

## CAPÍTULO 5

1

### Digestão em Insetos.

---

**Carlos Peres Silva<sup>1</sup>, Francisco José Alves Lemos<sup>2</sup>, José Roberto da Silva<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório Integrado de Bioquímica Hatisaburo Masuda, Núcleo de Pesquisas em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 27930-560, Macaé, RJ, Brazil.

Copyright: © 2012 [Carlos Peres Silva, Francisco José Alves Lemos, José Roberto da Silva]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

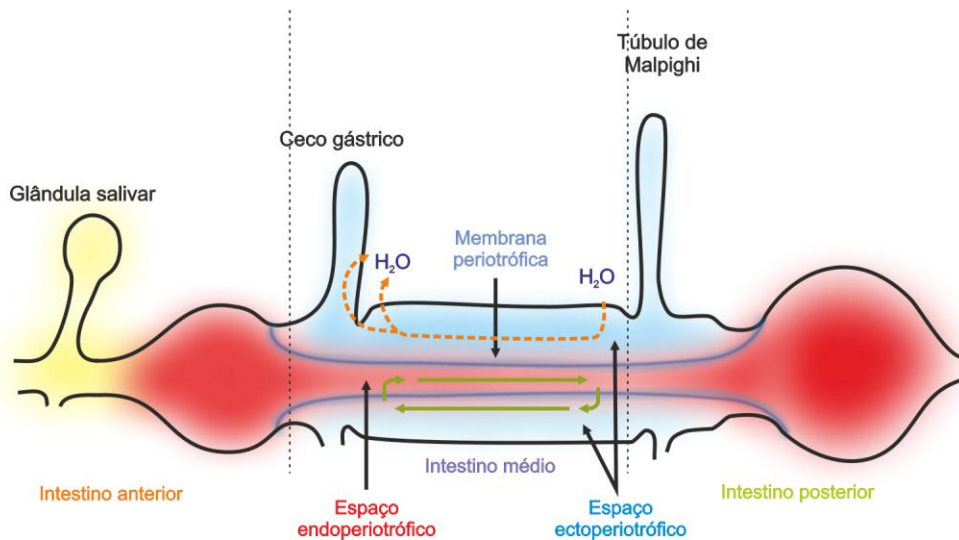
## Considerações Iniciais

2

O maior desenvolvimento de meios de controle biorracionais (meios de controle baseados na biologia dos insetos) está a requerer um melhor conhecimento do sistema digestório dos insetos, uma vez que a tecnologia de transferência de genes entre diferentes organismos já se encontra bem avançada, porém, o conhecimento de alvos para serem explorados é reduzido. Provavelmente por causa disto, as duas últimas décadas mostraram um desenvolvimento das pesquisas em digestão de insetos sem paralelo com as décadas anteriores. Isto pode ser explicado pelo fato de que as funções digestivas em insetos representem um modelo riquíssimo de informações, seja do ponto de vista da fisiologia comparada, uma vez que a classe Insecta possui representantes adaptados a uma multiplicidade enorme de habitats e hábitos alimentares, seja porque o aparelho digestivo represente uma das principais interfaces entre o meio interno do inseto e seu meio ambiente, e que por isto, se torne uma das mais promissoras fontes de alvos para serem explorados em técnicas de controle biorracional. Neste capítulo serão explorados alguns tópicos relacionados à digestão em insetos fitófagos e hematófagos. Em relação aos insetos fitófagos, ênfase será dada à indução de enzimas digestivas frente a inibidores produzidos pelas plantas e a ocorrência de uma estrutura celular única, encontrada em Hemiptera chamada de membrana perimicrovilar.

## Compartimentos Intestinais e Fases da Digestão em Insetos

O principal sítio de digestão e absorção em insetos na maior parte das espécies é o intestino médio. Este se constitui num tubo simples (ventrículo) de onde podem se expandir divertículos (cecos gástricos) usualmente na sua extremidade proximal. Na maior parte dos insetos, o intestino médio contém no seu lúmen uma membrana (também chamada de matriz) quitino protéica (membrana peritrófica) que envolve o alimento ingerido, e que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (dentro da membrana) e o espaço ectoperitrófico (fora da membrana) (Figura 1).



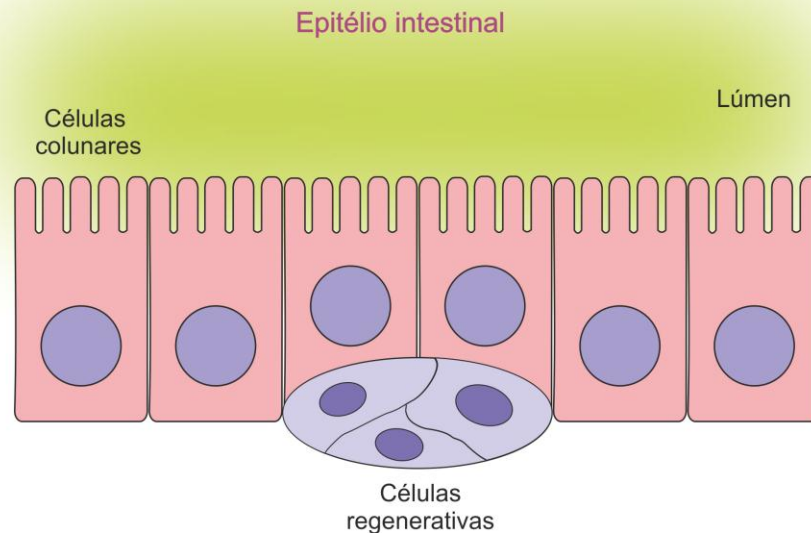
**Figura 1. Representação esquemática do trato intestinal de insetos. Observar os subcompartimentos presentes no intestino médio e o contra-fluxo de água que ocorre no espaço ectoperitrotrófico.**

O epitélio do intestino médio é simples e composto por um tipo principal de célula, usualmente chamada de célula colunar, muito embora elas possam assumir outras formas, células regenerativas, as quais são agrupadas em ninhos na base do epitélio, e células para as quais as funções não são bem conhecidas, mas que são assumidas como endócrinas (Ribeiro e cols., 1990) (Figura 2). As células colunares estão envolvidas na absorção e secreção de água, de enzimas digestivas, digestão através de enzimas associadas às membranas das microvilosidades e absorção de nutrientes (Terra e Ferreira, 1994). Células especializadas encontradas no intestino médio incluem as caliciformes, as quais em larvas de *Lepidoptera* são responsáveis pelo transporte ativo de íons potássio da hemolinfa para o lúmen ventricular (Harvey e cols., 1983), células oxínticas, as quais se supõem bombear prótons para o lúmen ventricular de larvas de *Diptera Cyclorrhapha* (Terra e Ferreira, 1994), e as de *Hemiptera* e *Thysanoptera*, as quais apresentam sistemas de membranas plasmáticas extracelulares, como veremos adiante com mais detalhes.

A maior parte do alimento que requer digestão nos insetos é composta por polímeros, tais como amido, celulose, hemiceluloses e proteínas. O processo digestivo ocorre em três fases: inicial, intermediária e final. Inicialmente, um decréscimo na massa molecular dos polímeros ocorre pela ação de despolimerases, tais como amilases, celulases, hemicelulases e proteinases. Os oligômeros resultantes sofrem hidrólise por oligomerases, exemplificadas por aminopeptidases agindo sobre fragmentos resultantes da hidrólise de proteínas. Os produtos da fase intermediária da digestão são dímeros ou pequenos oligômeros, tais como maltose, celobiose e dipeptídeos, derivados da hidrólise de amido, celulose e proteínas, respectivamente. Na fase final da digestão, os dímeros são clivados a monômeros por dimerases, exemplificadas por maltase, celobiase e dipeptidases.

A primeira tentativa em correlacionar os compartimentos intestinais com as fases da digestão em insetos foi realizada em larvas de *Rhynchosciara americana* (*Diptera*):

Sciaridae) (Terra e cols.,1979). Os resultados mostraram que em larvas de *R. americana*  $\alpha$ -amilase e tripsina estão presentes nas células e nos espaços endo e ectoperitróficos, aminopeptidase e trealase são encontradas nas células e no espaço ectoperitrófico, e que finalmente dissacaridasas (exceto a trealase), dipeptidase e fosfatase estão restritas às células do epitélio intestinal. Isto levou a proposição de que a digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico, e que as fases intermediária e final ocorrem no espaço ectoperitrófico e ao nível das células intestinais, respectivamente. Com bases nesses resultados, os autores propuseram um modelo chamado de Circulação endo-ectoperitrófica para descrever a compartimentação do processo digestivo nessa espécie.



**Figura 2. Representação esquemática dos principais tipos de células encontradas no epitélio intestinal de insetos.**

Utilizando técnicas similares às usadas para *R. americana*, a compartimentação das enzimas digestivas foi estudada em inúmeros insetos. As enzimas envolvidas em digestão inicial são sempre encontradas no espaço endoperitrófico, enquanto aquelas que desempenham papéis nas fases intermediária e final passam para o espaço ectoperitrófico ou são restritas às células intestinais, dependendo da posição filogenética do inseto (revisões em Terra e Ferreira, 1994; 2005).

## Indução de Enzimas Digestivas em Resposta à Ingestão de Inibidores Protéicos de Origem Vegetal

O fenômeno da indução de enzimas digestivas em resposta à ingestão de inibidores protéicos de origem vegetal foi descoberto como consequência dos estudos sobre adaptação de larvas de lepidópteros a plantas transgênicas, que super-expressavam inibidores de proteinases tipo tripsinas (Jongsma e cols.,1995, Broadway, 1996). Apesar do grande impacto dessa descoberta, ainda não se conhecem os detalhes dos mecanismos através dos quais os insetos reconhecem a presença dos inibidores no trato intestinal (revisões em Broadway, 1997, Jongsma e Bolter, 1997). Mais recentemente foi demonstrado que a indução de tripsinas em lepidópteros se dá no nível de transcrição gênica (Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001), o mesmo ocorrendo com a indução de proteinases tipo catepsina B em larvas do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Moon e cols.,2004).

Resultados recentes mostraram que não somente proteinases podem ser induzidas em insetos pragas, mas que  $\alpha$ -amilases também são induzidas no bruquídeo *Zabrotes subfasciatus*, o qual ataca grãos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) entre outras espécies de leguminosas. A ingestão do inibidor de  $\alpha$ -amilase purificado de sementes de *P. vulgaris* ( $\alpha$ AI-1) por larvas de *Z. subfasciatus* provoca a indução de duas novas formas de amilases de baixa migração eletroforética (Silva e cols.,2001a; 2001b).

Vários trabalhos têm mostrado que inibidores de  $\alpha$ -amilases são particularmente tóxicos para bruquídeos pragas do velho mundo, como as espécies *Callosobruchus maculatus*, além das espécies *Callosobruchus chinensis* e *Bruchus pisorum* (Ishimoto e Kitamura, 1989; Hueusing e cols.,1991; Ishimoto e Chrispeels, 1996). O fato de *C. maculatus* não se desenvolver em sementes do feijão comum tem sido atribuído à presença de um inibidor de  $\alpha$ -amilase presente nos grãos cultivados, chamado de inibidor de  $\alpha$ -amilase 1 ( $\alpha$ -AI1) (Ishimoto e Kitamura, 1989; Ishimoto e Chrispeels, 1996, Grossi-de-Sá e Chrispeels, 1997). Na verdade, espécies do gênero *Phaseolus* se caracterizam por apresentar uma superfamília de proteínas potencialmente tóxicas que englobam inibidores de  $\alpha$ -amilases, lectinas e arcelinas (Svensson e cols.,2004).

A eficácia de inibidores de  $\alpha$ -amilases em conferir resistência a certas espécies de bruquídeos ficou ainda melhor estabelecida com a produção de sementes transgênicas, como no caso de ervilhas que se tornaram resistentes ao seu bruquídeo praga (Shade e cols.,1994; Schroeder e cols.,1995).

No caso da indução de amilases em larvas de *Z. subfasciatus*, sabemos que embora o inibidor  $\alpha$ AI-1 iniba somente de forma parcial a amilase constitutiva do inseto em ensaios *in vitro*, sua presença na luz intestinal desencadeia a secreção de um dímero de amilases (Silva e cols.,2001a; 2001b). É possível que o intestino do inseto produza uma proteinase serínica minoritária (Ishimoto e Chrispeels, 1996; Silva e cols.,2001c) cuja função é clivar o inibidor liberando peptídeos, que são reconhecidos por receptores no epitélio intestinal. O reconhecimento dos peptídeos desencadearia uma cascata de sinalização que culminaria com a síntese e secreção do dímero de amilases.

Apesar da importância da descoberta do fenômeno de indução de enzimas digestivas de insetos frente ao consumo de inibidores protéicos na dieta, pouco se avançou sobre os mecanismos moleculares envolvidos na detecção dos inibidores no trato intestinal. Tanto no caso da indução de proteases, quanto no caso da indução de amilases, a descrição dos passos que levam desde a detecção dos inibidores no intestino médio à expressão dos genes das enzimas induzidas ainda é um campo aberto para investigação.

## Aspectos Evolutivos e Função das Membranas Perimicrovillares (MPM)

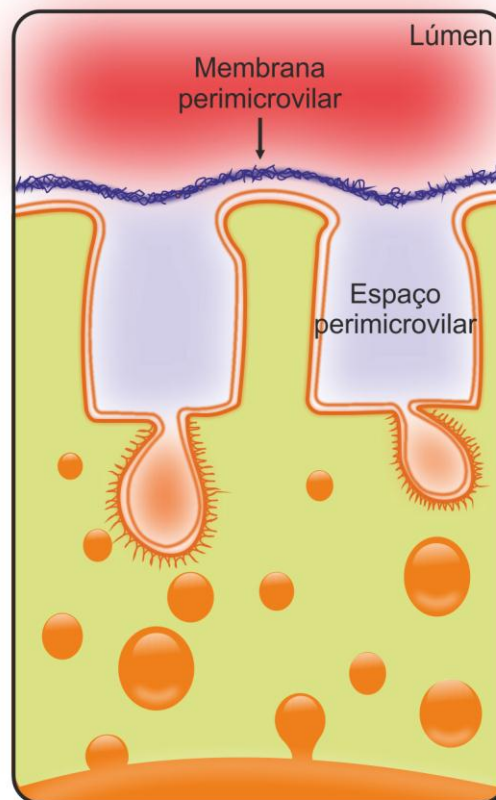
A membrana plasmática que reveste as microvilosidades das células intestinais (membrana microvilar) dos Hemiptera e Thysanoptera é revestida por uma outra unidade de membrana (chamada membrana perimicrovilar por Terra, 1988) (Figura 3). Essa estrutura foi inicialmente descrita em Fulgoroidea (Sternorrhyncha) como delaminação da superfície das células epiteliais (Reger, 1971) e em *Triatoma infestans* (Burgos e Gutierrez, 1976; Gutierrez e Burgos, 1978), *Rhodnius prolixus* (Lane e Harrison, 1979) e *Oncopeltus fasciatus* (Baerwald e Delcarpio, 1983) como uma forma modificada de glicocálix ou mesmo um tipo peculiar de membrana peritrófica. A consideração de que as membranas perimicrovillares se tratavam de unidades de membranas verdadeiras veio através dos estudos de criofatura (Lane e Harrison, 1979; Andries e Torpier, 1982) e de suas propriedades citoquímicas (Gutierrez e Burgos, 1978) e da sua típica aparência trilaminar quando vista em microscopia eletrônica de transmissão. Apesar de membranas perimicrovillares não terem sido descritas em Cicadoidea e Cercopoidae (Marshall e Cheung, 1974), Cicadelloidea (Lindsay e Marshall, 1980) e Aphididae (O'loughlin e Chambers, 1972), a inspeção das eletromicrografias publicadas e trabalhos mais recentes mostraram que essas membranas estão presentes nesses insetos (Terra, 1988; Silva e cols., 1995; 2004).

Outros grupos relacionados aos Hemiptera também apresentam o sistema de membranas perimicrovillares. Kitajima (1975) descreveu estruturas muito similares às membranas perimicrovillares em tripes (Thysanoptera), referindo-se às mesmas como um tipo especial de glicocálix. Silva e cols. (2004) demonstraram através de microscopia eletrônica de transmissão e imunocitocalização de  $\alpha$ -glucosidase (enzima marcadora de membranas perimicrovillares) que a ordem Thysanoptera também possui membrana perimicrovilar. Neste mesmo trabalho, foi visto que nas ordens Psocoptera e Phthiraptera essa estrutura está ausente. De acordo com a filogenia proposta por Kristensen (1981), o grupo Paraneoptera teria dado origem a duas superordens: Psocodea, que compreende as ordens Psocoptera e Phthiraptera (piolhos), e Condylognatha, que compreende as ordens Hemiptera e Thysanoptera. Desta forma, os resultados obtidos por Silva e cols. (2004) sugerem que o sistema de membranas perimicrovillares surgiu em um possível ancestral Condylognatha.

A membrana perimicrovilar mantém uma distância constante da membrana microvilar (Burgos e Gutierrez, 1976; Gutierrez e Burgos, 1978; Lane e Harrison, 1979), estendendo-se em direção ao lúmen ventricular e terminando em fundo cego. Desta forma, a membrana perimicrovilar e a microvilar delimitam um compartimento fechado, denominado de espaço perimicrovilar (Terra, 1988; Silva e cols., 1995). A membrana

perimicrovilar é uma estrutura permanente, estando presente em todos os estágios ninfais e nos adultos, seja em insetos alimentados ou em jejum (Lane e Harrison, 1979; Baerwald e Delcarpio, 1983; Silva e cols.,1995; 2004). Todavia, a sua extensão parece depender da alimentação do inseto, tornando-se mais abundante no inseto alimentado (Billingsley e Downe, 1983; Damasceno de Sá e cols.,2007).

A origem das membranas perimicrovillares ainda não é completamente conhecida. Em 1979, Lane e Harrison, propuseram que as mesmas eram formadas pela transferência de lipoproteínas sintetizadas por cisternas de retículo endoplasmático liso que se localizavam próximas às microvilosidades. Andries e Torpier, em 1982, postularam que camadas de membranas eram formadas dentro de vesículas, sendo que as camadas internas eram incorporadas à membrana perimicrovilar após a fusão da membrana externa da vesícula com a microvilar. Em 1995, Silva e colaboradores propuseram um modelo para a origem das membranas perimicrovillares a partir do complexo de Golgi. Nesse modelo, vesículas com duas membranas são formadas a partir de cisternas com dupla membrana provenientes da região do *trans* Golgi. Essas



**Figura 3: Representação simplificada do modelo proposto para a origem das membranas perimicrovillares. Maiores detalhes em Silva e cols. 2005.**

vesículas com dupla membrana originariam as membranas perimicrovillares após dois eventos sucessivos de fusão: primeiro da membrana externa da vesícula com a membrana microvilar e segundo, da membrana interna vesicular com a perimicrovilar. Essa hipótese foi reforçada após a imunolocalização de  $\alpha$ -glucosidase em algumas áreas do complexo de Golgi e na membrana interna dessas vesículas de dupla membrana (Silva e cols.,1995), a qual se especulava ser a que daria origem às perimicrovillares. Cristofolletti e cols.(2003) demonstraram que a superfície das células intestinais dos afídeos desvia-se desse modelo, aparentemente como resultado da adaptação a sugar seiva de floema altamente concentrada com sacarose. Nesses insetos, as membranas perimicrovillares, então denominadas de membranas perimicrovillares modificadas, encontram-se associadas com um sistema de lamelas que estão ligadas umas às outras por trabéculas, conferindo uma maior resistência ao tecido durante o tráfego de vesículas. No modelo proposto por Cristofolletti e cols.,(2003), as vesículas que brotam de cisternas do Golgi são circundadas por retículo endoplasmático rugoso livre de ribossomos, formando uma vesícula multimembranar. Essas vesículas com múltiplas membranas se fusionam na base das lamelas e progridem por entre elas. Tão logo a vesícula atinge a superfície apical, suas membranas permanecem ligadas na superfície luminal das lamelas. De acordo com esse modelo, as membranas lamelares são derivadas de membranas do retículo endoplasmático rugoso, enquanto que as perimicrovillares modificadas originam-se de cisternas do Golgi.

É proposto que os Heteroptera tenham evoluído de sugadores de seiva similares aos Sternorrhyncha atuais, assim como o ancestral de toda a ordem Hemiptera (Goodchild, 1966; Silva e cols.,2004). Provavelmente associado a este fato, os Hemiptera perderam a membrana peritrófica, camada que reveste o alimento no intestino médio de insetos e que leva a uma compartimentação do processo digestivo. Essa compartimentação aumenta a eficiência da digestão e é útil apenas quando ocorre digestão de polímeros, os quais não existem na seiva. A perda da membrana peritrófica e de hidrolases que clivam moléculas poliméricas pode estar, portanto, relacionada à perda da digestão luminal nesses insetos (Terra, 1988; Terra e Ferreira, 1994; Silva e Terra 1994; Silva e cols.,2004).

Embora as membranas perimicrovillares possam funcionar como uma espécie de membrana peritrófica nos Hemiptera que apresentam digestão luminal de polímeros (hematófagos, predadores e sugadores de sementes), nos hemípteros sugadores de seiva vegetal, essa estrutura provavelmente surgiu para permitir a absorção de aminoácidos presentes em baixas concentrações na seiva (Terra, 1988; Terra e Ferreira, 2005). O maior problema enfrentado pelos insetos sugadores de seiva é assegurar a absorção de nutrientes essenciais, tais como aminoácidos, que ocorrem em baixas concentrações em todos os tipos de seiva. De acordo com Terra (1988), os sugadores de floema realizariam essa absorção segundo o seguinte modelo: as membranas microvillares transportariam ativamente íons potássio (o principal íon da seiva) do espaço perimicrovilar para as células ventriculares, gerando um gradiente de concentração entre a seiva presente no lúmen ventricular e o espaço perimicrovilar. Esse gradiente de concentração poderia ser usado para forçar a absorção de compostos orgânicos através de transportadores específicos na membrana



perimicrovilar, onde uma vez no espaço perimicrovilar, poderiam difundir-se até transportadores na membrana microvilar (Terra, 1988; Silva e cols.,1995).

Além da presença de uma membrana perimicrovilar responsável pela absorção de nutrientes essenciais de uma dieta diluída, outras características fisiológicas que parecem ter seguido a adaptação destes insetos a um hábito sugador de seiva incluem: ausência de papo; perda do intestino anterior e da circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas (Terra, 1990). A ocorrência de proteinases cisteínicas no intestino médio dos Heteroptera (Terra e cols.,1988; Kollien e cols.,2004) e a ausência de enzimas do tipo tripsinas podem ser o resultado de dois eventos evolutivos (Houseman e cols.,1985; Terra, 1988; Terra e Ferreira, 2005). Primeiro, a adaptação dos Heteroptera ancestrais ao hábito sugador de seiva teria levado à perda dessas proteinases serínicas. O segundo evento teria sido o uso de proteinases lisossomais (cisteínicas e aspárticas) na digestão de proteínas, quando alguns desses Heteroptera sugadores de seiva voltaram a se alimentar de polímeros. Estudos citoquímicos e de biologia molecular confirmam a origem lisossomal das proteinases cisteínicas luminais (Billingsley e Downe, 1983; Kollien e cols.,2004).

Pelo fato das membranas perimicrovulares compartimentalizarem o processo digestivo nos Heteroptera superiores (que apresentam digestão luminal), têm sido atribuídas a essa estrutura as seguintes funções: prevenção da ligação não-específica de material não digerido a hidrolases e/ou transportadores de proteínas associados à membrana microvilar, aumentando a eficiência na digestão e absorção; produção de monômeros alimentares próximos à superfície das membranas microvulares, permitindo que estes sejam liberados perto dos carreadores de membrana; imobilização de enzimas digestivas em grandes áreas do lúmen intestinal, evitando a perda dessas enzimas durante a passagem do bolo alimentar (Terra, 1990; Terra e Ferreira, 1994; Silva e cols.,1995, 2004). Outras funções espécie-específicas também estão associadas com as membranas perimicrovulares. Em afídeos, elas se encontram associadas com um sistema de lamelas unido por trabéculas e conferem resistência ao tecido do trato intestinal (Cristofolletti e cols.,2003). Nesses insetos essa resistência extra é muito importante, já que a dieta natural dos afídeos (seiva de floema vegetal) contém altas concentrações de sacarose, levando a uma pressão osmótica que pode chegar a ser três vezes maior que os fluidos corpóreos do inseto (Ashford e cols.,2000; Karley e cols.,2005).

Em hemípteros hematófagos, a membrana perimicrovilar também pode estar relacionada com a detoxificação de heme associada à síntese de hemozoína (polímero de heme). Em *R. prolixus*, a capacidade de induzir a polimerização de heme está associada com a fração particulada do lúmen intestinal do inseto, que é composto principalmente por membranas perimicrovulares (Oliveira e cols.,1999, 2000; Silva e cols.,2007; Mury e cols.,2009). A digestão da hemoglobina causa uma intensa liberação de heme, o grupamento prostético dessa proteína. O heme, apesar de ser uma importante molécula catalisadora de muitos processos oxidativos biológicos (Ponka, 1999), também apresenta uma elevada periculosidade. Livre da cadeia polipeptídica da hemoglobina é altamente pró-oxidante (Dansa-Petretski e cols.,1995; Ryter e Tyrrell, 2000). Sendo uma molécula anfifílica, pode se associar a membranas biológicas causando uma perturbação na integridade destas, além dos danos causados pela peroxidação dos lipídeos componentes destas membranas (Schmitt e cols.,1993).

Nesse contexto, os hemípteros hematófagos enfrentam um grande desafio durante a digestão sanguínea também. O *R. prolixus*, assim como outros organismos que apresentam digestão em meio ácido, sequestra grande parte do heme em uma forma cristalina, menos reativa e insolúvel conhecida como hemozoína (Hz). No caso do *R. prolixus*, 97% do heme contido no intestino médio são sequestrados na forma de Hz (Stiebler e cols.,2010), sendo esta, sem dúvida, a primeira linha de defesa contra o heme no intestino médio. Durante a digestão sanguínea, as MPM são as primeiras estruturas a entrar em contato com o heme liberado durante a digestão. Estas membranas são capazes de induzir a formação de Hz tanto *in vitro* quanto *in vivo* em *R. prolixus* (Oliveira e cols.,2000; Silva e cols.,2007). MPM de outros triatomíneos também são capazes de induzir a formação de Hz (Oliveira e cols.,2007), sendo este um importante papel desempenhados por estas membrana durante a hematofagia. É importante notar que as membranas de eritrócitos, abundantes no intestino médio após a alimentação sanguínea e que também são ricas nos fosfolípídeos majoritários das membranas plasmáticas, não são capazes de induzir a formação de Hz, sugerindo que algo mais nas membranas perimicrovilares que não somente sua estrutura membranar está envolvida na formação de Hz.

Como MPM são estruturas características dos hemípteros, podemos questionar se MPM de outros hemípteros, agora os não hematófagos, são capazes de induzir a formação de Hz. Resultados recentes mostram que as MPM dos hemípteros *D. pruvianus* (subordem Heteroptera) e *Quesada gigas* (subordem Auchenorrhyncha) são capazes de induzir a formação de Hz (J. R. Silva, F. B. Mury, C. P. Silva e M. D. Petretski, dados ainda não publicados). Do ponto de vista evolutivo, a capacidade de formar Hz por estas membranas dentro da ordem Hemiptera pode ser considerada como uma característica adaptativa que foi mantida tanto nos hematófagos quanto nos fitófagos a partir de um ancestral Condylgnatha. Nos hematófagos, a capacidade de formar Hz trouxe uma vantagem na hora de se livrar do excesso de heme tóxico liberado durante a digestão da hemoglobina. Reforçando a questão do caráter adaptativo, ao se alimentar *D. peruvianus* artificialmente com sangue, verifica-se que, além de ser capaz de digerir o sangue e se manter vivo, o mesmo ainda é capaz de fazer Hz no intestino médio, como o *R. prolixus* (J. R. Silva, F. B. Mury C. P. Silva. M. D. Petretski e H. Masuda, dados não publicados).

Uma característica marcante nos hemípteros é a presença da enzima  $\alpha$ -glucosidase ligada às MPM (Ferreira e cols.,1988; Silva e cols.,1995; Silva e cols.,2004). Esta enzima, no hemíptero hematófago *R. prolixus*, tem um importante papel no processo de formação de Hz. Na formação de um cristal, o processo de nucleação é um passo limitante. Na formação do cristal de Hz, a  $\alpha$ -glucosidase está envolvida com o processo de nucleação de Hz nas MPM (Mury e cols.,2009). Uma vez formados os cristais de Hz nas MPM, nos momentos iniciais do processo digestivo, a cristalização do heme liberado durante a digestão da hemoglobina se torna bastante eficiente do ponto de vista fisiológico. Isso certamente explica porque encontramos 97% do heme na forma de Hz no intestino médio de *R. prolixus* (Stiebler e cols.,2010). Nos momentos iniciais, a liberação de heme e rápido sequestro pela  $\alpha$ -glucosidase permite a formação dos primeiros cristais que em seguida são alongados pelos lipídeos das membranas em uma interface hidrofílica-hidrofóbica (requisito importante para a síntese de Hz). Ao se desprenderem das membranas, os cristais aumentados podem, ainda,

por autocatálise, dar conta de uma forma mais lenta de formação de Hz (para maiores detalhes, ver Stiebler e cols.,2011).

As membranas perimicrovilares também parecem estar relacionadas com os processos de interação parasita/insetos vetores. Gonzales e cols.,(1999) demonstraram através de estudos de manipulação endócrina em *R. prolixus*, que alterações nas células epiteliais e nas membranas perimicrovilares associadas no trato intestinal de *R. prolixus* afetam o desenvolvimento do *Trypanossoma cruzi* (agente causador da doença de Chagas). Estudos de microscopia eletrônica da invasão de *Trypanossoma rangeli* em células intestinais de *R. prolixus* mostraram que *T. rangeli* se associa a algumas células epiteliais, especialmente às membranas perimicrovilares, por onde consegue penetrar nessas células (Oliveira e De Souza, 2001). Gomes e cols.,(2002) mostraram, através de estudos com radiação gama, que as membranas perimicrovilares provavelmente representam uma estrutura essencial no controle da invasão do *T. rangeli* do lúmen intestinal para a hemocele de *R. prolixus* e que alterações nessas membranas podem facilitar a penetração do parasita dentro da hemocele do vetor. Possíveis associações de parasitas com a membrana perimicrovilar de insetos vetores também são reportadas na interação de *Leptomonas wallacei* com o trato intestinal de *O. fasciatus* (Romeiro e cols.,2003) e de *Leptomonas seymouri* em *D. peruvianus* (Moraes e cols.,1994).

## A Hematofagia e a Digestão em Insetos Hematófagos

A hematofagia é uma prática comum entre insetos que parasitam vertebrados. Pulga (ordem Siphonaptera), piolho (ordem Phthiraptera), barbeiros e cimicídeos (ordem Hemiptera), e uma série de outros insetos da ordem Diptera (mosquitos, flebotomíneos, borrachudos, moscas tsé-tsé, etc.) se alimentam de sangue de vertebrados durante todo ou parte de seu ciclo de vida (Romoser, 1996). Entre os mosquitos e flebotomíneos, que têm metamorfose completa, somente a fêmea se alimenta de sangue enquanto que entre as moscas tsé-tsé (família Muscidae), ambos os sexos se alimentam de sangue (Gooding e Krafur, 2005). Entretanto, entre os insetos que têm metamorfose incompleta (piolhos, triatomíneos e cimicídeos), as ninfas e adultos dos dois sexos se alimentam, obrigatoriamente, de sangue (Romoser, 1996).

A hematofagia surgiu, independentemente, várias vezes no curso da evolução dos artrópodes e várias adaptações comportamentais, anatômicas e fisiológicas acompanharam esta tendência evolutiva (Justice e cols.,2003). A adaptação à hematofagia foi um processo complexo e envolveu algumas alterações significativas no inseto como, por exemplo: as mandíbulas foram modificadas para facilitar o acesso ao sangue; as glândulas salivares tiveram que produzir moléculas capazes de bloquear a hemostasia dos vertebrados; o intestino médio foi modificado para neutralizar lesões imunológicas mediadas pelo sangue dos vertebrados e para otimizar a digestão e absorção dos componentes do sangue (Ribeiro, 1996; Stark e James, 1996). A hematofagia foi um evento chave para a evolução das doenças transmitidas por artrópodes justamente porque a eficiência reprodutiva deles aumentou com esta nova fonte de nutrientes. Ao adquirir este novo hábito alimentar, os artrópodes se tornaram suscetíveis aos agentes infecciosos presentes no sangue dos hospedeiros, possibilitando a transmissão destes patógenos pelos artrópodes (Mejia e cols.,2006).

Para os insetos hematófagos que têm metamorfose incompleta, os nutrientes do sangue são essenciais para suprir as demandas nutricionais associadas com o crescimento do inseto e o seu desenvolvimento, além de serem utilizados para a produção de ovos (Romoser, 1996). Em geral, a fêmea adulta dos insetos de metamorfose completa utiliza o sangue, primordialmente, como uma fonte de aminoácidos necessários para a maturação dos ovos. Por sua vez, os machos não sugam sangue, necessitando somente das soluções açucaradas de origem vegetal como fonte primária de energia (Romoser, 1996). Os insetos hematófagos ingerem grandes quantidades de sangue em uma única refeição. Os mosquitos, por exemplo, ingerem entre três e quatro vezes o seu peso corporal em cada refeição (Romoser, 1996). Este aumento de peso torna-se um problema por dificultar a locomoção ou o voo do inseto. Para solucionar isso são altamente eficientes no seu processo diurético. Por exemplo, ninfas de *Rhodnius* podem eliminar seis vezes a sua massa corporal em seis horas (Ribeiro, 1996).

O sangue de vertebrados é um alimento rico em nutrientes, constituído principalmente das seguintes proteínas: hemoglobina, albumina e imunoglobulina. A hemoglobina é a proteína mais abundante nas células vermelhas dos vertebrados, representando mais de 80% do total de proteínas do sangue (Wicher e Fries, 2006). As hemácias representam o maior componente celular do sangue e, como a hemoglobina está contida dentro das hemácias, a lise destas células é o passo inicial para a digestão dos insetos hematófagos (Horn e cols., 2009). A digestão do sangue resulta na liberação de peptídeos, aminoácidos e grandes quantidades de heme, o grupamento prostético da hemoglobina, no lúmen intestinal dos artrópodes hematófagos. A digestão do sangue e a absorção dos nutrientes ocorrem no intestino médio. Alguns insetos armazenam o sangue em um órgão intestinal inerte antes de transportá-lo, em pequenas porções, para a digestão no intestino médio. A mosca tsé-tsé e os triatomíneos o armazenam no divertículo e intestino anterior, respectivamente (Romoser 1996). Outros insetos, tais como mosquitos, flebotomíneos, simulídeos e pulgas, o direcionam diretamente para o intestino médio onde ele é estocado e completamente digerido (Ribeiro, 1996). A maioria dos insetos hematófagos se utiliza de serino endopeptidases para a digestão inicial das proteínas sanguíneas, exceto os triatomíneos que lançam mão de endopeptidases similares às catepsinas lisossomais (Terra e Ferreira, 1994; Kollien e Billingsley, 2002). A digestão intermediária, por sua vez, é realizada pela ação de aminopeptidases e carboxipeptidases (Terra e Ferreira 1994, Romoser 1996).

Entre todos os insetos hematófagos, a digestão dos mosquitos é a que tem sido mais estudada devido a sua grande importância na transmissão de doenças. Devido a este fato, iremos, principalmente, enfatizar o seu processo digestivo. O trato digestivo dos mosquitos é composto por uma camada de células epiteliais que se estende da abertura da região anterior (boca) até a região posterior que corresponde ao ânus (Romoser, 1996). Este tubo divide-se em três regiões principais que são: intestino anterior, médio e posterior. Cada uma destas regiões é especializada em funções particulares (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O intestino anterior está envolvido com ingestão, condução e armazenamento de alimento. Contém dois êmbolos de sucção, a bomba cibarial e a faringeana, que servem para a ingestão do alimento, o canal probóscide, as glândulas salivares e o

esôfago. Próximo ao final do esôfago surge três divertículos: dois dorso-laterais e um ventral. Comparativamente, os divertículos dorsais são menores que o ventral, ou papo, que, quando cheio, fica bastante dilatado na região abdominal. Normalmente, todos os três divertículos apresentam-se cheios de ar e são usados como reservatórios de alimentos ricos em açúcares (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Na terminação do esôfago existe uma estrutura denominada cárdia ou válvula de estomodel, responsável pelo direcionamento das dietas ingeridas pela fêmea do mosquito. Quando elas ingerem sangue, a válvula abre-se e o sangue é armazenado no intestino médio; entretanto, quando esse inseto ingere néctar, a válvula permanece fechada e o néctar é encaminhado para o divertículo (Romoser, 1996).

O intestino médio é longitudinalmente dividido em uma região anterior, em forma de tubo, e uma posterior, em forma de saco. A região posterior é altamente expansível e é o local de destino, armazenagem e digestão do sangue e absorção de nutrientes (Graf e cols., 1986; Billingsley e Lehane, 1996). O intestino médio é formado por células epiteliais colunares que secretam as enzimas digestivas. Na região luminal estas células possuem microvilosidades, que favorecem a absorção de nutrientes. O intestino médio, diferentemente do anterior e posterior, não é coberto com cutícula protetora, estando em contato direto com o ambiente externo. No lúmen do intestino médio é sintetizada, após a ingestão do sangue, uma matriz quitino-protéica, denominada matriz peritrófica, que envolve o alimento ingerido e separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (dentro da matriz peritrófica) e o ectoperitrófico (fora da matriz peritrófica) (Terra, 1990). Por sua vez, os alimentos ricos em açúcares são direcionados para o divertículo, onde a digestão é iniciada pela ação de carboidrases oriundas da glândula salivar (Schaefer e Miura, 1972; Marinotti e cols., 1996). Posteriormente, os açúcares são, paulatinamente, transferidos para o intestino médio onde a digestão é finalizada. É também o principal sítio de interação entre o inseto e os patógenos que ele transmite (Sanders e cols., 2003).

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

Como o sangue de vertebrados é constituído principalmente de proteínas, as proteases têm um papel predominante na digestão do sangue. Em mosquitos, a digestão primária das proteínas do sangue é feita por várias isoformas de tripsina que são sintetizadas em diferentes tempos após a alimentação (Graf e Briegel, 1989; Muller e cols., 1993). As atividades enzimáticas, em geral, atingem seu pico máximo entre 24 e 30 h após a alimentação e, provavelmente, são estimuladas por fatores gerados a partir do sangue parcialmente digerido (Briegel e Lea, 1975; Graf e Briegel, 1989).

O papel primordial das tripsinas na digestão sanguínea tem sido bem estudado em *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Em *Ae. aegypti*, a indução da síntese de tripsina tem sido dividida em duas fases (Graf e Briegel, 1989; Felix e cols., 1991). Uma tripsina inicial, minoritária (AaET), é sintetizada nas primeiras 4–6 h após a ingestão do sangue (Noriega e cols., 1996). O gene dela foi clonado e caracterizado por dois grupos de pesquisa independentes (Kalhok e cols., 1993; Noriega e cols., 1996). O RNA mensageiro desta tripsina minoritária está presente no intestino médio de fêmeas não

alimentadas, mas a tradução deste RNAm somente ocorre após a ingestão do sangue e a sua abundância cai rapidamente nas primeiras 8h após a ingestão do sangue (Noriega e cols.,1996). Posteriormente, ocorre a síntese das tripsinas majoritárias, que são as principais responsáveis pela digestão das proteínas do sangue, entre 8 e 24h após a alimentação (Graf e Briegel, 1989). Duas tripsinas seriam responsáveis pela expressão da atividade de tripsina majoritária, uma delas denominada de “*late trypsin*” (AaLT) (Barillas-Mury e cols.,1991) e uma outra que foi nomeada 5G1 (Kalhok e cols.,1993). A síntese do RNA mensageiro destas tripsinas alcança seu máximo em torno de 24h após a ingestão do sangue e, diferentemente da tripsina inicial, os genes da majoritária são regulados a nível transcricional (Barillas-Mury e Wells, 1993). Inicialmente pensava-se que a atividade da tripsina minoritária era essencial para a expressão da majoritária (Barillas-Mury e cols.,1995), entretanto, Lu e cols.(2006) concluíram que a ativação transcricional da tripsina majoritária independe da atividade proteolítica daquela enzima. Estes autores observaram que a redução da expressão da tripsina minoritária, pela metodologia de RNA de interferência, não tinha efeito sobre a expressão dela. Posteriormente, Brackney e colaboradores (2008) mostraram, utilizando também a técnica de RNA de interferência, que a redução dos níveis de transcritos de tripsina tardia (*late trypsin*, AaLT) no intestino médio de *Ae. aegypti* não tinha efeito sobre a atividade de tripsina durante a fase tardia da digestão. Por outro lado, a redução na expressão do gene da enzima 5G1 resultou em diminuição significativa na atividade de tripsina, confirmando que a enzima 5G1 é a principal tripsina da fase tardia de digestão do mosquito. O trabalho subsequente do mesmo grupo de pesquisa (Isoe e cols.,2009) mostrou que 5G1, AaLT e uma outra tripsina tardia (AaSP VII) são importantes para a digestão sangue, mas que somente a protease 5G1 tem propriedades de uma tripsina clássica. As três tripsinas de *Ae. aegypti* descritas na década de 1990 foram identificadas a partir da dedução das sequências de aminoácidos obtidas e de dados de alinhamento (Barillas-Mury and Wells, 1993; Kalhok et al.,1993; Noriega e cols.,1996). No entanto, a atividade de tripsina destas proteases não foi demonstrada *in vitro*. Estudos de RNA de interferência têm mostrado que a redução da expressão de RNA mensageiro de AaET e Aa5G1, reduz, como consequência, a atividade de tripsina *in vivo* (Brackney e cols.,2008; Isoe e cols.,2009). O mesmo não foi observado quando os transcritos de AaLT foram reduzidos (Brackney e cols.,2008). Venâncio e cols.(2009), utilizando ferramentas de bioinformática, propuseram que podem existir mais oito prováveis tripsinas induzidas pela alimentação sanguínea, no intestino médio de *Ae. aegypti*. Em 2010, Brackney e cols.clonaram, sequenciaram e estudaram a expressão dos RNA mensageiros de sete novas proteases serínicas. Destes sete genes, três são fortemente expressos após a alimentação, enquanto os outros quatro são expressos constitutivamente. O gene AaSPl tem uma expressão muito baixa antes da alimentação, mas imediatamente após a ingestão de sangue, sua expressão é aumentada cerca de 320 x e permanecendo praticamente constante até 24h, caindo progressivamente após este tempo. O gene AaSPVI tem sua expressão aumentada cerca de 400 x em 24h e tem um perfil de transcrição intermediário entre AaSPl e AaLT. Por sua vez, o terceiro gene, AaSPVII, tem um perfil de expressão muito similar ao do gene AaLT com um aumento muito expressivo de cerca de 12000 x. Estes mesmos autores sugerem, baseados em análises filogenéticas e de sequências de aminoácidos, que a ‘late trypsin’ (AaLT) e AaSPl são, na verdade, collagenases. Entretanto, AaSPVI e AaSPVII foram

classificadas como tripsinas. Estes novos dados vêm mostrar a grande complexidade do processo digestivo dos mosquitos.

A expressão diferencial de tripsinas também é observada em *An. gambiae*. A família das tripsinas de *An. gambiae* inclui sete genes que codificam cinco proteínas funcionais (Muller e cols.,1993). As tripsinas 1 e 2 são ambas induzidas pela alimentação sanguínea e exibem perfis de expressão similares. Diferentemente, as 3, 4 e 7 são expressas constitutivamente em mosquitos não alimentados com sangue, sendo que os genes das 3 e 7 são reprimidos após a alimentação sanguínea (Muller e cols.,1995). O RNA mensageiro da tripsina começa a ser sintetizado logo após a emergência do adulto e permanece constante e em quantidades apreciáveis, em *An. gambiae* alimentado com açúcar, durante os primeiros quatro dias. Sua expressão é fortemente aumentada durante as 24 h após a ingestão de sangue (Lemos e cols.,1996). A atividade de tripsina também está presente em mosquitos alimentados com açúcar. Esta atividade começa a aumentar rapidamente após a ingestão do sangue e atinge seu máximo em 24h e é consistente com o início imediato da digestão protéica (Lemos e cols.,1996).

Em três anofelinos neotropicais (*An. aquasalis*, *An. darlingi* e *An. albicans*), Caroci e cols.(2003) observaram a presença de duas tripsinas que apresentam sequências amino-terminais similares às outras tripsinas de insetos hematófagos. A atividade proteolítica de *An. darlingi* é induzida e atinge os seus valores máximos entre 10 e 36h após a alimentação sanguínea.

Pouco ainda se sabe sobre a expressão de enzimas digestivas em flebotomíneos. Quatro proteases tipo tripsina e duas do tipo quimotripsina foram caracterizadas em *Phlebotomus papatasi*. As duas proteases tipo quimotripsina e duas das quatro tripsinas tiveram sua expressão aumentada após a alimentação sanguínea. Em *Phlebotomus perniciosus*, análises por PCR em tempo real mostraram que a expressão do gene da tripsina majoritária (PperTryp3) é elevada após 6h e atinge o seu máximo 24h após a alimentação. Outras serino proteases, por sua vez, têm sua expressão diminuída após a ingestão de sangue (Dostálová e cols.,2011).

Em moscas tsé-tsé (*Glossina morsitans morsitans*), logo após a alimentação, as atividades de tripsina e quimotripsina diminuem nas células e aumentam no lúmen intestinal. Como o decorrer do tempo, as atividades intracelulares destas duas enzimas aumentam e atingem os níveis máximos cerca de 24h após a alimentação sanguínea (Yan e cols.,2001).

Além de tripsinas, os intestinos dos mosquitos também apresentam outro tipo de endopeptidase. No intestino médio de *Ae. aegypti*, o RNA mensageiro da quimotripsina começa a ser sintetizado logo após a emergência do adulto com os seus níveis máximos sendo alcançados após três a sete dias. A síntese da proteína, entretanto, é induzida pela alimentação sanguínea, permanecendo alta durante a digestão e caindo a níveis basais após o fim do processo digestivo (Jiang e cols.,1997). Três genes de quimotripsina foram isolados e caracterizados em *An. gambiae* (Shen e cols.,2000; Vizioli e cols.,2001). Dois destes genes são expressos no intestino médio 12h e se mantêm abundante até 48h após a alimentação. O terceiro gene, por sua vez, tem sua expressão máxima em 24h após a alimentação sanguínea, caindo posteriormente (Vizioli e cols.,2001). *An. darlingi* e *An. aquasalis*, por sua vez, apresentam dois genes

de quimotripsina sendo que atividade quimotriptica em *An. aquasalis* é observada 24h após a ingestão do sangue (de Almeida e cols., 2003).

Entre as exopeptidases, Edwards e cols.(2000) caracterizaram o gene da carboxipeptidase A de *Ae. aegypti* que apresentam uma expressão máxima a entre 16 a 24h após a alimentação sanguínea. Noriega e cols.(2002) estudaram as atividades de três exopeptidases, aminopeptidase, carboxipeptidase A e carboxipeptidase B, presentes no intestino médio de *Ae. aegypti*. Estas três enzimas foram induzidas pela ingestão sanguínea com perfis de atividades similares ao da tripsina majoritária, ou seja, apresentando picos de atividades entre 20 e 24 após a ingestão sanguínea. Em *An. gambiae*, Edwards et al (1997) clonaram uma carboxipeptidase que foi rápida e fortemente induzida pela ingestão do sangue em *An. gambiae*. Por sua vez, *An. darlingi* apresenta duas distintas atividades de aminopeptidase: uma atinge seu máximo após 12h e a outra somente 48h após a ingestão do sangue (Okuda e cols.,2005) e o *An. stephensi* utiliza, pelo menos, três aminopeptidases durante a digestão sanguínea (Billingsley, 1990). Tripsina, quimotripsina e aminopeptidase com atividades máximas 36h após a alimentação sanguínea também foram observadas em *Culex quinquefasciatus* (Okuda e cols., 2002).

## A Microbiota Intestinal e a Nutrição dos Insetos

Os insetos são usados como hospedeiros por um grande número de microrganismos, os quais podem colonizar, crescer e se reproduzir, principalmente, no sistema reprodutivo e no trato digestivo, associados ao lúmen e ao epitélio intestinal. Estes microrganismos podem promover substancial impacto na biologia e no ciclo de vida dos insetos, contribuindo para a digestão, nutrição, desenvolvimento, reprodução, imunidade, comportamento, resistência a colonização por patógenos (Lilburn e cols.,2001; Lemke e cols.,2003; Dillon e Dillon, 2004), especiação e defesa contra inimigos naturais (Dale e Moran, 2006).

Insetos que dependem estritamente de sangue ao longo da vida, em geral, estão em estreita associação simbiótica com microrganismos (Romoser, 1996). Os triatomíneos e a mosca *tsé-tsé* são colonizados por bactérias consideradas simbiontes obrigatórios, por serem essenciais para que estes insetos completem o seu ciclo de vida. A ausência destes simbiontes pode impedir a maturação sexual dos insetos ou levar à esterilidade (Hill e Campbell, 1973; Nogge, 1976). Os triatomíneos alimentam-se exclusivamente de sangue, que é um alimento rico em proteínas e aminoácidos essenciais, mas deficiente em carboidratos, lipídios e vitaminas do complexo B (Ribeiro, 1996). Para suprir esta carência, os triatomíneos abrigam em seu intestino a bactéria *Rhodococcus rhodnii*, que produz os nutrientes necessários para complementar a dieta sanguínea (Yassin, 2005). A mosca *tsé-tsé*, diferentemente dos triatomíneos, abrigam endossimbiontes (simbiontes intracelulares), mas com funções similares às do triatomíneo, ou seja, estes simbiontes têm o papel de complementar uma dieta carente de alguns nutrientes.

Até o momento, ainda não foi descrito um simbiote obrigatório em mosquitos. Isto ocorre, provavelmente, porque os mosquitos são polípagos durante seu ciclo de vida. São detritívoros durante a fase larval e, durante a fase adulta, se alimentam de uma fonte de açúcar e de sangue do hospedeiro vertebrado. Recentemente, bactérias



do gênero *Asaia* têm sido descritas como simbiontes em *An. stephensi* (Favia e cols.,2007) e *Ae. aegypti* (Crotti e cols.,2009). Estas bactérias são importantes para esses insetos pois colonizam o intestino e outros tecidos e são transmitidos verticalmente (Crotti e cols.,2009; Favia e cols.,2007). Entretanto, um papel fisiológico ainda não foi atribuído a *Asaia* ou outras espécies bacterianas identificadas em mosquitos.

Em trabalho recente, Gusmão e cols.(2010) observaram que as bactérias intestinais apresentavam uma distribuição desigual ao longo do intestino médio de *Ae. aegypti* durante as primeiras 24h após a ingestão de sangue, predominando na região posterior do intestino médio, onde ocorre uma maior atividade proteolítica. Este trabalho mostrou que bactérias intestinais de mosquitos crescem em velocidade exponencial, aumentando o seu número em cerca de 10000 vezes 48h após a alimentação sanguínea. Aumentos expressivos no número de bactérias também foram observados em outras espécies de mosquitos (DeMaio e cols.,1996). No triatomíneo *R. prolixus*, a bactéria simbiote *Rhodococcus rhodnii* cresce exponencialmente no intestino após a ingestão de sangue (Beard e cols.,2001) e o número total de bactérias intestinais aumenta 10000 vezes 48h após a alimentação sanguínea (Azambuja e cols.,2004). Estes dados sugerem que as bactérias intestinais possuem uma importância significativa para a digestão de insetos hematófagos. Para testar esta hipótese, Gaio e cols.(2011) alimentaram as fêmeas de *Ae. aegypti* com antibióticos e observaram que a redução drástica no número de bactérias intestinais interferiu na digestão protéica devido a uma redução na lise das hemácias. Esta interferência na digestão sanguínea teve como consequência a redução da fecundidade do mosquito.

Estes estudos são indicativos de que as bactérias presentes no intestino dos mosquitos podem ser imprescindíveis para a manutenção de sua capacidade fisiológica. Neste sentido, o estudo das bactérias simbiontes de *Ae. aegypti* irá esclarecer o papel delas para a nutrição e digestão deste inseto, bem como a sua influência sobre a longevidade e fertilidade das fêmeas. Gusmão e cols.(2007) isolaram bactérias do divertículo ventral de fêmeas adultas e mostraram que o pH do luminal desse divertículo apresentava pH ácido 24h após a ingestão de uma solução de sacarose. Esta acidificação é devida ao metabolismo anaeróbico bacteriano. Será muito interessante verificar se esta fermentação forneceria nutrientes, tais como aminoácidos e vitaminas, ausentes nas dietas dos mosquitos.

## **A Matriz ou Membrana Peritrófica**

Os mosquitos possuem em seu intestino uma camada de material acelular separando o alimento das células epiteliais do intestino (Richards e Richards, 1977; Peters, 1992; Miller e Lehane, 1993). Esta camada é chamada de matriz (ou membrana) peritrófica (PM). Logo após a distensão da porção posterior do intestino médio dos mosquitos, provocada pela ingestão do sangue, as células epiteliais secretam uma PM do tipo I que envolve completamente o bolo alimentar (Shao e cols.,2001). Constituintes da PM já estão estocados em vesículas de secreção nas células epiteliais e são secretados após a distensão do intestino provocada pela ingestão sanguínea em *An. stephensi* (Berner e cols.,1983). Em contraste, *Ae. aegypti* não contém grânulos de secreção antes da alimentação (Staubli e cols.,1966, Perrone

e Spielman, 1988, Billingsley e Rudin, 1992). Quanto ao tempo de formação da PM em mosquitos, Freyvogel e Staubli (1965) observaram a presença de PM em *Ae. aegypti* 5-8h, em *An. gambiae* 13h, e em *An. stephensi* 32h após a alimentação. Dados mais recentes mostram que em *An. gambiae* e *An. darlingi*, a PM pode ser visualizada, por microscopia eletrônica, tão cedo quanto 12h após a alimentação e, após 48h, ela está completamente formada (Ponnudurai e cols., 1988, Okuda e cols., 2005).

A PM é uma estrutura bioquimicamente complexa composta por quitina, proteínas e proteoglicanas (Lehane, 1997). A quitina é um constituinte característico de PMs e corresponde de 3,7-13% da massa total da PM. As fibrilas de quitina hidratadas provavelmente contribuem para a resistência da PM, na sua propriedade de resistir a compressão e distensão (Terra, 1996; Lehane, 1997). Os proteoglicanos são macromoléculas constituídas de proteínas e um ou mais glicosaminoglicanos ligados covalentemente. Estas cadeias polissacarídicas aniônicas são feitas de unidades de dissacarídeos repetidas que contém um derivado de açúcar aminado e um açúcar carregado negativamente. Os proteoglicanos estão presentes na maioria das PMs que têm sido examinadas (Eisemann e Binnington, 1994; Terra, 1996; Lehane, 1997) e estão, possivelmente, envolvidas nas propriedades de resistência (Tellam, 1996) e de permeabilidade da PM (Lehane, 1977; Eisemann e Binnington, 1994). As proteínas são os principais componentes da PM na maioria dos insetos que têm sido examinadas (Lehane, 1997). Elas correspondem de 21-56% da massa total da PM e, embora cerca de 40 proteínas majoritárias tenham sido observadas em PMs de mosquito adulto (Moskalyk e cols., 1996) somente três genes que codificam proteínas de PM de mosquito têm sido clonados até o momento (Rayms-Keller e cols., 2000; Devenport e cols., 2004; Shao e cols., 2005).

As PM podem exercer uma série de funções. Em mosquitos, sugere-se que ela pode funcionar como uma estrutura que protege o epitélio intestinal das enzimas digestivas do intestino médio, de cristais de hematina que podem se formar durante a digestão da hemoglobina e uma barreira contra a infecção por patógenos (Lehane 1997). Em adição a estas funções, a PM também participa do processo de detoxificação do heme (Páscoa, 2002) e da digestão do sangue.

### **O Papel da PM como Barreira aos Patógenos e ao Grupo Prostético Heme**

O conceito de que a PM pode servir como uma barreira contra parasitas não é nova. Stholer (1961) enfatizou que a PM de *Ae. aegypti* constituía uma importante barreira aos oocinetos de *Plasmodium gallinaceum*. Mariani (citado por Hardy et al 1983), por sua vez, anunciou que a PM em *An. labranchiae* impedia a passagem de zigotos da malária para dentro do corpo do mosquito. Howard (1962) concluiu que o coágulo formado no intestino do mosquito imobilizaria o parasita da malária até a formação da PM.

A espessura e elasticidade da maioria das PMs dos insetos atestam o seu potencial de funcionar como uma barreira protetora entre o conteúdo do lúmen intestinal e os tecidos dos insetos (Tellam, 1996). A PM tem uma importância particular em insetos que transmitem vírus e parasitas para os seres humanos (Miller e Lehane 1993; Kaslow e Welburn, 1996). Estes patógenos estão frequentemente presentes no sangue do inseto vetor e alguns sofrem uma fase específica de desenvolvimento de seu ciclo de vida em tecidos do inseto (Shahabuddin e cols., 1993; Shahabuddin e cols., 1996;

Kaslow e Welburn 1996). Um dos eventos importantes neste processo é o movimento do patógeno em direção aos tecidos do inseto. Cada patógeno utiliza uma estratégia própria para alcançar estes tecidos: alguns interagem com a matriz peritrófica, outros a atravessam ou evitam a PM durante o curso da infecção do inseto. O *Plasmódio* (parasita causador da malária) secreta uma quitinase que causa rupturas na PM possibilitando a sua saída do bolo sangüíneo. Um dado complicador é o fato de que o próprio inseto hematófago sintetiza quitinase (Filho e cols.,2002). Filho e cols.(2002) e Eger-Mangrich e cols.(2000) observaram que as atividades de quitinase e de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase aumentavam progressivamente após a alimentação sanguínea em *Ae. aegypti* e *Lutzomya longipalpis*, respectivamente, atingindo seu pico no momento que a PM está sendo degradada. Em vista deste perfil de atividade ao longo da digestão, estes autores sugerem a participação de quitinase na formação e degradação da PM. Interessantemente, A PM pode ser utilizada pelo parasita para se proteger das enzimas digestivas do mosquito. As formas amastigotas do *Plasmodium* são altamente sensíveis à proteólise, mas 50% delas se transformam nas formas promastigotas resistentes devido à barreira formada pela presença da PM que impede um contato mais estreito entre o parasita e as enzimas digestivas secretadas pelo epitélio intestinal (Pimenta e cols.,1997).

Insetos hematófagos ingerem grandes quantidades de sangue. Mosquitos ingerem cerca de três a cinco vezes o peso do seu corpo em cada refeição sanguínea. Os mosquitos usam hemoglobina como sua maior fonte de proteína e a sua digestão leva a uma grande liberação de heme no lúmen intestinal (Pascoa e cols.,2002). O sangue de vertebrados tem, aproximadamente, 10 mM de heme ligado à hemoglobina. Após a refeição sanguínea, a água é excretada, levando a um aumento da concentração de heme no lúmen intestinal. O heme é uma molécula essencial para a vida de muitos organismos (Ponka, 1999). Contudo, em seu estado livre, esta molécula age como oxidante, participando na formação de radicais livres (Ryter e Tyrrel, 2000). O heme é capaz de promover a oxidação de biomoléculas tais como ácidos nucléicos, proteínas e lipídios (Halliwell e Gutteridge, 1990). As reações que levam à formação de espécies reativas de oxigênio, sejam elas catalisadas por ferro livre, ferro associado ao grupo heme ou pela própria hemoglobina, são descritas na reação de Fenton (Moore, 1990). Desta reação resultam radicais hidroxilas que reagem com várias biomoléculas (Halliwell e Gutteridge, 1990). Concentrações da ordem de milimolares de heme são capazes de desestruturar os fosfolipídios de membrana, rompendo sua integridade física e causando lise celular (Schmitt e cols.,1993).

Os insetos hematófagos desenvolveram um amplo espectro de adaptações para anular ou minimizar os efeitos deletérios do heme livre. Os mecanismos mais importantes de proteção são: formação de agregados de heme, produção de enzimas antioxidantes, síntese de proteínas ligadoras de heme, produção de moléculas antioxidantes de baixa massa molecular, degradação enzimática de heme (Graça-Souza e cols.,2006) e ligação do heme à matriz peritrófica (Pascoa e cols.,2002). Estes últimos autores mostraram, através da observação de PM em cortes histológicos não corados, que parte do heme gerado durante a digestão sanguínea em *Ae. aegypti* liga-se fortemente à PM dando-lhe uma cor marrom característica. Estudos citoquímicos confirmaram estes resultados. Esta PM é capaz de reter, no lúmen intestinal, quase grande parte heme gerado na digestão da hemoglobina. Em 2006, Devenport e cols.mostraram que uma proteína de PM de *Ae. aegypti* foi capaz de associar uma

grande quantidade de heme *in vitro*. Estes resultados sugerem que a matriz peritrófica pode funcionar como uma eficiente barreira para o heme. Esta interação heme-PM é iniciada a partir da porção posterior do intestino médio (Gusmão, 2002). No hemíptero *R. prolixus* também foi observada uma interação entre o heme e as membranas perimicrovilares (Silva e cols.,2007). Esta estrutura que tem funções similares à PM, provavelmente participa também do processo de síntese de hemozoína no intestino deste inseto (Oliveira e cols.,2005).

## Considerações Finais

A grande demanda por alimentos a medida que a população humana aumenta faz com que as ações que previnam a perda de grãos para os insetos pragas sejam cada vez mais prioritárias. As populações urbanas também vem aumentando e o resurgimento de doenças transmitidas por insetos vetores também representa uma preocupação crescente. Como o trato intestinal dos insetos é uma interface importante entre o meio interno do animal e o meio externo, eventos que ocorrem associados a este compartimento se tornam extremamente importantes, pois podem revelar alvos a serem explorados pelos programas de controle, manejo ou erradicação de pragas e vetores. Com os avanços das técnicas de proteômica, genômica e metabolômica, motivadas pelo aumento do número de genomas completos de plantas e insetos, há uma grande expectativa de que mais detalhes serão revelados sobre a fisiologia da digestão em insetos. Este capítulo abrangeu alguns tópicos onde a contribuição de brasileiros tem se mostrado relevante e esperamos que ele inspire mais pesquisadores a se dedicar ao estudo dos eventos que se desenrolam no intestino dos insetos.

## Referências Bibliográficas

- Andries, J., Torpier, G., 1982. An extracellular brush border coat of lipid membranes in the midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): ultrastructure and genesis. *Biol. Cell* 46,195-202.
- Ashford, D.A., Smith, W.A., Douglas, A.E., 2000. Living on a high sugar diet: the fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 46, 335-341.
- Azambuja, P., Feder, D., Garcia, E.S., 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp. Parasitol.* 107, 89-96.
- Baerwald, R.J., Delcarpio, J.B., 1983. Double membrane-bound intestinal microvilli in *Oncopeltus fasciatus*. *Cell Tissue Res.* 232, 593-600.
- Barillas-Mury, C.V., Graf, R., Hagedorn, H.H., Wells, M.A., 1991. cDNA and deduced amino acid sequence of a blood meal-induced trypsin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.* 21, 825–831.
- Barillas-Mury, C., Wells, M.A., 1993. Cloning and sequencing of the blood meal induced late trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and characterization of the upstream regulatory region. *Insect Mol. Biol.* 2, 7-12.
- Barillas-Mury, C., Noriega, F.G. and Wells, M.A., 1995. Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 241-246.
- Beard, C.B., Dotson, E.M., Pennington, P.M., Eichler, S., Cordon-Rosales, C., Durvasula, R.V., 2001. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31, 621-627.
- Berner, R., Rudin, W., Hecker, H., 1983. Peritrophic membranes and protease activity in the midgut of the malaria mosquito, *Anopheles stephensi* (Liston) (Insecta:Diptera) under normal and experimental conditions. *J. Ultrastr. Res.* 83, 195-204.
- Billingsley, P.F., 1990. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Ann. Rev. Entomol.* 35, 219-248.
- Billingsley, P.F., Downe, A.E.R., 1983. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian J. Zool.* 61, 2574-2586.
- Billingsley, P.F., Rudin, W., 1992. The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *Parasitol.* 78, 430-440.
- Billingsley, P.F., Lehane, M.J., 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In Lehane, M.J. & Billingsley, P.F. (Eds.), *Biology of the insect midgut*, Londres, Chapman & Hall, 1<sup>a</sup> edição, p. 86-114.
- Brackney, D.E., Foy, B.D., Olson, K.E., 2008. The effects of midgut serine proteases on dengue virus type 2 infectivity of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 267-274.

- Brackney, D.E., Isoe, J., IV, B.W.C., Zamora, J., Foy, B.D., Miesfeld, R.L., Olson, K.E., 2010. Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 56, 736-744.
- Briegel, H., Lea, A.O., 1975. Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 21, 1597-1604.
- Broadway, R.M., 1996. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32, 39-53.
- Broadway, R.M., 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 855-874.
- Burgos, M.H., Gutierrez, L.S., 1976. The intestine of *Triatoma infestans*. I. Cytology of the midgut. *J. Ultrastr. Mol. Structr. Res.* 57, 1-9.
- Caroci, A.S., Calvo, E., Ribolla, P.E., De Biachi, A.G., Marinotti, O., 2003. Two digestive trypsins occur in three species of neotropical anophelines. *J. Med. Entomol.* 40, 991-995.
- Consoli, R.A.G.B., Lourenço-de-Oliveira, R.L., 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. 2a. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, 226p.
- Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbé, Y., Terra, W.R., 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 49, 11-24.
- Crotti, E., Damiani, C., Pajoro, M., Gonella, E., Rizzi, A., Ricci, I., Negri, I., Scuppa, P., Rossi, P., Ballarini, P., Raddadi, N., Marzorati, M., Sacchi, L., Clementi, E., Genchi, M., Mandrioli, M., Bandi, C., Favia, G., Alma, A., Daffonchio, D., 2009. *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environm. Microbiol.* 11, 3252–3264.
- Dale, C., Moran, N.A., 2006. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* 126, 453-65.
- Damasceno de Sá, J., Carneiro, C.N.B., DaMatta, R.A., Samuels, R.I., Terra, W.R., Silva, C.P., 2007. Biphasic perimicrovillar membrane production following feeding by previously starved *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *J. Insect Physiol.* 53, 592–600.
- de Almeida, R.W., Tovar, F.J., Ferreira, I.I., Leoncini, O., 2003. Chymotrypsin genes in the malaria mosquitoes *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 307–315.
- DeMaio, J., Pumpuni, C.B., Kent, M., Beier, J.C., 1996. The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psophora columbiae* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 219–223

- Devenport, M., Fujioka, H., Jacobs-Lorena, M., 2004. Storage and secretion of the peritrophic matrix protein Ag-Aper1 and trypsin in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 13, 349–358.
- Devenport, M., Alvarenga, P.H., Hisashi, L.S., Fujioka, M., Bianconi, L., Pedro L. Oliveira, P.L., Jacobs-Lorena, M., 2006. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AelMUC1 as a heme-binding protein. *Biochem.* 45, 9540-9.
- Dillon, R.J., Dillon, V.M., 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 71-92.
- Dostálová, A., Votýpka, J., Favreau, A.J., Barbian, K.D., Volf, P., Valenzuela, J.G., and Ryan C Jochim, R.C., 2011. The midgut transcriptome of *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies. *BMC Genomics* 12, 223.
- Edwards, M.J., Lemos, F.J.A., Donnelly-Doman, M., Jacobs-Lorena, M., 1997. Rapid Induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 1063-1072.
- Edwards, M.J., Moskalyk, L.A., Donnelly-Doman, M., Vlaskova, M., Noriega, F.G., Walker, V.K., Jacobs-Lorena, M., 2000. Characterization of a carboxypeptidase A gene from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 9, 33-38.
- Eger-Mangrich, I., Santoro, M.M., Lemos, F.J.A., Gusmão, D.S., Pimenta, P.F.P., 2000. Description of a chitinolytic system probably implicated in the peritrophic matrix formation and degradation of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae), the vector of *Leishmania chagasi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, Suppl II, 348.
- Eisemann, C.H., Binnington, K.C., 1994. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *Int. J. Parasitol.* 24, 15-26.
- Favia, G., Ricci, I., Damiani, C., Raddadi, N., Crotti, E., Marzorati, M., Rizzi, A., Urso, R., Brusetti, L., Borin, S., Mora, D., Scuppa, P., Pasqualini, L., Clementi, E., Genchi, M., Corona, S., Negri, I., Grandi, G., Alma, A., Kramer, L., Esposito, F., Bandi, C., Sacchi, L., Daffonchio, D., 2007. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 104, 9047-9051.
- Felix, C.R., Betschart, B., Billingsley, P.F., Freyvogel, T.A., 1991. Post-feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera:Culicidae) is separable into two cellular phases. *Insect Biochem.* 21, 197-203.
- Freyvogel, T., Staubli, W., 1965. The formation of peritrophic membranes in Culicidae. *Acta Trop.* 22, 118-147.
- Filho, B.P.D., Lemos, F.J.A., Secundino, N.F.C., Páscoa, V., Pereira, S.T., Pimenta, P.F.P., 2002. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti* A chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1723-1729.

- Gaio, A.O., Gusmão, D.S., Santos, A.V., Berbert-Molina, M.A., Paulo FP Pimenta, P.F.P, Lemos, F.J.A, 2011. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) Parasit. Vectors 2011, 4, 105.
- Gomes, S.A.O., Graciano, G.L., Nogueira, N.F.S., De Souza, W., Garcia, E.S., Azambuja, P., 2002. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebrate Pathol.* 79, 86-92.
- Goodchild, A.J.P., 1966. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biol. Reviews* 41, 97-140.
- Gooding, R.H., Krafur, E.S., 2005. Tsetse genetics: contributions to biology, systematics, and control of tsetse flies. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 101-123.
- Graça-Souza, A.V.C., Maya-Monteiro, G.R.C., Braz, M.C., Paes, M.H.F., Sorgine, M.F., Oliveira, Oliveira, P.L., 2006. Adaptations against heme toxicity in blood feeding arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 322–335.
- Graf, R., Binz, H., Briegel, H., 1986. Monoclonal antibodies as probes for *Aedes aegypti* trypsin. *Insect Biochem.* 18, 463-470.
- Graf, R., Briegel, H., 1989. The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera:Culicidae) and “in vivo” stimulation in isolated midguts. *Insect Biochem.* 19, 129-137.
- Grossi-de-Sá, M.F., Chrispeels, M.J., 1997. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amilase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 271-281.
- Gusmão, D.S., 2002. O papel biológico da matriz peritrófica e microbiota intestinal na retenção de heme no lúmen intestinal de mosquitos. *Dissertação de mestrado*, UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
- Gusmão, D.S., Santos, A.V., Marini, D.C., Russo, E.S., Peixoto, A.M.D., Bacci Jr, M., Berbert- Molina, M.A., Lemos, F.J.A., 2007. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 919-924.
- Gusmão, D.S., Santos, A.V., Marini, D.C., Bacci Jr, M., Berbert-Molina, M.A., Lemos, F.J.A., 2010. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop.* 115, 275-81.
- Gutierrez, L.S., Burgos, M.H., 1978. The intestine of *Triatoma infestans*. II. The surface coat of the midgut. *J. Ultrastr. Mol. Structr. Res.* 63, 244-251.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1-86.
- Hardy, J.L., Houk, E.J., Kramer, L.D., Reeves, W.C., 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Ann. Rev. Entomol.* 28, 229-262.
- Harvey, W.R., Cioffi, M., Wolfersberger, M.G., 1983. Chemiosmotic potassium ion pump of insect epithelia. *Am. J. Physiol.* 244, 163-R175.



- Hensbergen, P.J., Donker, M.H., Hunziker, P.E., van der Schors, R.C., van Straalen, N.M., 2001. Two metal-binding peptides from the insect *Orchesella cincta* (Collembola) as a result of metallothionein cleavage. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1105-1114.
- Hill, P.D.S., Campbell, J.A., 1973. The production of symbiont-free *Glossina morsitans* and an associated loss of female fertility. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67, 727-728.
- Horn, M., Nussbaumerová, M., Sanda, M., Kovarova, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C.R., Kopacek, P., Mares, M., 2009. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem. Biol.* 16, 1053-1063.
- Howard, L.M., 1962. Studies on the mechanism of infection of the mosquito midgut by *Plasmodium gallinaceum*. *Am. J. Hyg.* 75, 287-300.
- Houseman, J.G., Morrison, P.E., Downe, A.E.R., 1985. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Phymata wolffii* (Hemiptera: Phymatidae). *Can J. Zool.* 63, 1288-1291.
- Huesing, J.E., Shade, R.E., Chrispeels, M.J., Murdock, L.L., 1991.  $\alpha$ -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean to cowpea weevil. *Plant Physiol.* 96, 993-996.
- Ishimoto, M., Chrispeels, M.J., 1996. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of  $\alpha$ -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiol.* 111, 393-401.
- Ishimoto, M., Kitamura, K., 1989. Growth inhibitory effects of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Appl. Ent. Zool.* 24, 281-286.
- Isoe, J., Rascón Jr, A.A., Kunz, S., Miesfeld, R.L., 2009. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 903-912.
- Jiang, Q., Hall, M., Noriega, F.G., Wells, M., 1997. cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 283-289.
- Jongsma, M.A., Bakker, P.L., Peters, J., Bosch, D., Stiekema, W.J., 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 8041-8045.
- Jongsma, M.A., Bolter, C., 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 885-895.
- Justice, R.W., Biessmann, H., Walter, M.F., Dimitratos, S.D., Woods, D.F., 2003. Genomics spawns novel approaches to mosquito control. *Bioessays* 25, 1011-1020.

- Kalhok, S.E., Tabak, L.M., Prosser, D.E., Brook, W., Downe, A.E., White, B.N., 1993. Isolation, sequencing and characterization of two cDNA clones coding for trypsin-like enzymes from the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 2, 71–79.
- Karley, A.J., Ashford, D.A., Minto, L.M., Pritchard, J., Douglas, A.E., 2005. The significance of gut sucrase activity for osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 51, 1313-1319.
- Kaslow, D.C., Welburn, S., 1996. Insect-transmitted pathogens in the insect midgut. MJ Lehane, PF Billingsley, *Biology of the insect midgut*. 1<sup>a</sup> edição. Londres: Chapman & Hall, p432-462.
- Kitajima, E.W., 1975. A peculiar type of glycocalyx on the microvilli of the midgut epithelial cells of the thrips *Frankliniella* sp. (Thysanoptera: Thripidae). *Cytobiologie* 11, 299-303.
- Kollien, A.H., Billingsley, P.F., 2002. Differential display of mRNAs associated with blood feeding in the midgut of the bloodsucking bug, *Triatoma infestans*. *Parasitol. Res.* 88, 1026-1033.
- Kollien, A.H., Waniek, P.J., Nisbet, A.J., Billingsley, P.F., Schaub, G.A., 2004. Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Insect Molec. Biol.* 13, 569-579.
- Lane, N.J., Harrinson, J.B., 1979. An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. *J. Cell Sci.* 39, 355-372.
- Lehane, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* 42, 525-550.
- Lemke, T., Stingl, U., Egert, M., Friedrich, M.W., Brune, A., 2003. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6650-6658.
- Lemos, F.J.A., Cornel, A.J., Jacobs-Lorena, M., 1996. Trypsin and aminopeptidase gene expression is affected by age and food composition in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 651-658.
- Lilburn, T.G., Kim, K.S., Ostrom, N.E., Byzek, K.R., Leadbetter, J.R., Breznak, J.A., 2001. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. *Science* 292, 2495-2498.
- Lindsay, K.L., Marshall, A.T., 1980. Ultrastructure of the filter chamber complex in the alimentary canal of *Eurimela distincta* Signoret (Homoptera, Eurymelidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 15, 211-224.
- Lu, S.J., Pennington, J.E., Stonehouse, A.R., Mobula, M.M., Wells, M.A., 2006. Reevaluation of the role of early trypsin activity in the transcriptional activation of the late trypsin gene in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 336-43.

- Marinotti, O., de Brito, M., Moreira, C.K., 1996. Apyrase and alphasglucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 113:675–679.
- Marshall, A.T., Cheung, W.W.K., 1974. Studies on water and ion transport in homopteran insects: ultrastructure and cytochemistry of cicadoid and cercopoid Malpighian tubules and filter chamber. *Tissue & Cell* 6, 53-171.
- Mazumdar-Leighton, S., Broadway, R.M., 2001. Transcriptional induction of digestive midgut trypsin in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 645-657.
- Mejia, J.S., Bishop, J.V., Titus, R.G., 2006. Is it possible to develop pan-arthropod vaccines? *Trends Parasitol.* 22, 367-370.
- Miller, N., Lehane, M.J., 1993. Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors. *Parasitol. Today* 9, 45-50.
- Moon, J., Salzman, R.A., Ahn, J-E., Koiwa, H., Zhu-Salzman, K., 2004. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defence inhibitor. *Insect Molec. Biol.* 13, 283-291.
- Moore, M.R., 1990. Historical introduction to porphyrins and porphyrias. HA Dailey, *Biosynthesis of heme and chlorophylls*, McGraw-Hill Publishing Company, p. 1-54.
- Moraes, R.M., Freymuller, E., Camargo, Milder, E.P., 1994. Development of trypanosomatids in the phytophagous insect *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). A light and electron microscopic study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 553-559.
- Moskalyk, L.A., Oo, M.-M., Jacobs-Lorena, M., 1996. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 5, 261-268.
- Mosolov, V.V., Grigor'eva, L.I., Valueva, T.A., 2001. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 115-123.
- Muller, H-M., Catteruccia, F., Vizioli, J., della Torre, A., Crisanti, A., 1995. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*. *Exp. Parasitol.* 81, 371-385.
- Muller, 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. *EMBO J.* 12, 2891-2900.
- Miller, N., Lehane, M.J., 1993. Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors. *Parasitol. Today* 9, 45-50.
- Moon, J., Salzman, R.A., Ahn, J-E., Koiwa, H., Zhu-Salzman, K., 2004. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defence inhibitor. *Insect Molec. Biol.* 13, 283-291.

- Moore, M.R., 1990. Historical introduction to porphyrins and porphyrias. HA Dailey, Biosynthesis of heme and chlorophylls, McGraw-Hill Publishing Company, p. 1-54.
- Moraes, R.M., Freymuller, E., Camargo, Milder, E.P., 1994. Development of trypanosomatids in the phytophagous insect *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). A light and electron microscopic study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89, 553-559.
- Mury, F.B., Silva, J.R., Ferreira, L.S., Ferreira, B.S., Souza-Filho, G.A., Souza-Neto, J.A., Ribolla, P.E.M., Silva, C.P., Nascimento, V.V., Machado, O.L.T., Berbert-Molina, M.A., Dansa-Petretski, M., 2009. Alpha-glucosidase forms hemozoin in a blood-sucking bug: an evolutionary history. PLoS ONE 4, e6966.
- Nogge, G., 1976. Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. Experientia 32, 995-996.
- Noriega, F.G., Wang, X.Y., Pennington, J.E., Barillas-Mury, C., Wells, M.A., 1996. Early trypsin, a female specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, amino acid terminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. Insect Biochem. Mol. Biol. 26, 119-126.
- Noriega, F.G., Edgar, K.A., Bechet, R., Wells, M.A., 2002. Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. J. Insect Physiol. 48, 205–212.
- O’loughlin, G.T., Chambers, T.C., 1972. Extracellular microtubules in the aphid gut. J. Cell Biol. 53, 575-578.
- Okuda, K., Caroci, A.S., Ribolla, P.E., de Bianchi, A.G., Bijovsky, A.T., 2002. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. Tiss. Cell 34, 210–219.
- Okuda, K., Caroci, A.S., Ribolla, P.E., Marinotti, O., de Bianchi, A.G., Bijovsky, A.T., 2005. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. J. Insect Physiol 51, 769–776.
- Oliveira, M.A., De Souza, W., 2001. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. J. Invert. Pathol. 77, 22-26.
- Oliveira, M.F., Kyciab, S.W., Gómez, A., Kosarc, A.J., Bohle, D.S., Hempelmann, E., Menezes, D., Vannier-Santose, M.A., Oliveira, P.L., Ferreira, S.T., 2005. Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. FEBS Lett. 579, 6010–6016.
- Oliveira, M.F., Gandara, A.C.P., Braga, C.M.S., Silva, J.R., Mury, F.B., Dansa-Petretski, M., Menezes, D., Vannier-Santos, M.A. Oliveira, P.L., 2007. Heme crystallization in the midgut of triatomine insects. Comp. Biochem. Physiol. C. 146, 168-174.
- Oliveira, M.F., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., De Souza, W., Lins, U., Braga, C.M.S., Masuda, H., Oliveira, P.L., 1999. Haem detoxification by an insect. Nature 400, 517-518.
- Oliveira, M.F., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., De Souza, W., Lins, U., Braga, C.M.S., Masuda, H., Oliveira, P.L., 2000. Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. FEBS Lett. 477, 95-98.

- Pascoa, V., Oliveira, P.L., Dansa-Petretski, M., Silva, J.R., Alvarenga, P.H., Jacobs-Lorena, M., Lemos, F.J.A., 2002. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 517-523.
- Perrone, J.B., Spielman, A., 1988. Time and site assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Tissue Res.* 252, 473-478.
- Peters, W., 1992. Peritrophic membranes. Bradshaw e cols., Zoophysiology, Springer-Verlag, Berlim 30, 1<sup>a</sup>. edição, p. 238.
- Pimenta, P.F.P., Modi, G.B., Pereira, S.T., Shahabuddin, M., Sacks, D.L., 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitol.* 115, 359–369.
- Ponka, P., 1999. Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.* 318, 241-256.
- Ponnudurai, T., Billingsley, P.F., Rudin, W., 1988. Differential infectivity of *Plasmodium* for mosquitoes. *Parasitol. Today* 4, 319–321.
- Rayms-Keller, A., McGa, M., Oray, C., Carlson, J.O., Beaty, B.J., 2000. Molecular cloning and characterization of a metal responsive *Aedes aegypti* intestinal mucin cDNA. *Insect Mol. Biol.* 9, 419–426.
- Reger, J.F. (1971). Fine structure of the surface coat of midgut epithelial cells in the homopteran *Phylloscelis atra*. (Fulgoridae). *J. Submicrosc. Cytol.* 3, 353-358.
- Ribeiro, A.F., Ferreira, C., Terra, W.R., 1990. Morphological basis of insect digestion. J Mellinger, *Animal Nutrition and Transport Processes*. Karger, Basel, p. 96-105.
- Richards, A.G., Richards, P.A., 1977. The peritrophic membranes of Insects. *Ann. Rev. Entomol.* 22, 219-240.
- Ribeiro, J.M.C., 1996. Common problems of arthropod vectors of disease. In: Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (eds.) *The Biology of Disease Vectors. 1st edition*. Colorado: Colorado University.
- Reger, J.F., 1971. Fine structure of the surface coat of midgut epithelial cells in the homopteran *Phylloscelis atra*. (Fulgoridae). *J. Submicrosc. Cytol.* 3, 353-358.
- Romeiro, A., Leal, L.H.M., De Souza, W., Attias, M., 2003. Interaction of *Leptomonas wallacei* with the intestinal tract of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *J. Inverteb. Pathol.* 82, 41-49.
- Romoser, W.S., 1996. The vector alimentary system. BJ Beaty, WC Marquardt, *The Biology of Disease Vectors. 1<sup>a</sup> edição*. Colorado: University.
- Ryter, S.W., Tyrrell, R.M., 2000. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity. heme oxygenase has both proand antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 289–309.

- Sanders, H.R., Evans, A.M., Ross, L.S., Gill, S.S., 2003. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1105-1122.
- Schaefer, C.H., Miura, T., 1972. Sources of energy utilized by natural populations of the mosquito, *Culex tarsalis*, for overwintering. *J Insect Physiol.* 18, 797-805.
- Schmitt, T.H., Frezatti, W.A., Schreier, S., 1993. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 96-103.
- Schroeder, H.E., Gollasch, S., Moore, A., Tabe, L.M., Craig, S., Hardie, D.C., Chispeels, M.J., Spencer, D., Higgins, T.J.V., 1995. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 107, 1233-1239.
- Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.M., Murdock, L.L., Higgins, T.J.V., Chispeels, M.J., 1994. Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *BioTechnol.* 12, 793-796.
- Shahabuddin, M., Toyoshima, T., Aikawa, M., Kaslow, D.C., 1993. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci* 90, 4266-4270.
- Shahabuddin, M., Lemos, F.J.A., Kaslow, D.C., Jacobs-Lorena, M., 1996. Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsins blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect. Immun.* 64, 739-743.
- Shao, L., Davenport, M., Jacobs-Lorena, M., 2001. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 119-125.
- Shao, L., Davenport 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 Biochem. Mol. Biol.* 35, 947-959.
- Shen, Z., Edwards, M.J., Jacobs-Lorena, M., 2000. A gut specific serine protease from the malaria vector *Anopheles gambiae* is downregulated after blood ingestion. *Insect Mol. Biol.* 9, 223-229.
- Silva, C.P., Silva, J.R., Vasconcelos, F.F., Petretski, M.D.A., DaMatta, R.A., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2004. Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthrop. Struct. Develop.* 33, 139-148.
- Silva, C.P., Ribeiro, A.F., Gulbenkian, S., Terra, W.R., 1995. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *D. peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* 41, 1093-1103.
- Silva, C.P., Terra, W.R., 1994. Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 24, 493-505.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., de Sá, M.F.G., Isejima, E.M., DaMatta, R.A., Miguens, F.C., Bifano, T.D., 2001a. Digestion of legume starch granules by larvae

- of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of  $\alpha$ -amylases in response to different diets. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 41-50.
- Silva, C.P., Terra, W.R., de Sá, M.F.G., Isejima, E.M., Bifano, T.D., Almeida, J.S., 2001b. Induction of digestive  $\alpha$ -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean  $\alpha$ -amilase inhibitor 1. *J. Insect Physiol.* 47, 1283-1290.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Lima, R.M., 2001c. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 18-28.
- Silva, J.R., Oliveira, M.F., Silva, C.P., Atella, G.C., Oliveira, P.L., Masuda, H., Petretski, M.D.A., 1998. Heme association with the perimicrovillar membranes in the gut lumen of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93, Supl. II: 318.
- Silva, J.R., Mury, F.B., Oliveira, M.F., Oliveira, P.L., Silva, C.P., Dansa-Petretski, M., 2007. Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 523–531.
- Stark, R.S., James, A.A., 1996. The salivary of disease vectors. In: Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (eds.) *The Biology of Disease Vectors. 1st edition*. Colorado: Colorado University.
- Staubli, W., Freyvogel, T.A., Suter, J., 1966. Structural modification of the endoplasmic reticulum of midgut epithelial cells of mosquitoes in relation to blood intake. *J. Microscopie* 5, 189-204.
- Stholer, H.R., 1961. The peritrophic membrane of blood sucking Diptera in relation to their role as vectors of blood parasites. *Acta Trop.* 18, 263-266.
- Stiebler, R., Timm, B.L., Oliveira, P.L., Hearne, G.R., Egan, T.J., Oliveira, M.F., 2010. On the physico-chemical requirements of hemozoin formation promoted by the perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 284-292.
- Stiebler, R., Soares, J.B.R., Timm, B.L., Silva, J.R., Mury, F.B., Dansa-Petretski, M., Oliveira, M.F., 2011. On the mechanisms involved in biological heme crystallization. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 93-99.
- Svensson, B, Fukuda, K., Nielsen, P.K., Bønsager, B.C., 2004. Proteinaceous  $\alpha$ -amilase inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta* 1696, 145-156.
- Tellam, R.L., 1996. The peritrophic matrix. MJ Lehane, PF Billingsley, *Biology of the insect midgut*. 1<sup>a</sup> edição. London, Chapman & Hall, 86-114.
- Terra, W.R., 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21, 675-734.
- Terra, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Ann. Rev.. Entomol.* 35, 181-200.
- Terra, W.R., 1996. Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Ciência e Cultura* 48(5/6), 317-324.

- Terra, W.R., 2001. The origins and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Physiol.* 47, 47-61.
- Terra, W.R., Ferreira, C., De Bianchi, A.G., 1979. Distribution of digestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.* 25: 487-494.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Garcia, E.S. (1988). Origin, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.* 18, 423-434.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* B 109, 1-62.
- Venancio, T.M., Cristofolletti, P.T., Ferreira, C., Verjovski-Almeida, S., Terra, W.R., 2009. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Mol. Biol.* 18, 33–44.
- Villalon, J.M., Ghosh, A., Jacobs-Lorena, M., 2003. The peritrophic matrix limits the rate of digestion in adult *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 49, 891–895.
- Vizioli, J., Catteruccia, F., della Torre, A., Reckmann, I., Muller, H.M., 2001. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *Eur. J. Biochem.* 268, 4027-4035.
- Wicher, K.B., Fries, E., 2006. Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 4168-73.
- Yan, J., Cheng, Q., Li, C., Aksoy, S., 2001. Molecular characterization of two serine proteases expressed in gut tissue of the African trypanosome vector, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Mol. Biol.* 10, 47–56
- Yassin, A.F., 2005. *Rhodococcus triatoma* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1575-1579.