J., Sclavo, V., Rencio, M., Volynka, J., Volz, F., 2015. Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania* exposure. *PLoS One* 10, e0128020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128020>.

Ramalho-Ortigão, J.M., Traub-Castell, Y.M., 2003. Molecular characterization of Uchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Latrodectus longipalpis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 279–287. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3748\(03\)00206-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3748(03)00206-6).

Ramalho-Ortigão, J.M., Kamhawi, S., Joshi, M.B., Reynolds, D., Lawyer, P.G., Dwyer, D.M., Sacks, D.L., Valenzuela, J.G., 2005. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vector *Latrodectus longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Mol. Biol.* 14, 703–712. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.00601.x>.

Ramalho-Ortigão, M., Joshi, M.B., Anderson, J.M., 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 females. *BMC Genom.* 8, 308. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-308>.

Ramalho-Ortigão, M., 2010. Sand Fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *Open Parasitol. J.* 4, 185–204. <http://dx.doi.org/10.2174/1874432409034810105>.

Robles-Murguía, M., Biedrow, N., Murray, L., Ramalho-Ortigão, M., 2014. Effect of mouse antisera targeting the *Phlebotomus papatasi* midgut chitinase PpChit1 on sand fly physiology and fitness. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109, 1064–1069. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-0275201402382>.

Sáclóvi, J., Volz, P., 2006. Peritrophic matrix of *Phlebotomus* suborder and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell Tissue Res.* 317, 313–325. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-006-0802-1>.

Sacks, D.L., Kamhawi, S., 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol.* 3, 189–196. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00115.x>.

Saraiva, E.M., Barbosa, A.D.F., Santos, F.N., Borja-Cabrera, G.P., Nico, D., Souza, L.O.P., Mendes-Aguiar, C.D.D., De Souza, E.P., Fajana, F., Parra, L.E., Menez, I., Dias, J.G., De Oliveira, S.M., Palatnik-De-Sousa, C.B., 2006. The PM-vaccine (*Leishmania*®) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine* 24, 2423–2431. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.067>.

Serendino, N.F.Z., Eger-Mangrich, I., Braga, E.M., Santoro, M.M., Pimenta, F.F.P., 2005. *Latrodectus longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J. Med. Entomol.* 42, 928–938. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/42.5.928>.

- Shan, L., Devenport, M., Jacobs-Lorena, M., 2001. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 119–125, <http://dx.doi.org/10.1002/arch.1042>.
- Shan, L., Devenport, M., Fujisaki, H., Ghosh, A., Jacobs-Lorena, M., 2005. Identification and characterization of a novel peritrophic matrix protein, Ae-Apex50, and the microvillar membrane protein AeGT2, from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 647–659, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.03.012>.
- Shen, Z., Jacobs-Lorena, M., 1997. Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 28895–28900, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.46.28895>.
- Telford, R.L., Woffels, G., Williamson, P., 1998. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 87–103, [http://dx.doi.org/10.1016/S0962-1748\(98\)00123-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0962-1748(98)00123-4).
- Terra, W.R., 2001. The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gut. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 47–61, <http://dx.doi.org/10.1002/arch.1026>.

CAPÍTULO 2

SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNA DE INTERFERÊNCIA DA QUITINASE *PpChit1* NO INTESTINO MÉDIO DE *Phlebotomus papatasi*

Resumo

Em flebotomíneos vetores de *Leishmania*, o desenvolvimento do parasito ocorre no trato digestivo e na fase inicial a infecção está relacionado à digestão sanguínea. Poucas horas após a ingestão de sangue, em resposta a distensão sofrida pelas células epiteliais intestinais, inicia-se no intestino médio do vetor a formação de estrutura quitino-proteica chamada matriz peritrófica (MP), que envolve o alimento ingerido compartimentalizando a digestão. Quando flebotomíneos se alimentam se sangue infectado, para sobreviver e se estabelecer dentro do intestino dos insetos, os parasitos devem transpor alguns eventos, dentre eles escapar do espaço endoperitrófico e se fixar ao epitélio do intestino, impedindo a eliminação durante a defecação. Tem sido mostrado que *PpChit1*, uma quitinase específica do intestino médio de *P. papatasi*, está envolvida na maturação e degradação da MP. Neste trabalho avaliamos o efeito da injeção de 85ng de ds*PpChit1* em *P. papatasi*, e a expressão do gene alvo foi monitorada 24, 48, 72 e 96 horas após a alimentação sanguínea. Verificamos que em todos os horários analisados a injeção de ds*PpChit1* levou a redução de transcritos para *PpChit1*, sendo que em 48 e 96 horas após a alimentação essa redução foi maior, 57% e 49%, respectivamente. Nossos dados são importantes pois confirmam dados já mostrados por nosso grupo de pesquisa, sobre os efeitos da injeção de ds*PpChit1* na redução de transcritos de *PpChit1*. O silenciamento via RNAi associado a uma avaliação fenotípica da MP, pode futuramente auxiliar no entendimento do papel de proteínas relacionadas a MP em flebotomíneos.

1 – Introdução

O desenvolvimento de uma infecção por *Leishmania* em flebotomíneos vetores é confinado ao trato digestivo destes insetos e nas fases iniciais, a infecção está intimamente associada com a digestão sanguínea no intestino médio. No lúmen do intestino, concomitantemente ao processo digestivo, após a ingestão de sangue contendo macrófagos infectados, os parasitos se multiplicam e sofrem transformações morfológicas dentro do bolo alimentar circundado pela MP tipo 1 (revisado por Sacks e Kamhawi, 2001; Bates e Rogers, 2004). A MP (1) consiste em uma matriz extracelular composta por quitina, proteínas e proteoglicanos secretadas pelo epitélio do intestino médio, em resposta a distensão sofrida após repasto sanguíneo. Essa matriz quitino-proteica envolve o alimento ingerido, e separa o conteúdo luminal do epitélio digestivo (revisado por Lehane, 1997).

Para completar o seu ciclo de vida, parasitos *Leishmania* com desenvolvimento suprapilárico (i.e., subgênero *Leishmania*) devem superar algumas barreiras no intestino médio do vetor. Dentre eles, resistir às atividades de enzimas digestivas (Sant'Anna et al, 2009; Telleria et al, 2010), escapar do espaço intraperitrofélico e se ligar a receptores específicos no epitélio do intestino (no caso de vetores restritivos) (Svárovská et al, 2010; Kamhawi et al, 2004). A transposição dessas barreiras contribui para o sucesso da infecção e assim para a capacidade vetorial dos flebotomíneos (Pimenta et al, 1997).

A MP exerce duplo papel nas interações vetor - *Leishmania*. Na fase inicial da infecção, a MP protege os parasitos do ataque proteolítico num momento importante da transição amastigota – promastigota. Por outro lado, a MP pode influenciar de forma adversa o desenvolvimento da *Leishmania* promastigota, por criar uma barreira física que previne o escape de parasitos para o espaço ectoperitrofélico, resultando na eliminação dos mesmos na defecação (Pimenta et al, 1997; revisado por Bates e Rogers, 2004).

A degradação da MP requer a atividade de quitinases, que agem hidrolisando as microfibrilas de quitina que a compõem, um processo que ocorre normalmente ao final da digestão. Schlein et al (1991) sugeriram que promastigotas de *Leishmania* podem influenciar a quebra da MP por secretar quitinases que danificam a região anterior da MP no intestino de *P. papatasi*. A supreexpressão de quitinase por *L.*

mexicana mutantes facilitou o escape através da MP e contribuiu para os efeitos danosos da enzima à válvula estomodeal em *Lutzomyia longipalpis*, (Rogers et al, 2008). Entretanto, Sadlová et al (2009) demonstraram que *Leishmania major* permanece no espaço endoperitrofélico “aguardando” pela quebra da MP por quitinases derivadas do inseto. Em muitas combinações vetor-parasito, o escape de *Leishmania* tem sido associado à quebra da MP por quitinases derivadas de flebotomíneos, sendo secretadas pelas células digestivas do epitélio intestinal (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö, 2003; Ramalho-Ortigão et al, 2005).

A porosidade e espessura da MP são determinadas pelo equilíbrio, principalmente, entre a síntese e degradação de quitina, pela ação de quitina-sintases e quitinases, respectivamente (revisado em Shao et al, 2001). Enzimas quitinases específicas, foram identificadas e caracterizadas no intestino médio de *L. longipalpis* (Ramalho-Ortigão e Traub-Cseko 2003) e *P. papatasi* (Ramalho-Ortigão et al, 2005), LIChit1 e PpChit1, respectivamente. A transcrição de ambos os genes é modulada pela ingestão sanguínea e alcançam um pico de expressão 72 horas após a alimentação, sendo que PpChit1 exibe máxima atividade quitinolítica 48 horas após a ingestão de sangue (Ramalho- Ortigão et al, 2005).

A PpChit1 do intestino médio de *P. papatasi* provavelmente está envolvida com a maturação/degradação da MP (Ramalho-Ortigão et al, 2005; Coutinho-Abreu et al, 2010). O *knockdown* via RNAi de PpChit1 em *P. papatasi* infectados com *L. major*, levou a significativa redução da carga parasitária no intestino do inseto (Coutinho-Abreu et al, 2010). A alimentação com células sanguíneas reconstituídas com antisoro específico para PpChit1, tornou a MP de *P. papatasi* mais espessa e persistente, afetando a cinética de degradação da MP (Malta et al, 2016).

A introdução de um RNA dupla fita (dsRNA - “*double-stranded RNA*”) induz a destruição de RNA mensageiro homólogo, causando uma diminuição na síntese da proteína correspondente. Essa técnica conhecida como RNA de interferência é considerada uma importante ferramenta para o estudo da função de genes em diversos organismos (revisado por Bellés, 2010). O emprego de dsRNA tem levado à interferência na expressão de uma variedade de genes em diferentes tecidos de artrópodes, como nos mosquitos *Anopheles gambiae* (Vlachou et al, 2005; Boisson et al, 2006; Zang et al, 2011), em *Aedes aegypti* (Campbell et al, 2008; McFarlane et al, 2014; Drake et al, 2015), *Culex quinquefasciatus* (Li et al, 2014); na abelha *Apis*

mellifera (Maleszka et al, 2007), dentre outros.

Muitos aspectos acerca do desenvolvimento de parasitos do gênero *Leishmania* em flebotomíneos são conhecidos, entretanto, detalhes sobre como algumas moléculas no vetor afetam o desenvolvimento do parasito ainda permanecem não muito claros. Desta forma, a avaliação do silenciamento de PpChit1, pode auxiliar na compreensão do papel de PpChit1 na estrutura e função da MP em *Phlebotomus papatasi*, bem como na elucidação de questões acerca do papel da MP em uma infecção por *Leishmania*. Embora, neste trabalho, não tenha sido realizada uma análise dos parâmetros fenotípicos do intestino médio bem como da MP após o silenciamento (via RNAi) de PpChit, a eficiência da técnica foi avaliada. Mostramos que a injeção de dsPpChit1 foi eficaz em promover o *knockdown* de PpChit1 em *P. papatasi*. Neste sentido, para complementar estes resultados, mais experimentos são necessários, a fim de verificar o fenótipo da MP após o silenciamento, o que seria um passo importante para a conclusão dos dados aqui mostrados.

2 - Material e métodos

Este trabalho foi conduzido no *Biology of Disease Vectors Laboratory*, do departamento de Entomologia da *Kansas State University*. O uso de animais durante este estudo foi revisto e aprovado pelo *Kansas State University Institutional Animal Care and Use Committee (KSU-IACUC)*.

2.2 - Criação dos flebotomíneos

Os flebotomíneos da espécie *P. papatasi* (originadas de Israel - PPIS) foram obtidos a partir de colônias mantidas no Departamento de Entomologia da *Kansas State University*, Kansas, Estados Unidos, em incubadores com temperatura ($\pm 26^{\circ}\text{C}$), umidade (80%) e fotoperíodo (12/12h claro/escuro).

2.3 - Síntese de dsRNA

Os dsRNAs foram sintetizados como descrito por Coutinho-Abreu et al. (2010). Um fragmento específico de cDNA foi usado como molde para a síntese do dsRNA para PpChit1. O cDNA foi obtido a partir da dissecação de cinco intestinos médios de *P. papatasi* coletados 72 horas após a alimentação sanguínea em animal (camundongo BALB/c - anestesiado com 100 mg/kg de cetamina e 3mg/kg de xilazina). A reação ocorreu com a utilização de oligonucleotídeos contendo a sequência do promotor T7 (a seguir e em negrito) e amplificando para a sequência total da proteína madura PpChit1. Os primers utilizados foram: PpChit1/T7i_2-F: (5'-**TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGAAGATATCATTGTGTGC**-3'), PpChit1/T7i_2-R: (5'-**TAATACGACTCACTATAGGGAGATCAGCATTGGACCAGGAAGG**-3'). As reações de PCR foram realizadas com 0,5 picomoles de cada primer e com 1 μl de cDNA, utilizando 10 μl de GoTaq PCR master mix (Promega, Madison, WI, USA). Um volume de 20 μl da reação foi submetido à uma segunda PCR com os seguintes passos: 10 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto e 15 segundos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto e 15 segundos. Os produtos da reação foram purificados e concentrados e 1 μg foi utilizado para a síntese do dsRNA, com o kit Megascript RNAi kit (Ambion, Austin, TX, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Ao final, os dsRNAs obtidos foram purificados e concentrados para aproximadamente 3.5 a 4 mg/ml usando filtros

Amicon (Millipore®). Como controle para as injeções, foi sintetizado um dsRNA para o gene da proteína verde fluorescente (dsGFP)

2.4 – Micro-injeção do RNAi

Para o procedimento de microinjeção, aproximadamente 250 fêmeas de *P. papatasi* com 3-4 dias de idade foram brevemente anestesiadas com CO₂, mantidas no gelo e então injetadas intratoraxicamente (logo abaixo da asa) com 23 nl (aproximadamente 85 ng/inseto) de ambos dsRNAs, com auxílio do micro-injetor Nanoject II microinjector (Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) e um microscópio estereoscópico. As fêmeas foram separadas em dois grupos experimentais sendo um grupo injetado com dsChit1 e outro com dsGFP (Como controle - *double strand RNA for green fluorescent protein*). Após a injeção os insetos foram transferidos para potes plásticos de 500 ml, com algodão embebido em solução de açúcar 20%, e mantidos em câmara úmida (85-95% de umidade e 25°C de temperatura), onde permaneceram até a alimentação. A alimentação foi realizada 24 horas após a injeção, diretamente em animal (camundongo BALB/c - anestesiado com 100 mg/kg de cetamina e 3mg/kg de xilazina), por 1,5 horas. Cerca de seis horas após a alimentação sanguínea, as fêmeas foram anestesiadas em CO₂, observadas sob microscópio estereoscópico e separadas em grupos de acordo com a distensão abdominal que apresentavam. Somente fêmeas com sinais claros de que ingeriram sangue, ou seja, aquelas com o intestino totalmente cheio e com coloração escura foram utilizadas nos experimentos de RT-PCR.

2.5 - Dissecção dos intestinos dos flebotomíneos

Para obtenção dos intestinos médios, as fêmeas foram anestesiadas e dissecados após serem e lavadas com água e uma gota de detergente para a retirada do excesso de escamas na superfície do corpo. O intestino de cada fêmea de *P. papatasi* foi dissecado 24, 48, 72 e 96 horas após a alimentação sanguínea em lâminas de vidro livres de RNase, devidamente limpas com ELIMINase® (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Cada intestino foi transferido individualmente para um tubo contendo 30 µl de *RNA later*® e homogeneizado imediatamente com pistilo plástico usando o homogeneizador. As amostras foram armazenadas a -80°C até a extração do RNA total.

2.6 - Extração de RNA e síntese do cDNA

A técnica de RT-PCR para avaliar níveis de expressão de mRNA específicos requer o isolamento de RNA, síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa e finalmente a amplificação e detecção dos produtos gerados em PCR. Desta forma, o RNA total foi extraído de cada intestino utilizando o kit (RNAeasy mini kit, Qiagen, Valencia, CA, USA). Ao conteúdo homogeneizado de cada amostra foi adicionado 350 µl de tampão de lise (suplementado com 1% de β-mercaptoetanol), e a extração foi realizada seguindo as recomendações do fabricante. Ao final da extração o material foi armazenado em freezer -80°C. A quantificação do RNA foi realizada apenas em gel e cerca de 25 ng de RNA foi usado para a síntese do cDNA.

Para a síntese da fita complementar (cDNA), 12 µl de RNA foi adicionado ao mix contendo 1 µl de Oligo (dT)₂₀ 50 mM e 1 µl de dNTPs. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos e mantida no gelo por um minuto. Em seguida, um mix contendo 4 µl de *First-Strand Buffer* 5X, 1 µl de DTT (0,1M) 20 Unidades de RNaseOUT e 0.5 µl SuperScript III Reverse Transcriptase (100 unidades) foi adicionado à reação. Para a síntese do cDNA, o mix foi incubado por 60 minutos a 50°C e armazenado a -20°C. Todos os reagentes para a síntese do cDNA foram adquiridos na Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

2.7 - Análise por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A expressão relativa foi avaliada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) com detecção de fluorescência SYBR Green[®] (BioRad, Hercules, CA, USA). As reações foram realizadas em duplicata utilizando 1 µl cDNA de cada amostra, 1 µl de cada primer (10 µM), 4 µl de SYBR green[®] 2X (BioRad, Hercules, CA, USA), 1 µl de água ultrapura e livre de DNase/RNase (Invitrogen). Para amplificação de quitinase, foram utilizados os primers PpChit_137F (5' - ATGATCTGCATGGTTCTTGG - 3') e PpChit_137R (5' - GGAGCTCCATTTTCAATCC - 3') (Coutinho-Abreu et al, 2010). Para a amplificação do gene endógeno (controle interno) foi utilizado o primer S3 (que codifica para a proteína S3 da subunidade ribossomal 40S) (Pp40S_S3_136F: 5'- GGA CAGAAATCATCATCATG - 3' e Pp40S_S3_136R: 5'- CCTTTTCAGCGTACAGCTC - 3') (Coutinho-Abreu et al, 2010). A condições de amplificação seguiram os seguintes passos: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento 56°C por 1 minuto, e extensão 72°C por 30 segundos, por 40 ciclos. Ao

término das amplificações foi adicionado o estágio referente à curva de dissociação (*Melting curve*) para que a especificidade das reações fosse garantida e confirmar a ausência da formação de dímeros de primers. Os perfis de amplificação foram analisados com o software “e” do sistema *Realplex Master cycler* (Eppendorf®).

Para quantificar a expressão relativa dos transcritos, foi aplicado o método Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmittgen, 2001). Inicialmente, calculou-se o ΔCt de cada amostra, subtraindo os valores de Ct - *Cycle threshold* (valor referente ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção) do gene alvo (PpChit-137), dos valores do Ct do gene endógeno (S3). A calibração dos valores foi determinada pela fórmula: [ΔCt - calibrador (média dos valores de ΔCt das amostras controle injetadas com dsGFP)]. Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ utiliza-se a seguinte fórmula: [ΔCt (gene alvo) – ΔCt (gene constitutivo)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta Ct$, aplica-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que resulta no valor da expressão relativa de cada amostra.

2.8 - Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de *Shapiro-Wilker* e a análise dos dados foi realizada através o teste t de *Student* para verificar a diferença entre os tratamentos em cada horário analisado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 – Resultados e discussão

O silenciamento gênico por microinjeções de dsRNA tem sido utilizado em flebotomíneos e foi comprovada sua eficácia em fêmeas de *L. longipalpis* pela redução da expressão das enzimas xantina desidrogenase (Sant'Anna et al. 2008) e tripsina 1 (Sant'Anna et al. 2009), além do silenciamento do gene *caspar*, um regulador negativo da via de imunidade IMD (Telleria et al, 2012). O silenciamento também foi feito em fêmeas de *P. papatasi* considerando genes que codificam as proteínas associadas a MP, PpPer1 (Coutinho-Abreu et al, 2013) e PpChit1 (Coutinho-Abreu et al, 2010). De maneira semelhante a esse último, aqui também analisou-se o *knockdown* de PpChit1 em *P. papatasi*, e mostramos a viabilidade e eficácia da técnica.

O efeito da injeção de dsRNA para PpChit1 foi avaliado por *qRT-PCR* em *P. papatasi*. A expressão gênica relativa foi calculada individualmente, tanto para aqueles indivíduos injetados com dsPpChit1 como dsGFP (controle), de 2-5 dias após a injeção do dsRNA. A introdução de dsRNA na hemocele dos insetos promoveu o silenciamento do gene alvo, observado pela redução variável dos transcritos após a alimentação sanguínea em todos os horários avaliados (24h, 48h, 72h e 96h após a alimentação sanguínea) quando comparados àqueles injetados com dsGFP (controle). Embora a comparação entre as médias encontradas para o grupo-controle e o grupo-tratado (injetados com dsPpChit1) não apresentassem diferença estatística significativa em todos os horários analisados, uma redução no percentual de transcritos de PpChit1 foi verificada (Fig. 1).

Vinte e quatro horas após a alimentação sanguínea ocorreu a redução de 35% da quantidade dos transcritos de PpChit1, quando comparado àqueles injetados com dsGFP (controle) ($p > 0,05$) (Fig. 1). Em condições normais, 24 horas após a alimentação, a MP em *P. papatasi* encontra-se formada e é vista como uma fina camada logo acima do epitélio, separando o bolo alimentar das células epiteliais intestinais (Pruzinova et al, 2015; Malta et al, 2016). Nesse mesmo horário, níveis significantes de atividade enzimática de PpChit1 foram detectados em lisados do intestino médio de *P. papatasi*, *in vitro* (Ramalho-Ortigão et al, 2005), indicando uma possível atuação da enzima na manutenção da MP durante a formação da mesma. Embora ensaios de atividade quitinolítica após a injeção de dsPpChit1 não

tenham sido realizados, o papel de PpChit1 foi indiretamente mostrado. Há um aumento na espessura da MP 30 horas após a alimentação com anti-PpChit1, sugerindo uma desorganização estrutural da MP, possivelmente causada pela deposição de quitina sem a modulação por PpChit1 (Malta et al, 2016). Apesar de não ser uma redução expressiva, uma diminuição de 35% nos transcritos para PpChit1 poderia influenciar na atividade da enzima.

Quarenta e oito horas após a alimentação sanguínea a PpChit1 apresenta um pico de atividade quitinolítica no intestino médio de *P. papatasi* (Ramalho-Ortigão et al, 2005). Nesse momento após a alimentação (i.e., 72 horas após a injeção) houve uma redução de 57% (*p<0,05) (Fig. 1) nos níveis de RNAm para PpChit1, maior que aquela observada em 24 h. A injeção de dsPpChit1 também foi capaz de diminuir os níveis de transcritos para PpChit1 além de uma redução de 95% na quantidade da mesma em 48 horas após a alimentação sanguínea (Coutinho-Abreu et al, 2010). Tais resultados nos permitem especular que uma redução de 57% nos níveis de RNAm para PpChit1 poderia afetar a manutenção da estrutura da MP, por reduzir a taxa de atividade da enzima, uma vez que a MP apresenta-se formada cerca de 36-40 horas após a alimentação sanguínea (Secundino et al, 2005; Malta et al, 2016). Além disso, uma diminuição na expressão de PpChit1 poderia ocasionar a um espessamento da MP pelo aumento do conteúdo de quitina sem a modulação pela enzima, ou pela sua atividade reduzida. Apoiando essa hipótese, o silenciamento da quitinase *OnCht* via RNAi diminuiu de 63-64% os níveis de transcritos da enzima em *Ostrinia nubilalis*. O *knockdown* de *OnCht* consequentemente aumentou em 26% o conteúdo de quitina da MP no intestino do lepidóptero, sugerindo um papel regulatório do gene de quitinase no conteúdo de quitina pela redução na taxa de degradação de quitina pela enzima (Khajuria et al, 2010).

Setenta e duas horas após a alimentação foi observada a redução de 38% nos níveis de RNAm para PpChit1 (*p<0,05) (Fig. 1). Durante uma infecção por *Leishmania major* um evento crucial ao desenvolvimento dos parasitos ocorre aproximadamente em 72 horas após alimentação sanguínea: as formas nectomonas escapam do espaço endoperitrófico, atravessam a MP e ancoram-se às microvilosidades do epitélio intestinal, de forma a evitar sua expulsão durante a defecação (Pimenta et al, 1997; Sádlová e Volf, 2009). Embora não tenha sido uma redução expressiva, provavelmente pelo alto nível de transcrição, uma vez que

PpChit1 possui um pico de expressão 72 horas após a alimentação (Ramalho-Ortigão et al, 2005), a redução de 38 % nos níveis de transcritos neste horário poderia prejudicar a atuação da enzima. O silenciamento de PpChit1 levou a uma redução no número de *L. major* no intestino de *P. papatasi*, 48 horas e 120 horas após a infecção. A diminuição da carga parasitária 48 horas após a infecção pode ser explicada por no mínimo dois motivos relacionados a espessura da MP: (1) uma diminuição na disponibilidade de nutrientes aos parasitos no espaço endoperitrófico, pela variação na permeabilidade da MP; ou (2) os parasitos não foram capazes de escapar e ficaram expostos mais tempo às enzimas digestivas (Coutinho-Abreu et al, 2010).

Noventa e seis horas após a alimentação (i.e., 120 horas após a injeção), houve uma redução de 49% nos níveis de RNAm nos insetos injetados com dsPpChit1 (*p<0,05) (Fig 4). De maneira semelhante, Coutinho-Abreu et al, (2010) mostraram que o *knockdown* de PpChit1 levou a uma redução de 72% nos níveis dos transcritos 96 horas após a alimentação. Embora nenhuma atividade quitinolítica tenha sido detectada nesse horário, os níveis de expressão de transcritos para PpChit1 96 horas após a alimentação foram altos (Ramalho-Ortigão et al, (2005). A redução acentuada dos transcritos 120 horas após a injeção de PpChit1 mostra a persistência do dsRNA e sugere a existência de um mecanismo de manutenção do efeito do RNAi. Embora os mecanismos específicos envolvidos na persistência de RNAi não sejam totalmente compreendidos, diferenças na sensibilidade ao tratamento em insetos tem sido relatadas (Bellés, 2010; Terenius et al, 2011) e alguns insetos possuem mecanismos de degradação capazes de remover o RNA exógeno (Garbutt et al, 2012).

A injeção de 85 ng de dsPpChit1 mostrada aqui, levou a redução de 57% e 49% dos transcritos 48 e 96 horas após a alimentação sanguínea, respectivamente. Em outro estudo a injeção de 80,5 ng de dsPpChit1 reduziu em 58% e 72%, a expressão de transcritos para o gene alvo, 48 e 96 horas após a alimentação, respectivamente (Coutinho-Abreu et al, 2010). Curiosamente, em ambos os trabalhos um maior percentual na redução de transcritos foi observado 48 e 96 horas, justamente nos horários que antecedem os picos de expressão de PpChit1, que são 72 e 120 horas (Ramalho-Ortigão et al, 2005). Uma hipótese para explicar este fato seria que a eficiência do dsRNA em induzir a destruição do RNAm homólogo é

aparentemente maior quando o número de cópias de transcritos do gene alvo é menor.

Em conclusão, a injeção de 85ng de dsPpChit1 foi eficiente na redução nos transcritos, verificada pelo *knockdown* de PpChit1 em todos os horários aqui analisados. Embora neste estudo não tenhamos examinado o fenótipo da MP resultante do silenciamento, a partir de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostrando o papel de PpChit1 na modulação da MP, podemos inferir sobre o envolvimento de PpChit1 na maturação e degradação da MP. O entendimento da função de PpChit1 pode ser útil na compreensão de vários aspectos da biologia de flebotomíneos vetores além de possibilitar novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de controle da transmissão de *Leishmania* por flebotomíneos. Novos experimentos precisam ser realizados a fim de melhor compreender como o *knockdown* de PpChit1 afeta as características físicas da MP como por exemplo, a sua permeabilidade.

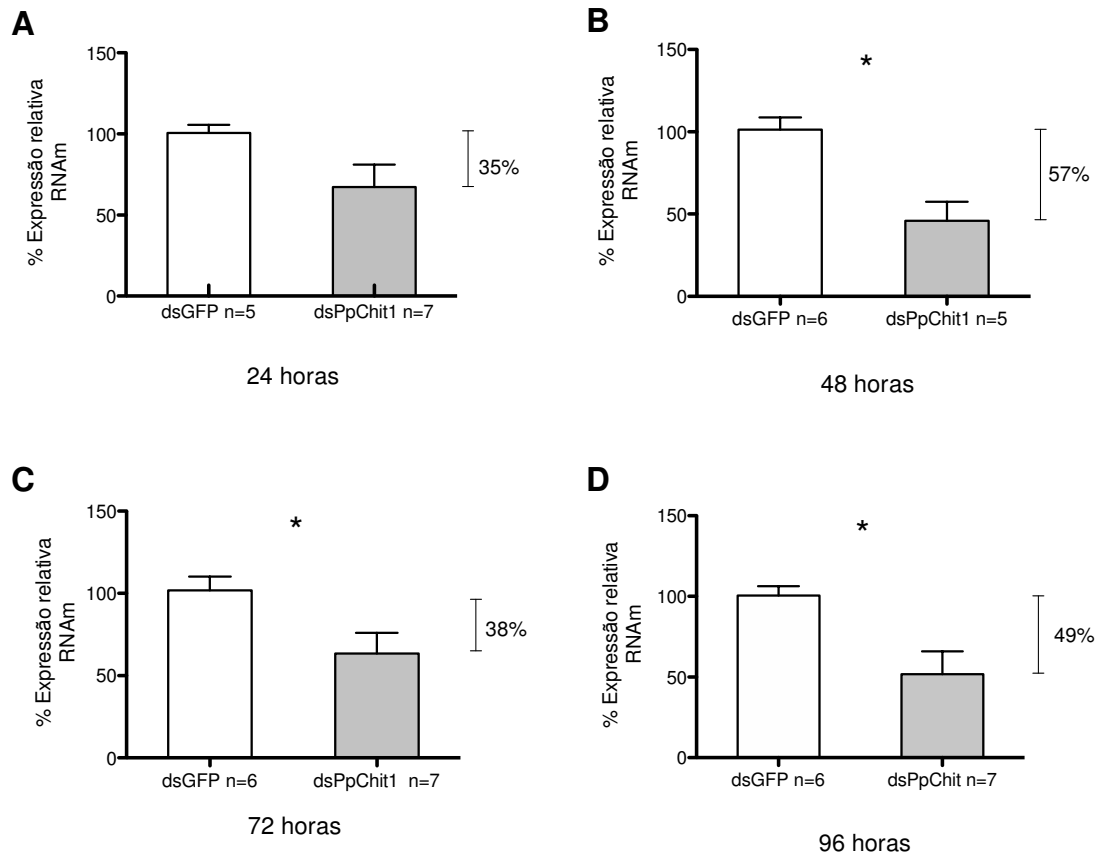


Figura 1 - Quantificação da expressão relativa de RNAm de PpChit1 no intestino médio de *P. papatasi*. As barras correspondem à média (\pm erro padrão) da expressão dos transcritos após a injeção de 85ng de dsPpChit1 e do dsGFP. A redução nos níveis de transcritos é mostrada 24 horas após a alimentação em (A), 48 horas (B), 72 horas (C) e 96 horas (D). Asteriscos indicam diferença estatística entre as amostras tratadas e controle acordo com Teste t de Student ($p < 0,05$).

4 – Referências Bibliográficas

- Araújo, A. P. O. D., Telleria, E. L., Dutra, J. D. M. F., Júlio, R. M., & Traub-Csekö, Y. M. (2012). Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in *Lutzomyia longipalpis* females. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107 (4), 543-545.
- Bates, P. A., & Rogers, M. E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, 4 (6), 601-609.
- Bellés, X. (2010). Beyond *Drosophila*: RNAi *in vivo* and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology*, 55, 111-128.
- Boisson, B., Jacques, J. C., Choumet, V., Martin, E., Xu, J., Vernick, K., & Bourgouin, C. (2006). Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Letters*, 580 (8), 1988-1992.
- Campbell, C. L., Keene, K. M., Brackney, D. E., Olson, K. E., Blair, C. D., Wilusz, J., & Foy, B. D. (2008). *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against *Sindbis* virus infection. *BMC Microbiology*, 8 (47), 1-12.
- Coutinho-Abreu, I. V., Sharma, N. K., Robles-Murguía, M., & Ramalho-Ortigao, M. (2010). Targeting the midgut secreted PpChit1 reduces *Leishmania major* development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4 (11), e901.
- Coutinho-Abreu, I. V., Sharma, N. K., Robles-Murguía, M., & Ramalho-Ortigao, M. (2013). Characterization of *Phlebotomus papatasi* peritrophins, and the role of PpPer1 in *Leishmania major* survival in its natural vector. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7 (3), e2132.
- Drake, L. L., Rodriguez, S. D., & Hansen, I. A. (2015). Functional characterization of aquaporins and aquaglyceroporins of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 5 (7795), 1-7.
- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Barillas-Mury, C., Sacks, D. L., & Valenzuela, J. G., & Valenzuela, J. G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119 (3), 329-341.
- Khajuria, C., Buschman, L. L., Chen, M. S., Muthukrishnan, S., & Zhu, K. Y. (2010). A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40 (8), 621-629.

Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, 42 (1), 525-550.

Li, T., Liu, L., Zhang, L., & Liu, N. (2014). Role of G-protein-coupled receptor-related genes in insecticide resistance of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Scientific Reports*, 4, 6474.

Maleszka, J., Foret, S., Saint, R., & Maleszka, R. (2007). RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Development Genes and Evolution*, 217 (3), 189-196.

Malta, J., Martins, G. F., Weng, J. L., Fernandes, K. M., Munford, M. L., & Ramalho-Ortigão, M. (2016). Effects of specific antisera targeting peritrophic matrix-associated proteins in the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Acta Tropica*, 159, 161-169.

McFarlane, M., Arias-Goeta, C., Martin, E., O'Hara, Z., Lulla, A., Mousson, Rainey, S M., Misbah, S., Schnettler, E., Donald, C., Merits, A., Kohl, A., & Failloux, A. (2014). Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit *Chikungunya* virus replication. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8 (7), e2994.

Pruzinova, K., Sadlova, J., Seblova, V., Homola, M., Votypka, J., & Volf, P. (2015). Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. *PloS One*, 10 (6), e0128203.

Ramalho-Ortigao, J. M., & Traub-Csekö, Y. M. (2003). Molecular characterization of *Llchit1*, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33 (3), 279-287.

Ramalho-Ortigão, J. M., Kamhawi, S., Joshi, M. B., Reynoso, D., Lawyer, P. G., Dwyer, D. M., D. L. Sacks & Valenzuela, J. G. (2005). Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Molecular Biology*, 14 (6), 703-712.

Rogers, M. E., Hajmová, M., Joshi, M. B., Sadlova, J., Dwyer, D. M., Volf, P., & Bates, P. A. (2008). *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cellular Microbiology*, 10 (6), 1363-1372.

Sacks, D. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 115 (4), 359-369.

Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis 1. *Annual Reviews in Microbiology*, 55 (1), 453-483.

- Sádlová, J., & Volf, P. (2009). Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell and Tissue Research*, 337 (2), 313-325.
- Sant'Anna, M. R., Diaz-Albiter, H., Mubarak, M., Dillon, R. J., & Bates, P. A. (2009). Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasites & Vectors*, 2 (62), 1-10.
- Sant'Anna, M. R., Alexander, B., Bates, P. A., & Dillon, R. J. (2008). Gene silencing in phlebotomine sand flies: *Xanthine dehydrogenase* knock down by dsRNA microinjections. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (6), 652-660.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., & Shlomai, J. (1991). Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 245 (1313), 121-126.
- Shao, L., Devenport, M., & Jacobs-Lorena, M. (2001). The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47 (2), 119-125.
- Svárovská, A., Ant, T. H., Seblová, V., Jecná, L., Beverley, S. M., & Volf, P. (2010). *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2⁻) but not lipophosphoglycan (lpg1⁻) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4 (1), e580.
- Telleria, E. L., de Araújo, A. P. O., Secundino, N. F., d'Avila-Levy, C. M., & Traub-Csekö, Y. M. (2010). Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*-expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum* chagasi. *PLoS One*, 5(5), e10697.
- Telleria, E. L., Sant'Anna, M. R., Ortigão-Farias, J. R., Pitaluga, A. N., Dillon, V. M., Bates, P. A., Traub-Csekö, I. M., & Dillon, R. J. (2012). Caspar-like gene depletion reduces *Leishmania* infection in sand fly host *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (16), 12985-12993.
- Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Christophides, G. K., & Kafatos, F. C. (2005). Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in *Anopheles* during *Plasmodium* invasion. *Current Biology*, 15 (13), 1185-1195.
- Zhang, J., Zhang, X., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Ma, E., & Zhu, K. Y. (2011). Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *PloS One*, 6 (5), e19899.

CAPÍTULO 3

MORFOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DE *Lutzomyia longipalpis* E *Phlebotomus papatasi* DURANTE A METAMORFOSE

Resumo

A renovação e substituição do epitélio do intestino médio durante a metamorfose é um importante evento em insetos holometábolos. Essa remodelação tem início no último instar larval com a degeneração do epitélio e a diferenciação de células regenerativas, formando o epitélio intestinal do adulto. Neste trabalho avaliamos o desenvolvimento do intestino médio durante a metamorfose em *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*, duas espécies de flebotomíneos, vetoras de parasitos do gênero *Leishmania*. As fases/estágios: larvas de 4º instar com três dias (L4-3) e com cinco dias (L4-5) após a ecdise, pré-pupa, pupa 24 horas e 72 horas após início da metamorfose e adulto recém-emergido. Amostras do intestino médio foram avaliadas por microscopia de luz (ML), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e imunofluorescência. As mudanças no intestino médio iniciaram-se no 4º instar larval, com a degeneração do epitélio larval, seguida pelo remodelamento do epitélio pela diferenciação de células regenerativas em pré-pupa e pupa. No adulto recém emergido, o novo epitélio apresenta-se organizado e constituído por células colunares altas e com microvilosidades arranjadas paralelamente. Células em mitose foram vistas nas duas espécies nos estágios de L4 a pupa 72 h. Enquanto células em apoptose (ou positivas para caspase-3) ocorreram em pré-pupa e pupa 72 h em *L. longipalpis* e em pré-pupa, pupa 24 h e 72 h em *P. papatasi*. Marcações positivas para LC3 foram vistas de pré-pupa a pupa 72 h em *L. longipalpis* e somente no estágio pupal em *P. papatasi*, indicando que tanto autofagia como apoptose ocorrem nas células intestinais larvais durante a transição larva-pupa. Este trabalho mostra pela primeira vez a descrição do desenvolvimento do intestino médio durante a metamorfose de flebotomíneos, mostrando que o processo é bastante conservado entre as duas espécies no que diz respeito às características morfológicas de degeneração e regeneração do epitélio se diferem quanto ao início do processo degenerativo, que em *P. papatasi* iniciou-se mais cedo em relação a *L. longipalpis*.

1 - Introdução

Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são importantes vetores de doenças humanas e animais, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, agente causador da Leishmaniose (revisado por Killick-Kendrick, 1990). As leishmanioses constituem um complexo de doenças com variado espectro clínico e epidemiológico. Considerada uma doença tropical negligenciada, a leishmaniose representa grave problema de saúde pública em mais de 98 países, e cerca de 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção. Estima-se que a incidência anual desta endemia seja de 1,5 a 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas (WHO, 2015).

Flebotomíneos são insetos holometábolos, logo apresentam metamorfose bem definida, seu ciclo de vida envolve a fase de ovo, quatro estágios larvais, seguido da fase de pupa e por fim o adulto alado (revisado por Killick-Kendrick, 1990; Rangel e Lainson, 2003). Devido a importância médica e epidemiológica que apresentam, os flebotomíneos estão distribuídos em dois grandes gêneros: *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Young e Duran, 1994). Sendo que a espécie *Phlebotomus papatasi* é o principal vetor de *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), agente etiológico da leishmaniose cutânea (revisado por Killick-Kendrick, 1990), e *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) é considerado o principal vetor da *Leishmania infantum chagasi* (Lainson e Rangel, 2005), agente causador da leishmaniose visceral nas Américas (Grimaldi, 1993; Rangel e Lainson, 2005).

O epitélio do intestino médio dos insetos consiste basicamente de 3 tipos celulares: células digestivas ou enterócitos, células regenerativas e células endócrinas, com predominância das células digestivas. As células digestivas possuem microvilosidades e estão envolvidas com a absorção e secreção de água, produção e secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (revisado por Terra e Ferreira, 1994; Chapman, 2013). As células regenerativas são encontradas isoladas, em pares ou formando grupos, e são essenciais na renovação do epitélio (Neves et al, 2002, Martins et al, 2006). Células endócrinas, aparecem em menor número e estão envolvidas na secreção de hormônios que regulam os processos digestivos (Brown, 1985; revisado por Bilingsley e Lehane, 1996; Neves et al, 2003).

O remodelamento do intestino médio é um importante evento para os insetos holometábolos, atendendo à mudança de hábitos alimentares do inseto, os quais variam entre larva e adulto. O processo de remodelamento ocorre pela proliferação e diferenciação de células-tronco ou regenerativas (Wigglesworth, 1972, revisado por Hakim, 2010). O remodelamento durante a metamorfose inicia-se na transição larva-pupa, um evento que envolve a troca da maior parte das células larvais. Células epiteliais larvais sofrem degeneração e são substituídas pela diferenciação e reorganização de células regenerativas, presentes no intestino médio larval (Neves et al, 2002, Martins et al, 2006). Este mecanismo de remodelamento tem sido estudado em alguns dípteros hematófagos como *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Nishiura et al, 2003; Okuda et al, 2007; Parthasarathy et al, 2007; Ray et al, 2009; Fernandes et al, 2014).

Durante a transição da fase larval para adulta, os flebotomíneos deixam o hábito detritívoro e passam a se alimentar de seivas em plantas e/ou sangue, no caso das fêmeas (Sherlock, 2003). O trato digestivo larval de flebotomíneos possui formato tubular relativamente homogêneo ao longo do seu comprimento (Do Vale et al, 2007; Heerman et al, 2015), enquanto que no adulto a porção abdominal do intestino médio é dilatada, capaz de se expandir após a ingestão de alimentos, incluindo o sangue (Andrade-Coelho et al, 2001; Sádlová et al, 2009; Malta et al, 2016). Embora sejam encontrados vários trabalhos que tratam da morfologia do intestino médio em flebotomíneos (Gemetchu, 1974; Rudin e Hecker, 1982; Andrade-Coelho et al, 2001; Secundino et al, 2005; Malta et al, 2016), todavia, informações sobre o processo de diferenciação do epitélio do intestino médio durante a metamorfose nestes insetos são limitados ou escassos.

O tubo digestivo dos flebotomíneos é importante não somente para a fisiologia do inseto, mas também no aspecto vetorial de transmissão da leishmaniose. A colonização por *Leishmania* é um processo que ocorre na luz do intestino médio do adulto após a alimentação sanguínea, pela ingestão de macrófagos infectados (revisado por Sacks e Kamhawi, 2001). O processo de colonização do intestino médio por promastigotas de *Leishmania*, envolve adesão dos parasitos na parede do órgão, bem como a multiplicação e diferenciação dos mesmos e está relacionado com a permissividade do vetor (Kamhawi et al, 2004; Volf e Peckova, 2007). A *Leishmania* que não for capaz de aderir ao epitélio intestinal pode ser eliminada

durante a excreção do bolo alimentar, e assim impedir o sucesso da infecção, bem como a transmissão aos hospedeiros vertebrados (revisado por Sacks and Kamhawi, 2001).

Apesar do intestino médio ser a “porta de entrada” de parasitos durante a infecção por *Leishmania*, os processos morfofisiológicos que levam a forma final do órgão no adulto, ou seja, a forma capaz de abrigar o parasito, são muito pouco compreendidos. No intuito de melhorar o entendimento do processo de remodelamento do intestino médio em flebotomíneos, no presente trabalho estudamos a morfologia do epitélio do intestino médio de *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia longipalpis*, sob microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência durante o desenvolvimento pós-embrionário. Nossos resultados podem ser úteis para futuras investigações a respeito da biologia destas espécies, bem como, fornecer importantes interpretações do processo de remodelamento do intestino médio durante a metamorfose em flebotomíneos.

2 - Material e métodos

2.1 - Criação dos flebotomíneos

Exemplares de *L. longipalpis* e *P. papatasi* (oriundos de de Jacobina, Bahia – LLJB e Israel – PPIS, respectivamente) foram criados e mantidos em colônias estabelecidas no *Biology of Disease Vectors Laboratory*, do Departamento de Entomologia da *Kansas State University*, Kansas, Estados Unidos, em incubadores com temperatura ($\pm 26^{\circ}\text{C}$), umidade (80%) e fotoperíodo (12/12h claro/escuro). Para as análises foram utilizados: Larvas de 4º instar com três dias de idade (L4-3, antes da defecação), larvas de 4º instar com cinco dias de idade (L4-5, após a defecação), (alimentadas com uma mistura 1/1 de fezes de coelhos com ração de coelho), pré-pupa, pupa 24 horas (P24), pupa 72 horas (P72) e adulto recém-emergido (RE).

2.2 - Morfologia

2.2.1 - Dissecção

Para as análises histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão (MET), cinco intestinos médio de *L. Longipalpis* e *P. papatasi*, foram dissecados de cada fase/estágio, em PBS (tampão fosfato) 0.1 M, e fixados em solução fixadora glutaraldeído 2,5% (tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4) e mantidas a 4° C por no mínimo duas horas. Para as análises de imunofluorescência, as amostras foram dissecadas e fixadas em solução de Zamboni (Stefanini et al, 1967) por 2 h, e mantidas a 4°C em PBS 0,1 M até o uso.

2.2.2 - Histologia

As amostras fixadas foram lavadas em PBS 0,1 M, desidratadas em série crescente de etanol (30-100%). Em seguida, as amostras foram infiltradas em solução etanol/historesina Leica® (*Leica Biosystems*, Nussloch, Germany) (1:1) por 10 min, e embebida em historesina com endurecedor por, no mínimo, uma hora. O material foi seccionado em cortes de três μm e coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou hematoxilina e eosina (HE) e Azul de Toluidina (AT). As lâminas secas foram montadas em meio de montagem Eukitt® (Sigma- Aldrich, St Louis, USA)

analisadas e fotografadas em microscópio óptico Olympus BX 53 com câmera digital Olympus DP 73 acoplada, no Laboratório de Sistemática Molecular, Departamento de Biologia Animal, UFV.

2.2.3 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras fixadas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por duas horas protegidos da luz. Em seguida, foram lavadas por cinco vezes em PBS 0,1 M, e desidratados em concentrações crescentes de etanol (30-100%) e pré-infiltradas em solução de resina LRWhite® (London Resin Company Ltd, England) e etanol 100% (2:1) por uma hora, seguido por outra pré-infiltração da mesma mistura na proporção 1:1 por duas horas. Subsequentemente, as amostras foram mantidas em resina pura, por 24 h a 4°C e a polimerização ocorreu a 60°C por 24 h, em cápsulas de gelatinas. Cortes ultrafinos foram contrastados com solução de acetato de uranila (2%) e citrato de chumbo (0,2%) e analisados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109) do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM/UFV).

2.2.4 - Imunofluorescência

Caspase-3 - Amostras fixadas foram lavadas por três vezes em PBS 0,1M/1% Triton X-100 (PBST) e incubadas com um anticorpo primário anti-Caspase-3 (Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, EUA) por 24 h a 4°C (1:1000) em PBST. As amostras foram lavadas novamente e então incubadas com o anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) em PBS (1:500) por 24 h a 4°C, e lavadas por 3 vezes em PBS, 10 minutos cada lavagem. As lâminas foram montadas em solução de moiwol (montagem total), analisadas e fotografadas em microscópio confocal.

Fosfo-histona H3 - Para identificação de células em divisão *in situ*, as amostras previamente fixadas em Zamboni foram lavadas por três vezes em PBS 0,1M/1% Triton X-100 (PBST) e incubadas com um anticorpo primário contra a proteína nuclear Fosfo-histona H3 (PH3) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, U.S.A) por 24 h a 4°C (1:100) em PBST. As amostras foram lavadas novamente e então incubadas com o anticorpo secundário conjugado com FITC (Sigma) (1:500) em PBS por 24 h a 4°C, e lavadas por 3 vezes em PBS (10 minutos cada lavagem).

Os intestinos médios foram corados por 30 minutos com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) para detecção do núcleo. As lâminas foram montadas (montagem total) em solução de moiwol e analisadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 do NMM-UFV e em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 acoplado a câmera digital do Laboratório de Sistemática Molecular, Departamento de Biologia Animal/UFV

LC3 - Amostras previamente fixadas, foram lavadas por três vezes em PBS 0,1M/1% Triton X-100 (PBST) e incubadas com um anticorpo primário anti-LC3 (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, U.S.A) por 24 h a 4°C (1:100) em PBST. As amostras foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário, montadas e analisadas como no item anterior.

A especificidade de sinais foi avaliada em controles negativos, tratados somente com FITC sem o anticorpo primário e montados em solução de moiwol (montagem total), e analisados e fotografadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 do NMM-UFV.

2.2.5 - Morfometria

Secções histológicas foram utilizadas para se obter a altura das células digestivas. Cinco células foram medidas em cada indivíduo de cada estágio/fase do desenvolvimento considerando células com borda estriada e lâmina basal aparente. As medições foram feitas com o auxílio do programa de computador Image-ProPlus versão para Windows 4.2 (Media Cybernetics). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ($p < 0,001$) para testar diferenças entre as fases de uma mesma espécie, e ao teste T de student para detectar diferenças entre fases iguais nas espécies diferentes ($*p < 0,001\%$).

3 - Resultados

3.1 - Morfologia e ultraestrutura

Larvas L4 com três dias de idade – O epitélio do intestino médio de L4-3 em ambos, *L. longipalpis* e *P. papatasi*, apresentam morfologia semelhante, sendo constituídos por uma camada de células colunares apoiadas numa lamina basal e revestidas, externamente por uma camada muscular (Figs. 1A e 1B). Os principais tipos celulares observados, foram as células digestivas e as células regenerativas. As primeiras possuem borda estriada e estão organizadas como uma camada de células colunares altas, com núcleo central, cromatina predominantemente descondensada e nucléolo evidente (Fig. 1A). As células regenerativas, são pequenas e encontram-se dispostas na base das células digestivas, isoladas ou agrupadas em ninhos (Fig. 1B). O intestino médio de L4-3 apresenta o lúmen preenchido pelo bolo alimentar envolvido pela matriz peritrófica do tipo II (Figs. 1A, 1B e 2A). A altura média das células colunares foi de $49,0 \pm 2,1 \mu\text{m}$ em *L. longipalpis* e $54,5 \pm 3,9 \mu\text{m}$ em *P. papatasi* ($P > 0,001$) sendo também diferente estatisticamente das demais fases ($P < 0,001$) (Fig. 3).

As células digestivas de L4-3 apresentam em sua porção apical microvilosidades bem desenvolvidas organizadas em paralelo e numerosas mitocôndrias (Fig. 1D). A região mediana-apical do citoplasma destas células apresenta numerosos vacúolos, principalmente em *P. papatasi* (Fig. 2B e 2D). Células digestivas adjacentes são unidas por junções septadas presentes principalmente na porção apical (Fig. 1D e 2B). Na região basal dessas células, a membrana plasmática apresenta invaginações, formando um labirinto basal associado a mitocôndrias (Fig. 1C, 1E). Além da lamina basal, o epitélio intestinal é sustentado por feixes musculares internos e externos (Fig. 1 C).

As células regenerativas estão presentes ao longo de todo intestino médio das duas espécies, estando isoladas ou formando grupos (ninhos) na base do epitélio. Estas células possuem citoplasma pouco abundante e núcleo central bem desenvolvido. Apresentam formas arredondadas ou ovais, são pobres em organelas, possuindo poucas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (RER) pouco desenvolvido. O núcleo das células regenerativas possui cromatina predominantemente descondensada e sua membrana plasmática possui poucas

invaginações (Fig. 1 B, 1 D e 2C).

Em *P. papatasi* há protrusões da porção apical das células epiteliais, como “bolhas” surgindo em direção ao lúmen (Fig. 2A). Trata-se de uma evaginação do ápice celular, sugerindo a existência de um mecanismo de secreção apócrina resultante do rompimento dessa região para liberar para o lúmen de parte do citoplasma apical e organelas (Fig. 2B). O processo de degeneração do epitélio larval em *P. papatasi* parece iniciar nessa fase (L4-3), com degeneração das células digestivas, porém, em *L. longipalpis* estas características não foram vistas nessa fase. Diferentemente de *L. longipalpis*, em *P. papatasi*, o citoplasma das células digestivas em degeneração apresentava-se intensamente vacuolizado (Fig. 1D, 2B e 2D). Foi possível visualizar o que parece ser remanescentes de células digestivas entre células intactas (Fig. 2D).

Larvas L4 com cinco dias de idade – Nesse estágio a altura média das células epiteliais digestivas é diferente da fase anterior, com células mais baixas em ambos *L. longipalpis* ($27,9 \pm 1,36$) e *P. papatasi* ($34,0 \pm 2,24$) ($P < 0,001$) (Fig. 3). Diferente de L4-3, a MP não foi vista (Fig. 4A e 4B). Características do processo degenerativo foram observadas em L4-5 de ambas *L. longipalpis* e *P. papatasi*. Essas características incluem o citoplasma das células digestivas repleto de vacúolos citoplasmáticos incluindo vacúolos autofágicos (Fig. 4C e 4D), protrusões citoplasmáticas, semelhantes àquelas vistas no estágio anterior em *P. papatasi* também foram vistas no ápice das células epiteliais de ambas espécies (não mostrado). Com relação às organelas, observamos nas células digestivas um número menor de mitocôndrias comparado à fase anterior e RER bem desenvolvido (Fig. 4C e 4D).

Pré-pupa – Em pré-pupa, o processo de degeneração continua ativamente com liberação de partes do citoplasma do epitélio larval, concomitantemente ao crescimento do novo epitélio (Fig. 5 A-D). Em *L. longipalpis*, células regenerativas são vistas individualizadas na base do epitélio digestivo, enquanto que as células digestivas formam uma camada única de células (Fig. 5A). Diferente de *L. longipalpis*, em *P. papatasi*, o lúmen do intestino médio se encontra totalmente preenchido, provavelmente com remanescentes do epitélio larval, ejetado durante o processo de degeneração que iniciou em L4 (Fig. 5B). A altura média das células que

formam o epitélio intestinal em pré-pupa é ainda menor que na fase anterior em *L. longipalpis* ($18,3\pm 0,8\mu\text{m}$) e em *P. papatasi* ($16,8\pm 0,62\mu\text{m}$) (* $P>0,001$) (Fig. 3).

Células em estágio intermediário de diferenciação crescem em direção ao lúmen, formando um novo epitélio com núcleos em diferentes alturas. Na superfície apical estas células apresentam microvilosidades curtas, núcleo com cromatina descondensada e nucléolo evidente (Fig. 5C e 5D). Células regenerativas foram vistas também em grupos na base do epitélio em *P. papatasi*. Estas células apresentam citoplasma com poucas organelas, apenas algumas mitocôndrias na região acima do núcleo são vistas e núcleo central e volumoso, ocupando quase todo o citoplasma (Fig. 5F). Numerosos vacúolos citoplasmáticos são vistos, alguns deles, autofágicos com material (restos de organelas) em seu interior (Fig. 5E e 5F).

Pupa 24 horas – As características gerais do epitélio intestinal de P24 foram semelhantes para as duas espécies. O novo epitélio em formação apresenta células baixas em diferenciação (Fig. 6A-C, 6E). A altura média do epitélio é de $11,3\pm 0,5\mu\text{m}$ e $13,7\pm 0,92\mu\text{m}$ em *L. longipalpis* e *P. papatasi*, respectivamente (* $P<0,001$) com relação à fase de pré-pupa em *L. longipalpis* (Fig. 3).

Em ambos, o lúmen encontra-se preenchido por material homogêneo e elétron-denso, proveniente, provavelmente, da liberação e histólise do epitélio larval (Fig. 6A-C e 6E). As células epiteliais em diferenciação em *L. longipalpis* possuem numerosas mitocôndrias principalmente na futura região apical, logo acima do núcleo, bem como, microvilosidades curtas e algumas vezes dobradas, aparentemente em formação (Fig. 6D e 6F). No citoplasma, o RER é bem desenvolvido, a presença de poucos vacúolos autofágicos e corpos multi-lamelares, é notada (Fig. 6F e 6G).

Pupa 72 horas – A morfologia do epitélio intestinal nesta fase é similar àquela observada em P24, com células baixas, com altura média de $14,4\pm 0,75\mu\text{m}$ em *L. longipalpis* e $17,4\pm 0,7\mu\text{m}$ em *P. papatasi* (* $P<0,001$). Dobras no epitélio foram vistas nas duas espécies, como se o epitélio recém-formado aumentasse em extensão (Fig. 7A e 7B). Semelhante à fase anterior, o lúmen do intestino se encontra-se preenchido por material elétron-denso (Fig. 7D e 7E). Células regenerativas são encontradas na base do epitélio em diferenciação (Fig. 7C). Células em diferenciação exibem microvilosidades curtas e poucas organelas (Fig. 7D e 7E),

essas células parecem se alongar para alcançar o lúmen, possuem abundância de mitocôndrias na região apical, bem como, visto em P24 (Fig. 7D).

Adulto recém-emergido – O epitélio do intestino médio do adulto recém-emergido apresenta características muito semelhantes nas duas espécies. O novo epitélio é formado por células digestivas colunares altas com $30,1 \pm 1,09 \mu\text{m}$ de altura em *L. longipalpis* e $26,3,6 \pm 0,69 \mu\text{m}$ de altura em *P. papatasi* (Fig. 3) (* $P < 0,001$) e borda em escova reestabelecida. A região apical do epitélio do intestino médio das duas espécies exibe microvilosidades curtas, organizadas paralelamente. As células epiteliais apresentam núcleo na posição mediana, cromatina predominantemente descondensada e nucléolo evidente (Fig. 8A, 8B e 8D), na região basal as células apresentam invaginações da membrana plasmática, formando um discreto labirinto basal (Fig. 8C). O citoplasma destas células apresenta poucas organelas, incluindo algumas mitocôndrias e RER pouco desenvolvido. As células digestivas adjacentes são unidas por junções septadas (Fig. 8C e 8D). O material no lúmen, proveniente de remanescentes da degeneração do epitélio larval, encontra-se quase que totalmente ausente e as células epiteliais retomam sua forma (Fig. 8B e 8D). Células regenerativas não foram vistas nesta fase.

3.2 - Imunofluorescência

Imunofluorescência usando o anticorpo anti-caspase-3 mostrou a aparência de atividade de caspase nos estágios de pré-pupa e P72 em *L. longipalpis*, enquanto que para *P. papatasi* elas são observadas a partir da fase de pré-pupa, P24 e P72 (Fig. 09). Há poucas células com marcações positivas para fosfohistona H3 (marcador mitótico) no intestino das duas espécies estudadas. Em ambas, *L. longipalpis* (Fig. 10) e *P. papatasi* (Fig. 11), marcações foram vistas em todas as fases analisadas de L4-5 a P72. Embora não tenhamos dados quantitativos do número de células positivas para anti-histona H3 fosforilada, uma variação na quantidade de marcações positivas foi vista entre as fases.

Para confirmar a existência de vacúolos autofágicos no intestino médio das espécies aqui estudadas, utilizou-se o anticorpo anti-LC3 em diferentes períodos do desenvolvimento. Marcações positivas para anti-LC3 foram vistas em pré-pupa, P24 e P72 em *L. longipalpis* e P24 e P72 em *P. papatasi* (Fig. 12). A presença ou

ausência de marcações positivas para os anticorpos utilizados são mostradas na tabela 1.

Tabela 1 – Imunofluorescência do intestino médio de flebotomíneos ao longo do desenvolvimento pós-embrionário para três proteínas diferentes. Indicando presença (+) e/ou ausência (-) de marcações.

	Estágios de desenvolvimento			
<i>L. longipalpis</i> <i>P. papatasi</i>	L4 (5 dias)	Pré-pupa	Pupa 24 horas	Pupa 72 horas
caspase 3	-	+	+ / -	+
fosfo-histona H3	+	+	+	+
LC3A/B	-	- / +	+	+

4 - Discussão

O processo de renovação do intestino médio durante a metamorfose, é um importante evento em holometábolos, uma vez que o hábito alimentar muda drasticamente da larva para o adulto (Wigglesworth, 1972). Vários estudos têm focado no processo de remodelamento do intestino médio para diferentes insetos holometábolos (Baldwin e Hakim, 1991; Uwo et al, 2002; Wu et al, 2006; Martins et al, 2005; Tettamanti et al, 2007; Cruz-Landim & Cavalcante 2003; Franzetti et al, 2012, Neves et al, 2002) incluindo alguns dípteras hematófagos (Nishiura et al, 2002; Wu et al, 2006; Parthasarathy et al, 2007; Ray et al, 2009; Fernandes et al, 2014). Entretanto, estudos mostrando o processo de renovação do intestino médio em flebotomíneos são escassos, sendo o presente trabalho o primeiro do tipo para *P. papatasi* e *L. longipalpis*.

O remodelamento do intestino médio em insetos holometábolos durante a metamorfose consiste de dois eventos principais: a degeneração das células do epitélio larval e proliferação e/ou diferenciação de células regenerativas, a fim de formar o epitélio intestinal adulto (Parthasarathy et al, 2007). A metamorfose envolve uma cascata de eventos que ocorrem em resposta a sinais hormonais e é regulada por um balanço entre os títulos de hormônio juvenil e ecdisona (Riddiford e Truman, 1993; e revisado por Hakim et al, 2010). Embora os mecanismos de sinalização que ativam mudanças específicas não sejam totalmente compreendidos (Parthasarathy et al, 2007), sabe-se que, em dípteras, o hormônio ecdisona possui picos de atividade durante o desenvolvimento e um desses picos coincide com o início da histólise do intestino médio larval (Lee et al, 2002). Neste estudo, a degeneração do epitélio digestivo larval, teve início no terceiro dia do 4º instar larval em *P. papatasi*, enquanto em *L. longipalpis*, um pouco mais tarde, iniciando no quinto dia do mesmo instar. Diferenças a respeito do início do processo degenerativo, observadas entre as duas espécies, podem estar relacionadas a diferenças na expressão de fatores de transcrição da transdução de sinal de ecdisona durante a metamorfose.

O processo de remodelamento do intestino médio em mosquitos durante a metamorfose, ocorre pela morte celular programada de células digestivas larvais enquanto células regenerativas se proliferam e se diferenciam para formar o epitélio

intestinal do adulto (Nishiura et al, 2003; Ray et al, 2007). Semelhante ao que ocorre em mosquitos, a degeneração do epitélio larval nas espécies aqui estudadas teve início no 4º instar larval, com a eliminação de células digestivas e foi concluída no estágio pupal. No estágio de pré-pupa, após a ecdise larval, a histólise do epitélio digestivo larval tornou-se mais evidente pelo aumento no número de vacúolos autofágicos (alguns com debris celulares no seu interior) no citoplasma das células digestivas, além do desprendimento e eliminação dessas células para o lúmen. As células epiteliais da larva se desprendem da lamina basal e são ejetadas ao lúmen, dando espaço às células regenerativas que iniciam a diferenciação. Em ambos, *L. longipalpis* e *P. papatasi* o processo ocorreu de maneira semelhante a partir da fase de pré-pupa, e o processo segue sincronizado nas duas espécies, assim que entram na fase de pupa. Em pré-pupa a principal diferença observada foi com relação ao conteúdo luminal, ausente em *L. longipalpis*, uma vez que a eliminação de células do epitélio larval iniciou um pouco mais tarde nessa espécie.

A aparência, forma e altura das células epiteliais intestinais mudam drasticamente durante a metamorfose em insetos holometábolos (Nishiura e Smouse, 2000; Neves et al, 2002). Em *L. longipalpis* e *P. papatasi*, durante a metamorfose, a altura média do intestino médio diminuiu. Em pré-pupa, em função da coexistência de células digestivas larvais e de células regenerativas no início do processo de diferenciação, o epitélio foi visto desorganizado. A menor altura média do epitélio do intestino médio é observada em P24, possivelmente devido à ocorrência de células regenerativas em diferenciação em maior quantidade do que a de células do epitélio larval em degeneração. Nos adultos recém-emergidos, as células recém-diferenciadas são altas e alongadas e as microvilosidades são reestabelecidas, a altura média do epitélio intestinal é maior que aquela vista no estágio pupal, provavelmente em função da eliminação do conteúdo luminal.

Células regenerativas em diferenciação foram vistas nos estágios de pré-pupa e pupa tanto em *L. longipalpis* como em *P. papatasi*. Durante a diferenciação, as células regenerativas se alongam em direção ao lúmen, aumentam o volume nuclear e no citoplasma ocorre aparecimento gradual de organelas, bem como, a regionalização de algumas delas. O acúmulo de mitocôndrias logo acima do núcleo, futura região apical das células é um importante sinal de uma célula em diferenciação e pode auxiliar a célula a alcançar a luz do intestino médio (Rost-Roszkowska et al,

2010). À medida que as células regenerativas avançam no processo de diferenciação, microvilosidades curtas e algumas vezes dobradas, são vistas no ápice destas células. As características morfológicas de células em diferenciação vistas neste trabalho, foram também descritas durante a metamorfose do intestino médio em outros insetos (Neves et al, 2002; Rost-Roszkowska et al, 2010; Fernandes et al, 2014).

Embora muitas células regenerativas estejam ainda em processo de diferenciação, células regenerativas indiferenciadas formado um grupo na base do epitélio em *L. longipalpis*, foram vistas em pupa 72 horas. De acordo com Neves et al, (2002), estas células regenerativas persistem indiferenciadas no período pupal e serão responsáveis por originar outros ninhos de células regenerativas ao final do período pupal. De fato, células regenerativas estão presentes no intestino médio de insetos não somente durante o desenvolvimento. Em adultos de *C. quinquefasciatus*, por exemplo, a reposição e/ou renovação do epitélio intestinal pelo desgaste natural das células, que ocorre após a alimentação sanguínea, se dá por um mecanismo que envolve a diferenciação de células regenerativas basais pré-existentes (Okuda et al, 2007).

A ocorrência de marcações positivas para a histona fosforilada H3 (i.e., células em mitose) foi verificada neste trabalho no intestino médio das duas espécies, sugerindo que mesmo durante o processo de substituição do epitélio larval pelo adulto, ocorre divisão de células regenerativas e essa proliferação pode contribuir para o crescimento do intestino médio. A habilidade de proliferação das células regenerativas do intestino médio tem sido reportada em mosquitos como importante para o processo de renovação do epitélio do intestino médio durante a metamorfose (Nishiura e Smouse, 2000; Nishiura et al, 2005, Fernandes et al, 2014). De maneira semelhante ao que foi visto para em *L. longipalpis* e *P. papatasi*, em *A. aegypti* a proliferação de células regenerativas iniciou-se logo após a última ecdise larval-larval (L4) e continuou no estágio pupal (Nishiura et al, 2003; Fernandes et al, 2014).

Durante a histólise do epitélio do intestino médio na metamorfose em *D. Melanogaster*, a ocorrência de apoptose e autofagia foi verificada. Os dois tipos de morte celular compartilharam propriedades bioquímicas comuns. Mesmo quando o intestino médio exibiu características morfológicas de morte celular autofágica, componentes da maquinaria de morte celular apoptótica foram detectados nesta espécie (Lee et al, 2002). Entretanto, segundo Denton et al. (2009) a autofagia, e não

apoptose, é essencial para o processo de morte celular no intestino de *D. melanogaster* durante a metamorfose. Neste caso, a via de ativação apoptótica por caspases não é requerida para o processo de morte celular no intestino médio durante a metamorfose neste inseto. Já a degeneração de células digestivas durante a metamorfose do intestino médio em *A. aegypti*, tem sido descrita como um processo de morte celular programada dependente de caspases (Parthasarathy et al, 2007). A presença de numerosos vacúolos autofágicos nas células epiteliais, em *L. longipalpis* e *P. papatasi*, principalmente na transição larva-pupa, nos permite sugerir que em flebotomíneos o processo degenerativo ocorre por autofagia levando à morte das células digestivas larvais. A presença de marcações positivas tanto para LC-3 como para caspase-3 a partir da fase de pré-pupa, em *L. longipalpis* e *P. papatasi* sugere que ambas, autofagia e apoptose ocorrem durante a degeneração do epitélio na transição larva-pupa, embora características morfológicas de apoptose não tenham sido vistas. Semelhante ao observado em *Bombyx mori* (Lepidóptera) (Franzetti et al, 2012), em que autofagia inicia no quinto instar larval e se intensifica na pré-pupa, enquanto que a apoptose ocorre a partir de pré-pupa. Nesse caso, apoptose foi responsável pela remoção de células do intestino médio larva, enquanto a autofagia auxilia na reciclagem de nutrientes durante o período em que o inseto não se alimenta. Desta forma, é possível propor que a histólise de tecido larval em *L. longipalpis* e *P. papatasi*, diferente de *A. aegypti* (Fernandes et al, 2014), seria por morte celular com autofagia e não morte celular por apoptose.

Figura 1 – Secções histológicas (A e B) coradas com HE e MET (C-E) do intestino médio de larvas de *L. longipalpis* ao 3º dia do 4º instar larval.

A – Secção histológica do epitélio (Ep) constituído por células digestivas com núcleo (n) central, borda em escova (b) desenvolvida. O lúmen (L) é preenchido com bolo alimentar envolto pela matriz peritrófica (MP). Lb - lâmina basal; nu - nucléolo. Barra = 20µm.

B – Epitélio (Ep) com as células digestivas, com núcleo central e células regenerativas (cr) na base do epitélio. Camada muscular (cm). Barra = 20µm.

C – Região basal de uma célula digestiva mostrando labirintos (la) próximos à lamina basal (Lb) e associados às mitocôndrias (m). Observe camada muscular circular interna (mc) e longitudinal externa (ml). Barra = 1µm.

D – Região perinuclear de três células digestivas, núcleo (n) com cromatina descondensada e nucléolo (nu) evidente, presença de numerosas mitocôndrias (m) e vacúolo autofágico (au). As células são unidas por junções septadas (setas) na região apical. Barra = 2µm.

E – Célula regenerativa (cr) na base do epitélio digestivo. O núcleo (n) da célula regenerativa ocupa quase todo citoplasma com poucas organelas. Próximo à lamina basal (Lb) é possível visualizar invaginações curtas da membrana plasmática basal, formando um labirinto basal (la) e (setas). Barra = 1µm.

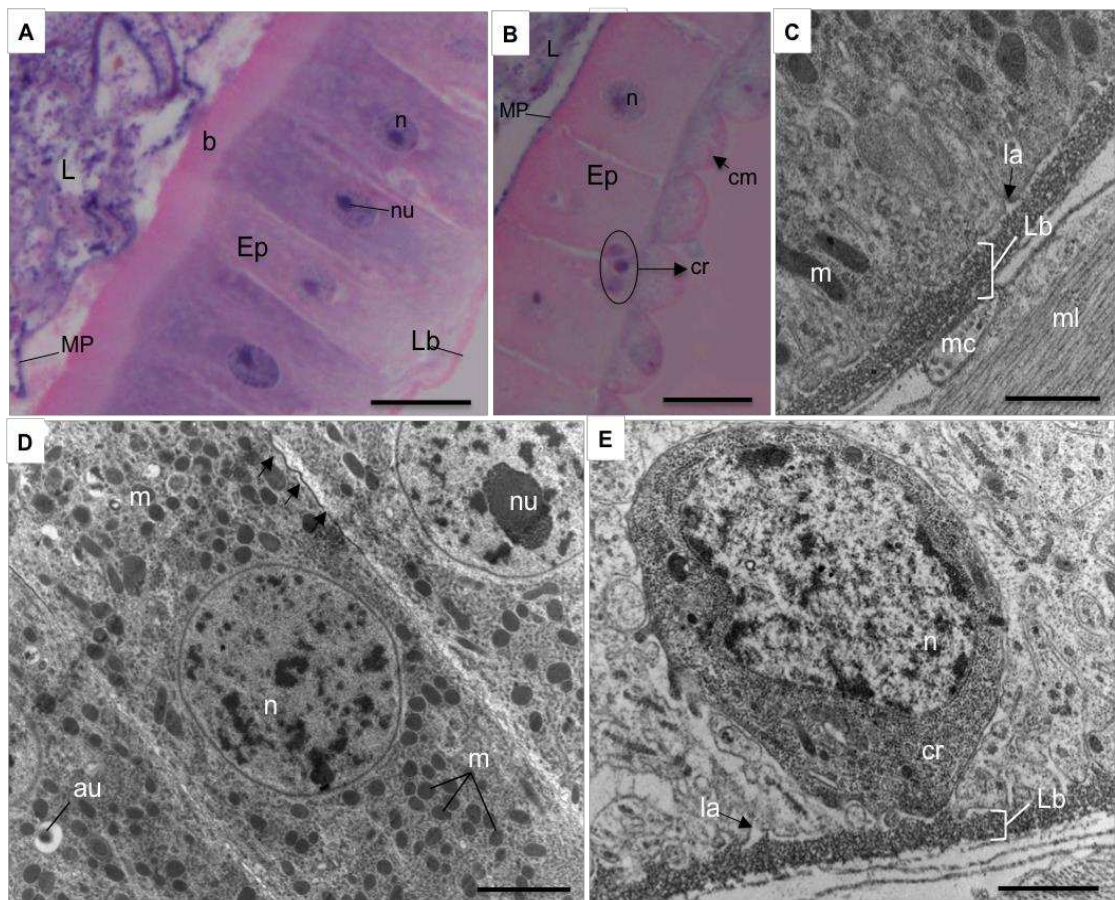


Figura 2 - Secção histológica (A) corada com HE e MET (B-D) do intestino médio de larvas de *P. papatasi* ao 3º dia do 4º instar larval.

A – Epitélio (Ep) com as células digestivas colunares com núcleos centrais (n). Observe protrusão apical do citoplasma da célula digestiva (*) em direção ao lúmen. Presença de uma matriz peritrófica (MP) separando o conteúdo luminal (L) do epitélio. Barra = 20µm.

B – Porção apical (*) da célula digestiva sendo ejetada para o lúmen. mv-microvilosidades. Note o citoplasma é repleto de vacúolos (v). A porção mediana-basal da célula ainda encontra-se aderida às células adjacentes por junções septadas lisas (setas). Barra = 5µm.

C – Células regenerativas (cr) na região basal do epitélio digestivo, próximas à lamina basal (Lb), uma delas com núcleo central e volumoso (n) e poucas mitocôndrias (m). Barra = 5µm.

D – Porção do citoplasma apical e microvilosidades (mv) de duas células do epitélio digestivo (Ep) e um provável remanescente de uma célula digestiva (delineado em preto). Note o citoplasma intensamente vacuolizado com vacúolos de diferentes tamanhos (v), núcleo (n). Barra = 5µm.

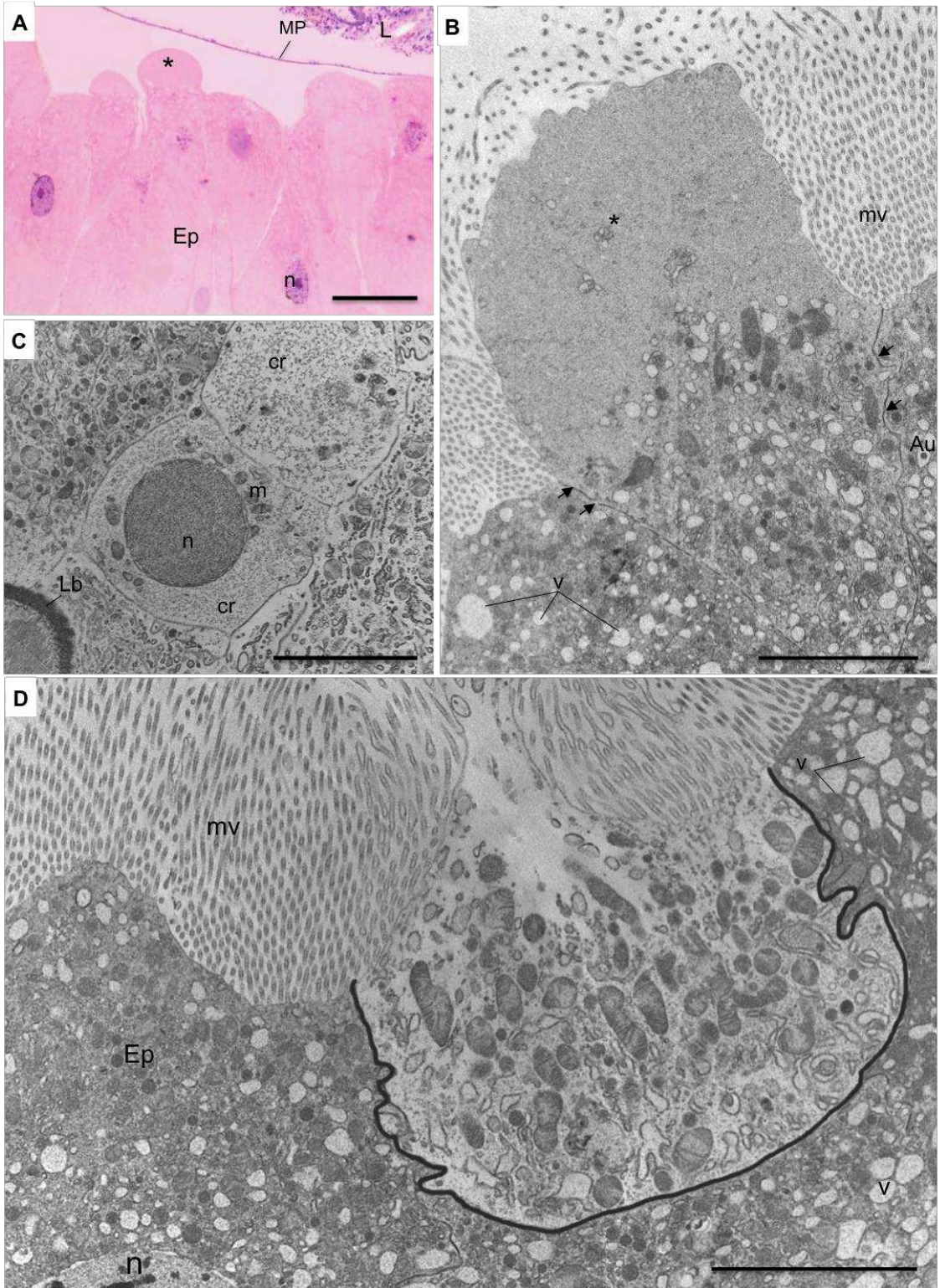


Figura 3 - Altura (média \pm erro padrão) (μm) das células do epitélio do intestino médio de *L. longipalpis* e *P. papatasi*. Asteriscos indicam diferença estatística significativa na mesma fase entre espécies diferentes pelo teste T e student. (* $P < 0,001$). Letras (minúsculas e maiúsculas) diferentes indicam diferença estatística significativa entre as fases do desenvolvimento na mesma espécie (ANOVA/Tukey) ($P < 0,001$).

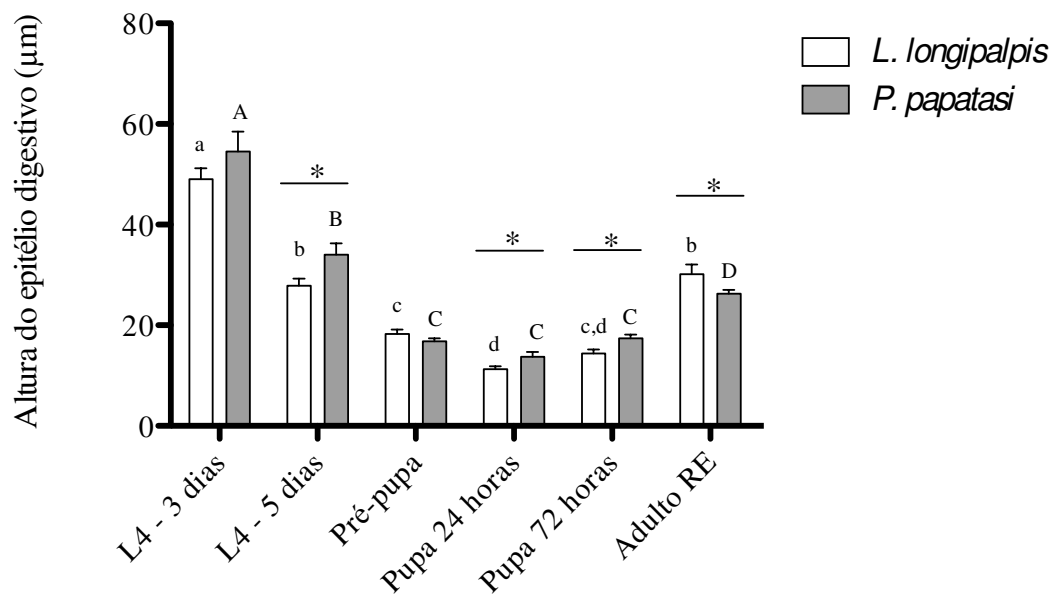


Figura 4 – Secções histológicas (A e B) e MET (C e D) do intestino médio de larvas de *L. longipalpis* e *P. papatasi* ao 5º dia do 4º instar larval.

A – Epitélio intestinal (Ep) de *L. longipalpis* com as células digestivas com núcleo central e nucléolo evidente e borda em escova (b). Lúmen (L). Coloração: HE. Barra = 10µm.

B – Epitélio intestinal (Ep) de *P. papatasi* com as células digestivas com citoplasma intensamente vacuolizado e núcleo (n) central. Ao mesmo tempo, observa-se células regenerativas individuais (setas) na base do epitélio. Coloração: HE+Azul de Toluidina. Barra = 20µm.

C – Porção do citoplasma e núcleo (n) de uma célula digestiva em *L. longipalpis*. Note a presença de numerosos vacúolos, sendo alguns vacúolos autofágicos (Au) com material em seu interior. Barra = 5µm.

D – Porções citoplasmáticas de duas células digestivas de *P. papatasi*, evidenciando parte dos núcleos (n) com predominância de cromatina descondensada, RER desenvolvido, e alguns vacúolos autofágicos (Au). Barra = 1µm.

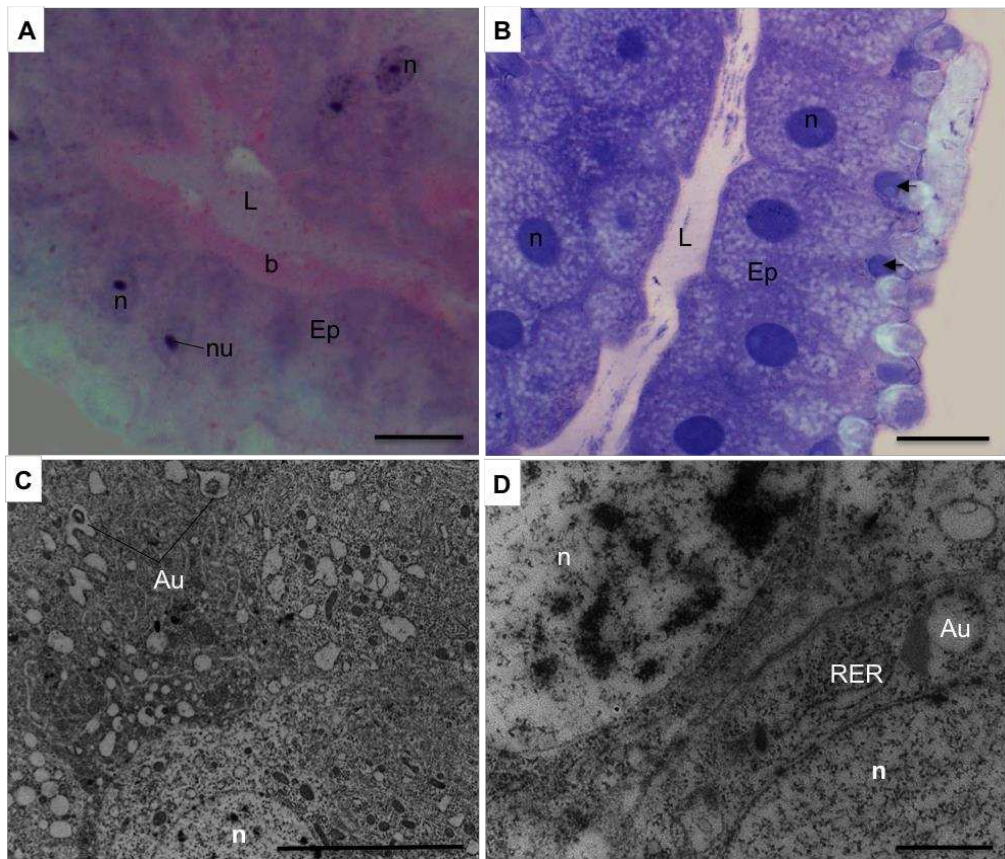


Figura 5 – Secções histológicas (A e B) e MET (C-F) do intestino médio de pré-pupas de *L. longipalpis* e *P. papatasi*.

A – Células colunares do epitélio digestivo (Ep) de *L. longipalpis*, com núcleos centrais (n) e nucléolo evidente. Na base do epitélio, note as células regenerativas (setas). L- lúmen. Coloração: HE. Barra = 10µm.

B – Epitélio intestinal (Ep) *P. papatasi* com células baixas e desorganizadas. O lúmen (L) está preenchido com material intensamente corado. Coloração: HE+Azul de Toluidina. Barra = 10µm.

C – Células em diferenciação em pré-pupa de *L. longipalpis* com núcleo (n) volumoso e citoplasma com poucas organelas e microvilosidades (mv) em formação. gl- gotículas lipídicas. Barra = 2µm.

D – Célula em diferenciação em *P. papatasi* com poucas microvilosidades (mv) e apoiada em uma lamina basal (Lb). N- núcleo com cromatina descondensada. Barra = 5µm.

E – Porção do citoplasma e núcleo (n) de uma célula digestiva em *P. papatasi* com numerosos vacúolos autofágicos (Au). M- mitocôndrias; RER- retículo endoplasmático rugoso. Barra = 2µm.

F – Células regenerativas em pré-pupa de *P. papatasi*. Estas células são elétronalucentes em relação às células digestivas com citoplasma pobre em organelas e núcleo (n) ocupando boa parte da célula. Au- vacúolos autofágicos; cd- célula digestiva; Lb- lâmina basal. Barra = 5µm.

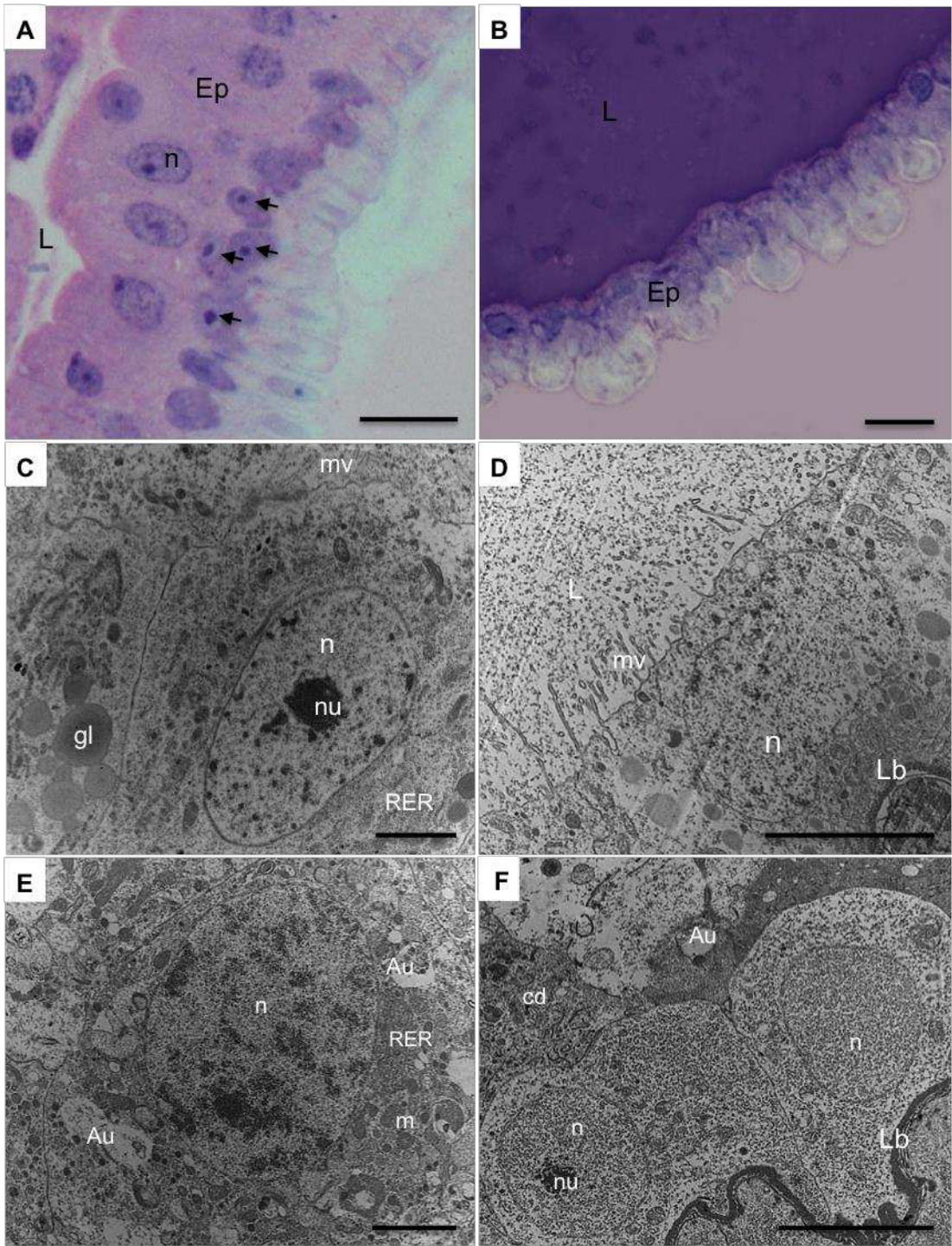


Figura 6 - Secção do intestino médio (A) e MET (B e C) de pupas 24 horas de *L. longipalpis* e *P. papatasi*.

A – Epitélio intestinal (Ep) em *L. longipalpis* com células baixas. L- lúmen; n- núcleo. Coloração: HE+Azul de Toluidina. Barra = 10 µm.

B – Epitélio (Ep) com células baixas e desorganizadas em *P. papatasi*. L- lúmen. Coloração: HE+Azul de Toluidina. Barra = 10 µm.

C – Célula em diferenciação em *L. longipalpis* com numerosas mitocôndrias (m) e microvilosidades em formação (mv). n - núcleo com cromatina descondensada (n) e nucléolo aparente (nu). Barra = 1µm.

D – Célula em diferenciação em *L. longipalpis*, com núcleo (n) com predominância de cromatina descondensada e nucléolo (nu) evidente. O lúmen (L) preenchido com material elétron-denso. Lb- lâmina basal; cm- camada muscular. Barra = 2µm.

E – Célula recém-diferenciada em *P. papatasi* com poucas e curtas microvilosidades (mv). Lúmen (L) elétron-denso, preenchido com remanescentes do epitélio larval ejetado. Núcleo (n) com cromatina descondensada. Na região basal note a lâmina basal (Lb). Barra = 2µm.

F – Porções citoplasmáticas de duas células digestivas adjacentes em *P. papatasi*. Na região apical observa-se microvilosidades curtas (mv). No citoplasma o RER é pouco desenvolvido e é possível notar poucas mitocôndrias (m). As células são unidas por junções septadas principalmente na parte apical (setas brancas). L- lúmen elétron-denso. Barra = 1µm.

G – Porção do citoplasma de uma célula epitelial em diferenciação em *P. papatasi*. Note a presença corpos multilamelares (ml) e algumas mitocôndrias (m). Barra = 1µm.

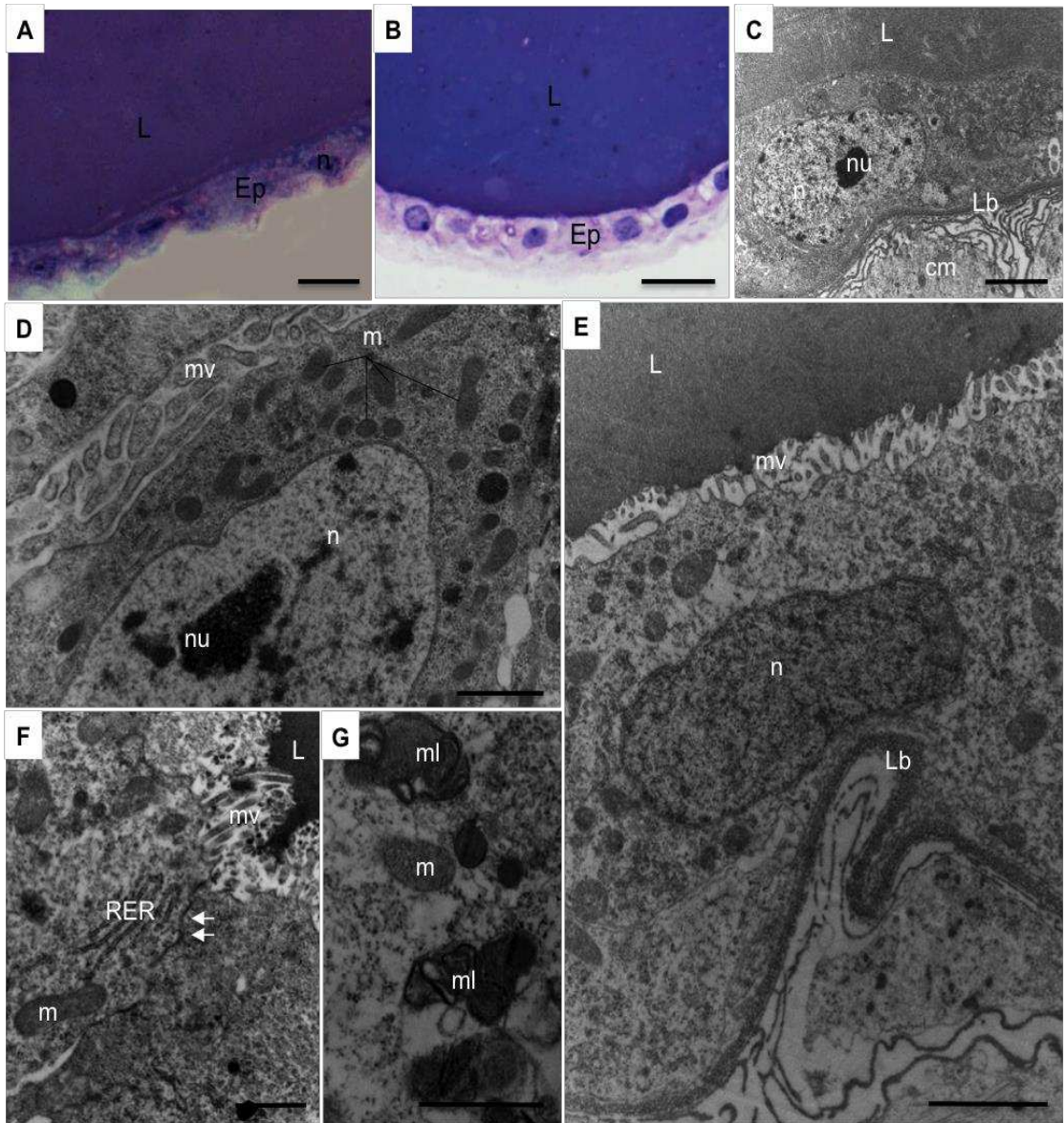


Figura 7 – Secções do intestino médio coradas com HE (A e B) e MET (C-E) de pupas 72 horas de *L. longipalpis* e *P. papatasi*.

A – Epitélio intestinal (Ep) de *L. longipalpis* com células baixas. L- lúmen fortemente corado. Barra = 10 µm.

B – Epitélio (Ep) de *P. papatasi* com células achatadas. L- lúmen fortemente corado. Barra = 10 µm.

C – Três células regenerativas na base do epitélio de *L. longipalpis*. L- lamina basal. Barra = 1µm.

D – Porção do citoplasma de uma célula digestiva (cd) de *P. papatasi*. n- núcleo com cromatina descondensada; mv- microvilosidades curtas e desorganizadas. Célula em diferenciação com acúmulo de mitocôndrias (setas) na região apical. Lb- lâmina basal. Barra = 1µm.

E – Epitélio (Ep) em reconstrução em *L. longipalpis* com células baixas e achatadas. L- lúmen elétron-denso; Lb- lâmina basal. Barra = 5µm.

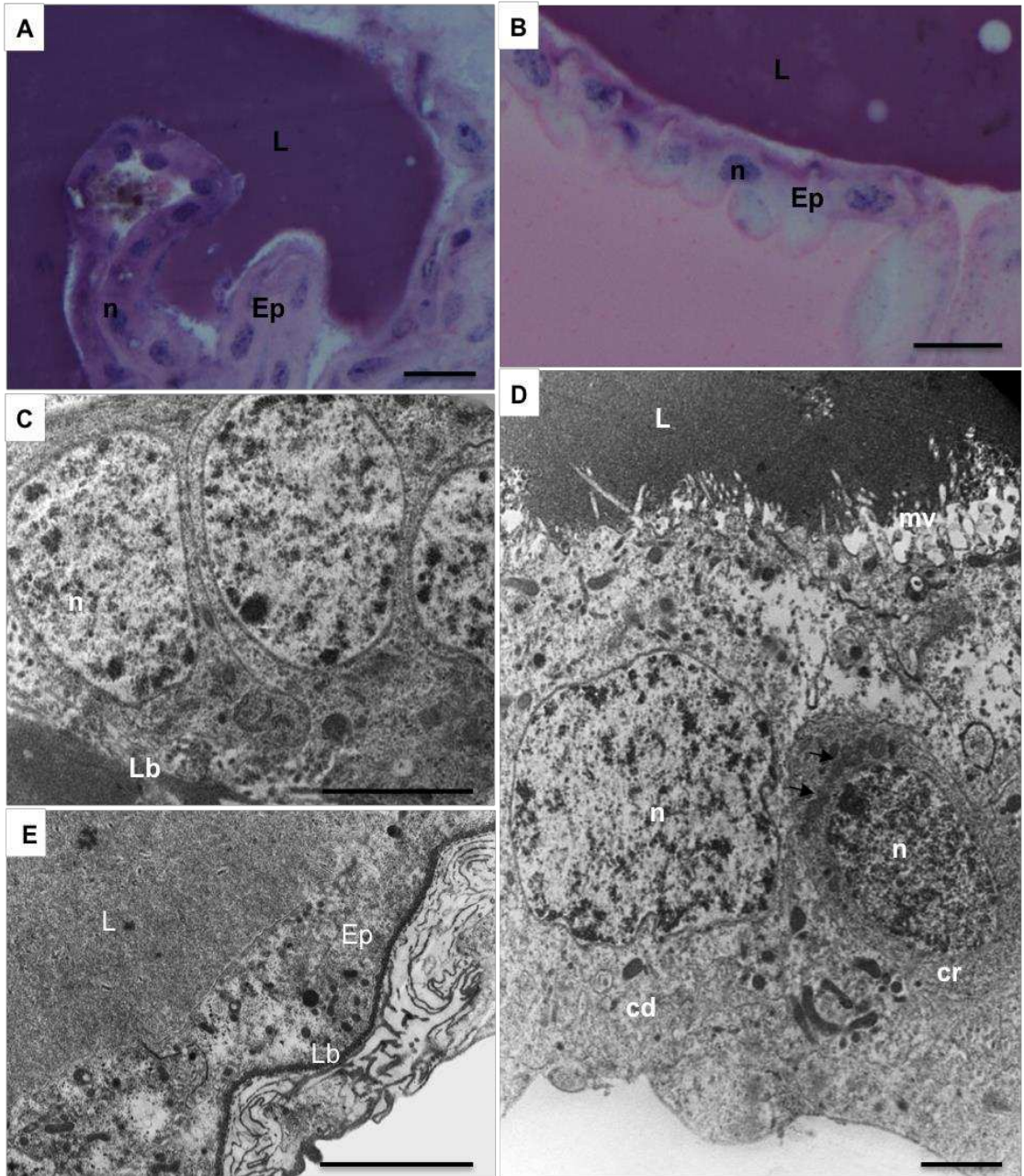


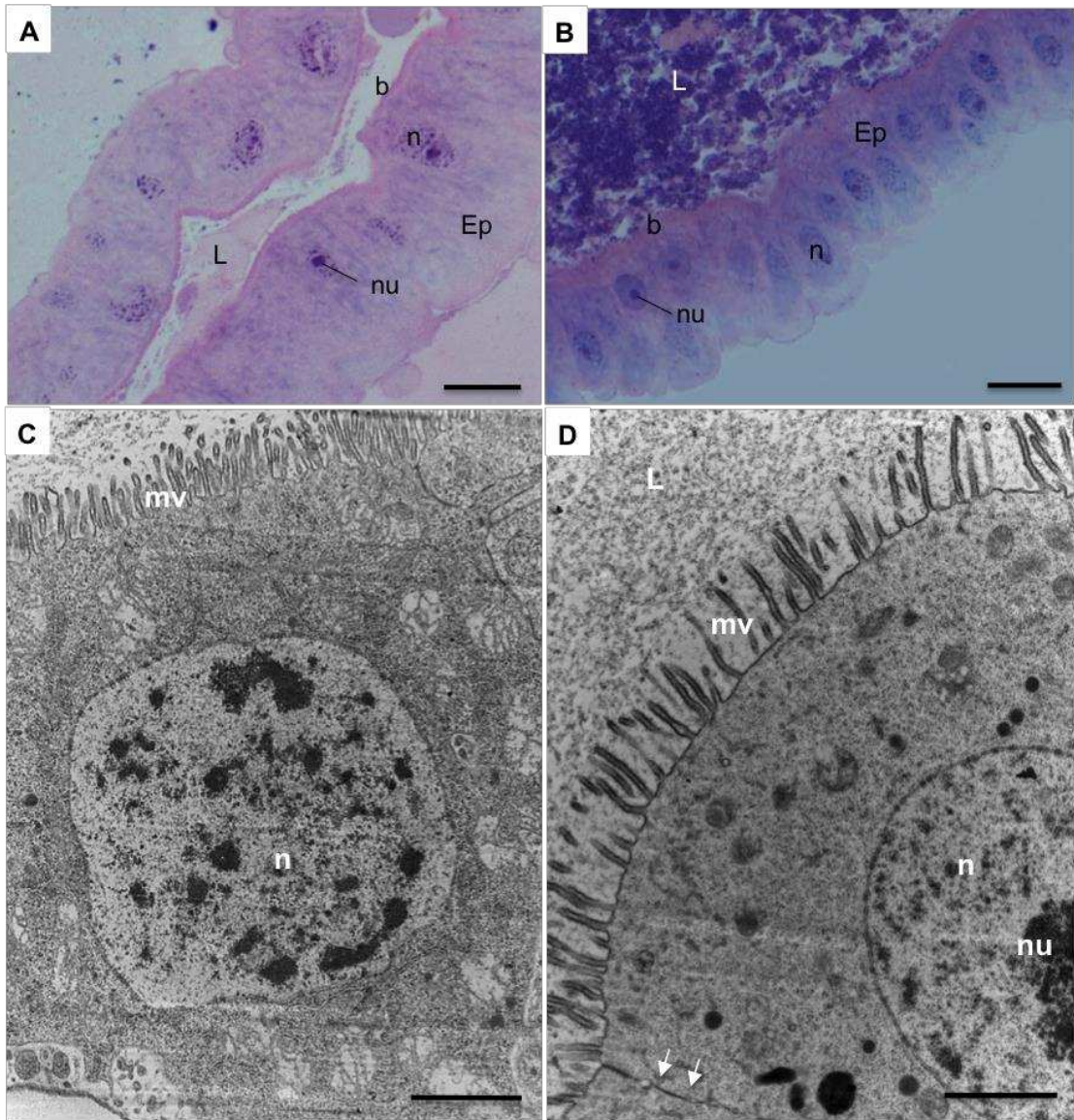
Figura 08 – Secções histológicas (A e B) coradas com HE e MET (C e D) do intestino médio de adultos recém-emergidos de *L. longipalpis* e *P. papatasi*.

A – Epitélio (Ep) com células digestivas colunares, com núcleo central (n) e borda em escova (b). L- lúmen. Barra = 10 µm.

B – Epitélio (Ep) intestinal de *P. papatasi* com as células digestivas colunares, com núcleo central (n) e borda em escova (b) na região apical. Barra = 10µm.

C – Célula digestiva de *L. longipalpis* com núcleo (n) central e cromatina descondensada. Na região apical esta célula apresenta microvilosidades (mv) organizadas paralelamente. Barra = 2µm.

D – Porção apical de uma célula digestiva em *P. papatasi* com núcleo central (n) e com nucléolo (nu) evidente. Note as microvilosidades organizadas paralelamente (mv) na região apical. Células adjacentes são unidas por junções septadas (setas brancas). Barra = 2µm.



n

Figura 09 – Imunofluorescência para anti-caspase-3-FITC (verde) no intestino médio de *L. longipalpis* (A e B) e *P. papatasi* (C, D e E). Marcações positivas em *L. longipalpis*: pré-pupa (A) e pupa 72 h (B) e em *P. papatasi*: pré-pupa (C), pupa 24 h (D) e pupa 72 h (E). Controle negativo (F) intestino médio de pupa 24 h de *L. longipalpis*.

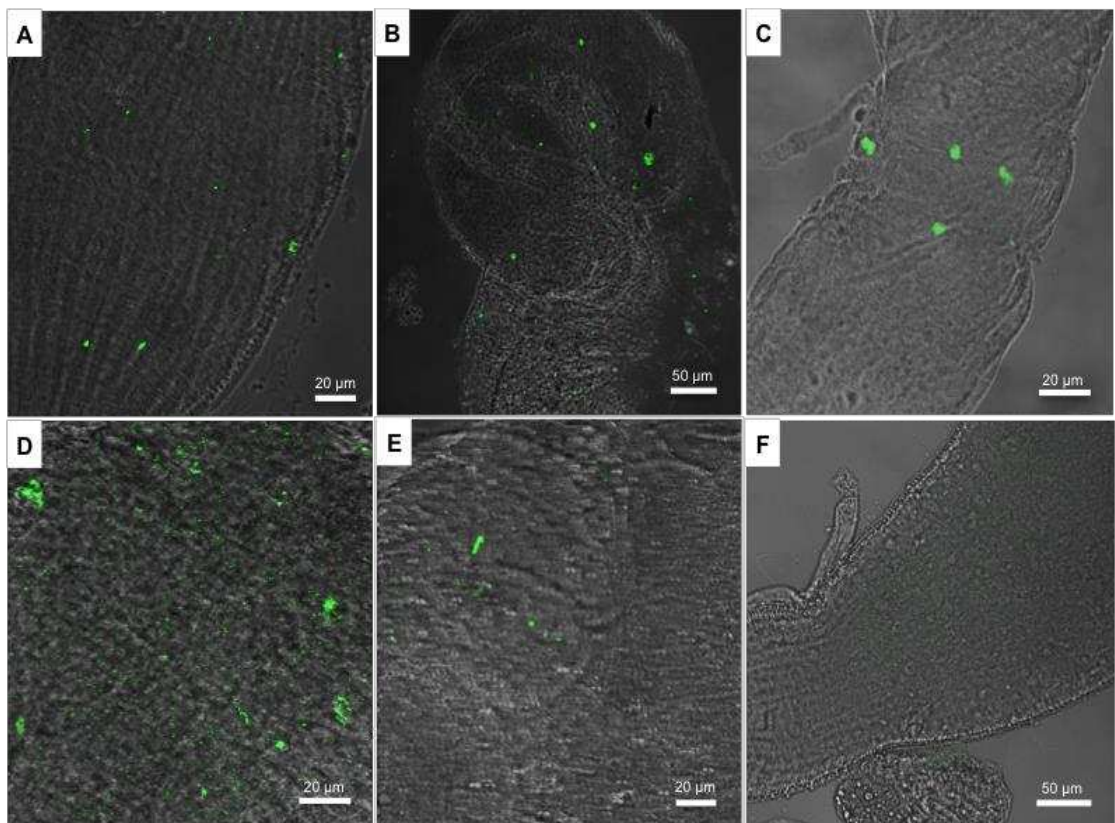


Figura 10 – Imunofluorescência dos intestinos médios de *L. longipalpis* para anti-Fosfohistona H3. Montagem dos intestinos observados sob microscópio de epifluorescência, os núcleos foram marcados com DAPI (azul) (A, C, E e G). Marcações positivas para anti-Fosfohistona H3-FITC (verde), sob microscópio confocal a laser (B, D, F e H), em L4-5 dias (A e B); pré-pupa (C e D); Pupa 24 h (E e F) e Pupa 72 h (G e H).

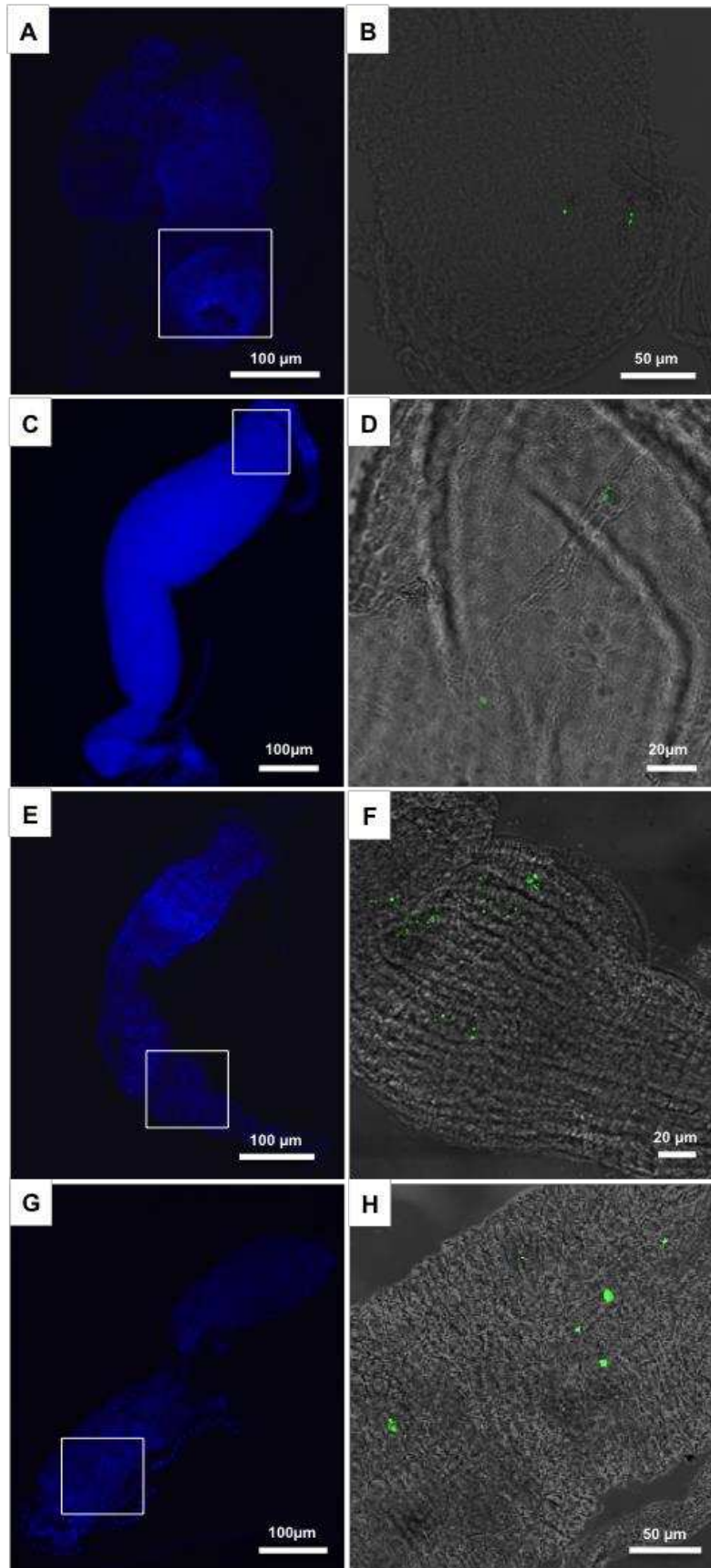


Figura 11 – Imunofluorescência do intestino médio de *P. papatasi*. Montagem dos intestinos observados sob microscópio de epifluorescência com os núcleos marcados com DAPI (azul) (A, C, E e G) e marcações positivas para anti-Fosfohistona H3-FITC (verde), sob microscópio confocal a laser (B, D, F e H), em L4-5 dias (A e B); pré-pupa (C e D); Pupa 24 h (E e F) e Pupa 72 h (G e H).

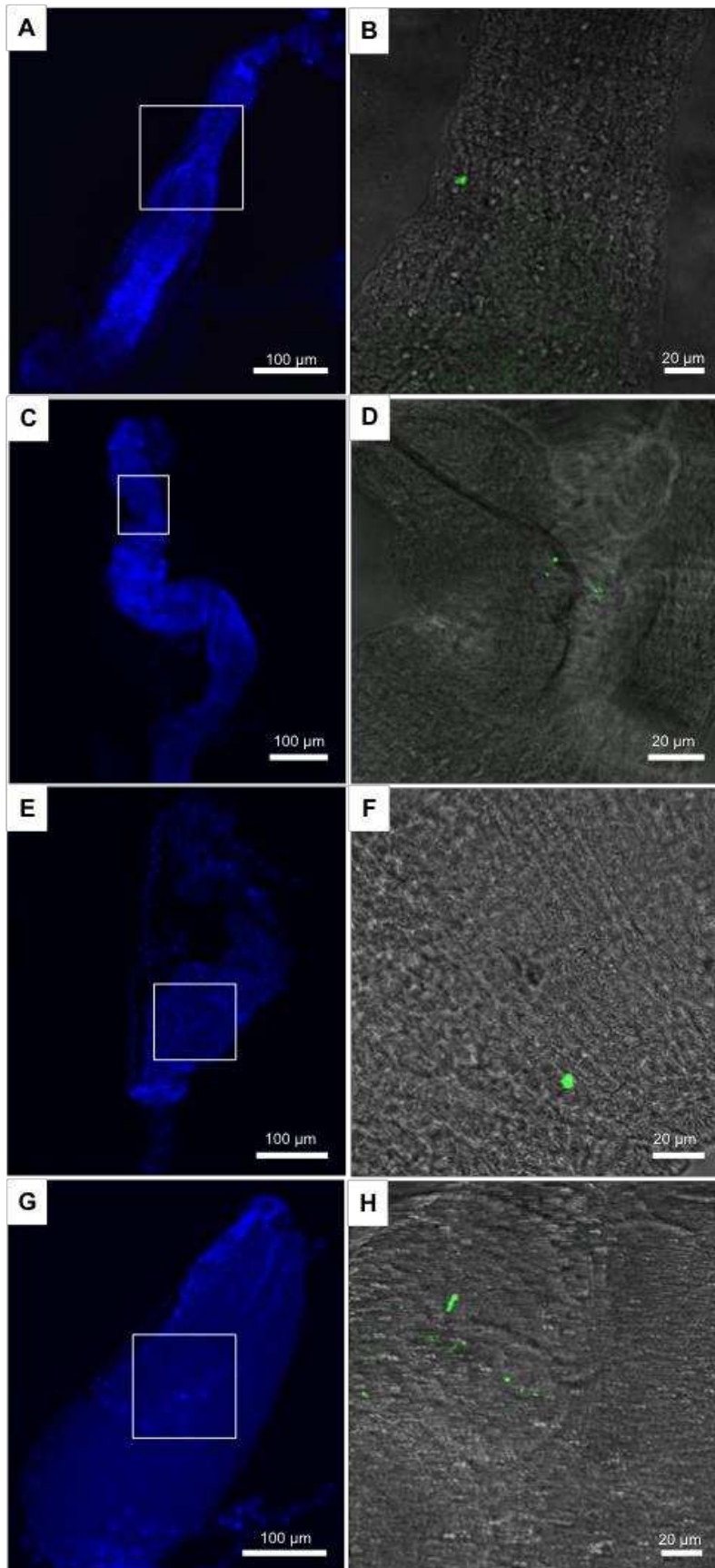
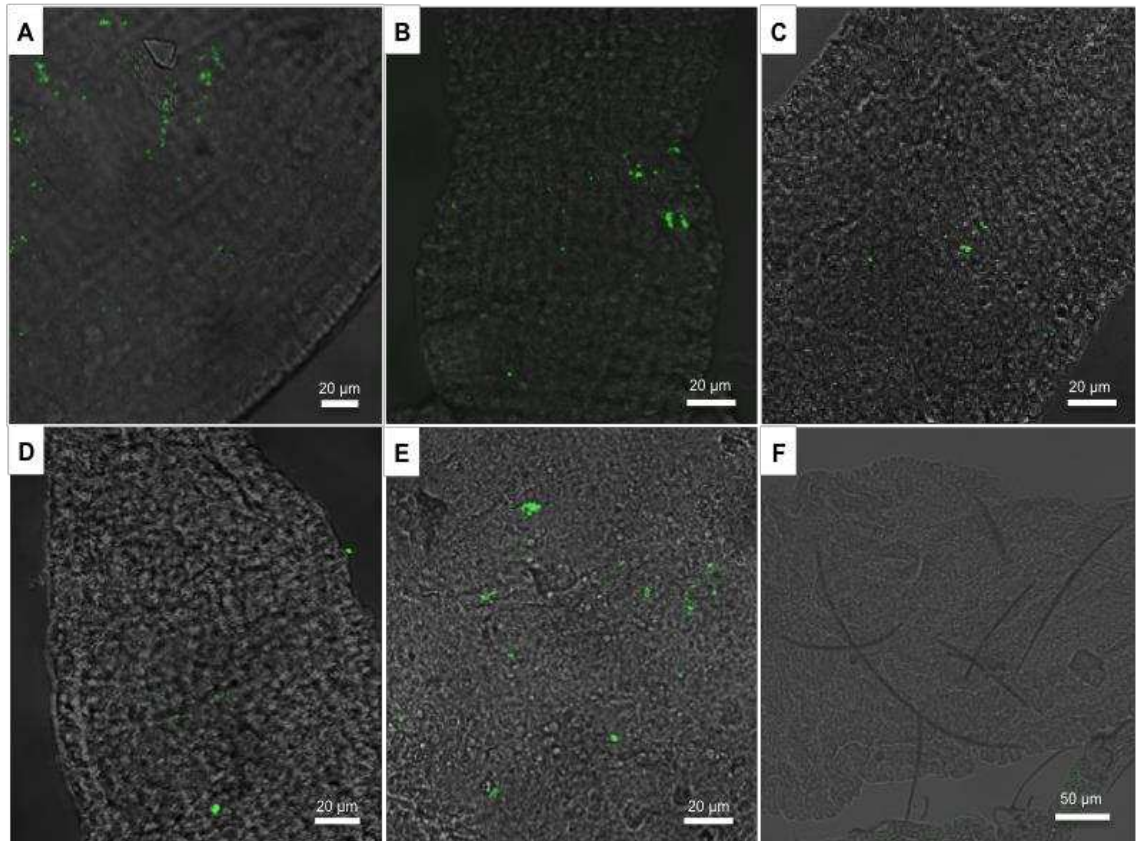


Figura 12 – Imunofluorescência para anti-LC3/AB-FITC (verde) no intestino médio de *L. longipalpis* (A, B e C) e *P. papatasi* (D e E). Marcações positivas em *L. longipalpis*: pré-pupa (A), pupa 24 h (B) e pupa 72 h (C) e em *P. papatasi*: pupa 24 h (D) e pupa 72 h (E). Controle negativo (F) do intestino médio de pupa 72 h de *L. longipalpis*.



5 - Referências bibliográficas

- Andrade-Coêlho, C. A., Santos-Mallet, J., Souza, N. A., Lins, U., Meirelles, M. N. L., & Rangel, E. F. (2001). Ultrastructural features of the midgut epithelium of females *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (8), 1141-1151.
- Baldwin, K. M., & Hakim, R. S. (1991). Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molting in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue and Cell*, 23 (3), 411-422.
- Billingsley, P. F., & Lehane, M. J. (1996). Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: *Biology of the insect midgut*. Chapman and Hall, London. Springer Netherlands. 3-25
- Brown, M. R., Raikhel, A. S., & Lea, A. O. (1985). Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. *Tissue and Cell*, 17 (5), 709-721.
- Chapman, R.F. (2013). *The insects structure and function*. Cambridge University Press.
- Cruz-Landim, C., & Cavalcante, V. M. (2003). Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Science*, 20 (9), 1099-1107.
- Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. (2009). Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, 19 (20), 1741-1746.
- do Vale, V. F., Pereira, M. H., & Gontijo, N. F. (2007). Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Insect Physiology*, 53 (11), 1151-1159.
- Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. (2014). *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, 63 (3), 506-512.
- Franzetti, E., Huang, Z. J., Shi, Y. X., Xie, K., Deng, X. J., Li, J. P., Li, Q. R., Yang, W., Zeng, W., Casartelli, M., Deng, H., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q., Tettamanti, G., Cao, Y., & Feng, Q. (2012). Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, 17 (3), 305-324.
- Gemetchu, T. (1974). The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin

(Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 68 (1), 111-128.

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

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, 55, 593-608.

Heerman, M., Weng, J. L., Hurwitz, I., Durvasula, R., & Ramalho-Ortigao, M. (2015). Bacterial infection and immune responses in *Lutzomyia longipalpis* sand fly larvae midgut. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9 (7), e0003923.

Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Barillas-Mury, C., Sacks, D. L., & Valenzuela, J. G., & Valenzuela, J. G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119 (3), 329-341.

Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17 (3), 279-289.

Lainson, R., & Rangel, E. F. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (8), 811-827.

Lee, C. Y., Cooksey, B. A., & Baehrecke, E. H. (2002). Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. *Developmental Biology*, 250 (1), 101-111.

Lutz, A., & Neiva, A. (1912). Contribution to our knowledge of the species of the genus *Phlebotomus* found in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 4 (1), 84-95.

Malta, J., Martins, G. F., Weng, J. L., Fernandes, K. M., Munford, M. L., & Ramalho-Ortigão, M. (2016). Effects of specific antisera targeting peritrophic matrix-associated proteins in the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Acta Tropica*, 159, 161-169.

Martins, G. F., Neves, C. A., Campos, L. A. O., & Serrão, J. E. (2006). The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron*, 37 (2), 161-168.

Neves, C. A., De Brito Gitirana, L., & Serrao, J. E. (2003). Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology*, 41 (2), 443-459.

- Neves, C. A., Gitirana, L. B., & Serrao, J. E. (2003). Ultrastructure of the midgut endocrine cells in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Brazilian Journal of Biology*, 63 (4), 683-690.
- Nishiura, J. T., & Smouse, D. (2000). Nuclear and cytoplasmic changes in the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) alimentary canal during metamorphosis and their relationship to programmed cell death. *Annals of the Entomological Society of America*, 93 (2), 282-290.
- Nishiura, J. T., Ho, P., & Ray, K. (2003). Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*, 40 (4), 498-507.
- Nishiura, J. T., Ray, K., & Murray, J. (2005). Expression of nuclear receptor-transcription factor genes during *Aedes aegypti* midgut metamorphosis and the effect of methoprene on expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (6), 561-573.
- Okuda, K., de Almeida, F., Mortara, R. A., Krieger, H., Marinotti, O., & Bijovsky, A. T. (2007). Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Insect Physiology*, 53 (12), 1307-1315.
- Parthasarathy, R., & Palli, S. R. (2007). Stage-and cell-specific expression of ecdysone receptors and ecdysone-induced transcription factors during midgut remodeling in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 53 (3), 216-229.
- Rangel, E. F., & Lainson, R. 2003. Ecologia das leishmanioses. In: Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. (pp. 291-311).
- Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y., & Nishiura, J. T. (2009). Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *Journal of Insect Science*, 9 (55), 1-13
- Riddiford, L. M., & Truman, J. W. (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *American Zoologist*, 33 (3), 340-347.
- Rost-Roszkowska, M. M., Vilimova, J., & Chajec, L. (2010). Fine structure of the midgut epithelium in *Atelura formicaria* (Hexapoda, Zygentoma, Ateluridae), with special reference to its regeneration and degeneration. *Zoological Studies*, 49 (1), 10-18.
- Rudin, W., & Hecker, H. (1982). Functional morphology of the midgut of a sandfly as compared to other hematophagous nematocera. *Tissue and Cell*, 14 (4), 751-758.
- Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Reviews in Microbiology*, 55 (1), 453-483.

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

Secundino, N. F. C., Eger-Mangrich, I., Braga, E. M., Santoro, M. M., & Pimenta P. F. P. 2005. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *Journal of Medical Entomology*. 42 (6), 928-938.

Sherlock, Í, A. (2003). A importância dos flebotomíneos. In: Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro. FIOCRUZ. (pp. 337-351).

Terra, W.R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 109 (1), 1-62.

Tettamanti, G., Grimaldi, A., Casartelli, M., Ambrosetti, E., Ponti, B., Congiu, T., Ferrarese, R., Rivas-Pena, M. L., Pennacchio, F., & De Eguileor, M. (2007). Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during pré-pupal instar. *Cell and Tissue Research*, 330 (2), 345-359.

Uwo, M. F., Ui-Tei, K., Park, P., & Takeda, M. (2002). Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. *Cell and Tissue Research*, 308 (2), 319-331.

Volf, P., & Peckova, J. (2007). Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology*, 23 (3), 91-92.

Wigglesworth, V. B. (1972). Digestion and nutrition. In: The Principles of Insect Physiology. Springer Netherlands. (pp. 476-552).

WHO - World Health Organization. (2015). Leishmaniasis: strengthening cross-border collaboration for control in Central Asian and Middle Eastern countries of the WHO European and Eastern Mediterranean Regions: report of a bi-regional meeting, Awaza, Turkmenbashi, Turkmenistan, (pp. 18–20).

Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H., & Palli, S. R. (2006). Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mechanisms of Development*, 123 (7), 530-547.

Young, D. G., & Duran, M. A. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*. 54

7 – Considerações finais

A alimentação de fêmeas de *P. papatasi* com células sanguíneas reconstituídas com anti-soros específicos para as proteínas associadas a MP PpChit1 e PpPer2 afetaram a cinética de maturação da MP. O atraso na degradação da MP ao final da digestão, verificado pela espessura da MP, bem como, pelo conteúdo de quitina no intestino médio 72 h após a alimentação com anti-PpChit1, pode estar relacionado a falta de modulação das fibrilas de quitina pela enzima, o que sugere que PpChit1 atua na quebra da MP em *P. papatasi*.

Os efeitos da injeção de 85ng de dsPpChit1 em *P. papatasi* levou a redução de transcritos para PpChit1 em todos os horários analisados, sendo que em 48 e 96 horas após a alimentação, essa redução foi maior, 57% e 49%, respectivamente. Embora não tenhamos realizado uma análise fenotípica da MP após o silenciamento de PpChit1, nossos resultados podem contribuir para aumentar a compreensão do papel de PpChit1 em *P. papatasi*.

O remodelamento do intestino médio de *L. longipalpis* e *P. papatasi* inicia no quarto instar larval. Entretanto, em *P. papatasi* a degeneração do epitélio parece iniciar um pouco mais cedo, no terceiro dia do quarto instar larval (L4-3), enquanto em *L. longipalpis*, no quinto dia do quarto instar larval (L4-5). Embora as características morfológicas do processo de morte celular tenham sido semelhantes em ambos, essa diferença no início da histólise, pode estar relacionada a diferenças na expressão de genes reguladores do processo. A presença de numerosos vacúolos autofágicos nas células digestivas larvais, bem como marcações positivas para LC3, sugere que em ambas espécies, o processo de morte celular das células epiteliais se dá por autofagia. Entretanto, a detecção de atividade de caspase-3 por imunofluorescência pode indicar que ambas autofagia e apoptose atuam em conjunto na morte células digestivas larvais.

Além das células digestivas, células regenerativas foram vistas na base do epitélio intestinal isoladas ou em pequenos grupos, durante a metamorfose nas duas espécies. Da mesma maneira, células em mitose, positivas para histona fosforilada H3 foram detectadas, sugerindo que as células regenerativas se dividem durante o desenvolvimento do intestino. De acordo com as características morfológicas

observadas durante o processo de remodelamento do intestino médio durante a metamorfose é conservado nas duas espécies.

No presente trabalho, mostramos resultados relevantes sobre aspectos do papel de proteínas associadas à MP, no processo de formação e degradação da mesma. Além disso, apresentamos pela primeira vez o processo de remodelamento do intestino médio de duas importantes espécies vetoras de leishmaniose. Considerando que o intestino médio tem papel fundamental na competência vetorial na transmissão de *Leishmania* por flebotomíneos, nossos resultados auxiliam aumentando nosso conhecimento acerca da biologia do vetor.