Carlos Felipe Tasso Filietaz

Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Rios Lopes

Versão original

RESUMO

FILIETAZ, C. F. T. Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As lipases (3.1.1.3) catalisam a hidrólise de triacilgliceróis resultando na liberação de ácidos graxos. Pouco se sabe sobre a digestão de lipídeos em artrópodes. Mosquitos e carrapatos são os principais artrópodes vetores de doenças humanas. O objetivo desse trabalho foi estudar as enzimas envolvidas na digestão de lipídeos no mosquito Aedes aegypti na fase larval e adulta e no carrapato Amblyomma cajennense, vetores de Dengue e da Febre Maculosa Brasileira respectivamente. A caracterização enzimológica envolveu a identificação, determinação de propriedades gerais como massa molecular, pH ótimo, estabilidade térmica e ao pH, especificidade frente a substratos distintos, o isolamento cromatográfico e o estudo da expressão das lipases digestivas possibilitando comparações entre as duas fases de desenvolvimento de Ae. aegypti e entre os dois vetores hematófagos. As lipases estudadas apresentaram pHs ótimos na faixa de 8,5 a 9,0 indicando que estas enzimas pertencem a família das lipases neutras. Estas lipases apresentam ampla faixa de estabilidade ao pH e são relativamente estáveis em altas temperaturas. A caracterização da atividade destas lipases com a utilização de diferentes substratos evidenciou que estas enzimas apresentam maior eficiência hidrolítica sobre substratos de cadeias carbônicas curtas como butirato e heptanoato. Contudo, estes resultados indicam que as enzimas envolvidas na digestão de lipídeos nas duas fases desenvolvimento de Aedes aegypti são distintas. A enzima da fase larval apresenta uma maior afinidade por substratos de cadeias longas. Entretanto, a catálise desta reação é baixa resultando em uma baixa eficiência catalítica enquanto a lipase de adulto apresenta uma afinidade e velocidade de catálise menores quanto maior o substrato. Separações cromatográficas, efeito de pH e temperatura e efeitos de íons sobre a atividade destas lipases em estudo corroboram o dado de que as lipases das diferentes fases desenvolvimento de Aedes aegypti são distintas. O estudo combinado do genoma de Aedes aegypti e PCR semi quantitativo comprovaram a expressão diferencial destas enzimas indicando ainda tratar-se de uma família multigênica envolvida na expressão de lipases digestivas provavelmente reguladas pela dieta. Estudos de modelagem molecular mostram diferenças estruturais importantes entre as lipases de mamífero e artrópodes principalmente relacionadas à diferenças das regiões de regulação da atividade enzimática e de interação com cofatores como a colipase de mamíferos. A comparação dos modelos estruturais indica diferenças mesmo entre as lipases de diferentes espécies de artrópodes. Os dados obtidos neste trabalho bem como dados da literatura indicam que além da função digestiva e obtenção de ácidos graxos essenciais as lipases podem estar envolvidas em defesa contra patógenos, abrindo novas perspectivas para o estudo destas enzimas.

Palavras-chave: Lipase. Digestão. Enzimas. *Aedes aegypti. Amblyomma cajennense*.

.

ABSTRACT

FILIETAZ, C. F. T. Characterization of lipid digestion in hematophagous vectors and the physiological role of lipases. 2011. 99 p. Masters thesis (Biology of Host-Pathogen Relationship) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Lipases (EC 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis of triacylglycerol releasing fat acids and glycerol as products of this reaction. There is little information about Arthropoda digestive lipase. Mosquitoes and ticks are the main vectors of human diseases. This work aimed to comprehend lipid digestion in the mosquito Aedes aegypti (larva and adult fed females) and in the tick Amblyomma cajennense, vectors of Dengue and Rock Mountain Spotted Fever respectively. Enzymatic characterization involved the identification of lipase activity, moleculas mass measurement, pH optimum, thermal and pH stability and substrate specificity with the use of different substates, chromatographic separation and lipase expression in different mosquitoes tissues. All these measures allowed the comparison of lipases between larva and adult female from Aedes aegypti and also the comparison of the two hematophagous vectors. Studied lipases presented pH optimum in a range between 8.5 and 9.0 suggesting that these enzymes belong to the neutral lipase family. These lipases are very stable to different pH and high temperatures. The use of different substrates revealed that these enzymes hydrolysis short substrates as butyrate and heptanoate more efficiently than larger ones. However, the analysis of enzyme affinity to distinct substrates and hydrolysis indicated that enzymes involved in lipid digestion from mosquitoes in both development stages are different. Larval lipase presents higher affinity to longer substrates. However, the catalysis is a slow step of this reaction resulting in a low catalytic efficiency. Adult lipase binds and hydrolysis smaller substrates better than the larger ones. Chromatographic separation, pH effects on lipase activity, temperature stability and ion activation corroborate the data suggesting that enzymes involved in lipid digestion in larvae and female mosquitoes are different. Studies of Aedes aegypti genome and semi-quantitative PCR also demonstrated differentially expressed lipases also indicating that lipases are products of a multigenic family which expression is probably regulated by diet. Molecular modelling of showed important differences between mammalian and Arthropoda lipases mainly in domains involved in activity control and binding to cofactors as mammalian colipase. Comparison of Arthropoda lipase models indicated differences also between these lipases probably related to an early differentiation of lipase during evolution. Data on the present work and on literature point to additional functions to digestive lipase besides essential fat acids uptake, for example, as enzymes involved in defense against pathogens, opening new possibilities to lipase studies.

Keywords: Lipase. Digestion. Enzymes. *Aedes aegypti. Amblyomma cajennense*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância do filo Arthropoda: benefícios e malefícios na interação homem-artrópode

Mais de 80% de todas as espécies descritas nos ecossistemas terrestres, de água doce e marinho são do filo Arthropoda, sendo o filo mais diverso quando comparado com qualquer outro táxon animal. Dentre a imensa gama de animais pertencentes a esse filo podemos citar aranhas, carrapatos, besouros, mosquitos, camarões dentre muitos outros animais. Nenhum outro grupo de invertebrados se aproxima da importância ecológica e econômica deste grupo.

Tamanha diversidade e representatividade em biomassa não poderia ser indiferente ao homem. Algumas espécies de artrópodes são essenciais para a manutenção da vida no ambiente terrestre pelo seu envolvimento em processos de polinização, aeração do solo, decomposição de resíduos e fertilização do solo. Consequentemente, estes processos são benéficos ao homem. Outros exemplos são o da nutrição direta (caranguejos, lagostas e camarões) ou de produtos como o mel e a seda (GRIMALDI e ENGEL, 2005; RESH e CARDE, 2009). Entretanto, muitas espécies de artrópodes são os principais vetores de doenças que afetam diretamente o homem. Os artrópodes também são vetores de doenças animais e vegetais. Além disso, praticamente 50% dos artrópodes são fitófagos sendo as principais pragas agrícolas com consequente perda de aproximadamente 37% da produção de alimentos em todo o mundo mesmo com a utilização de estratégias de controle (HAQ; ATIF; KHAN, 2007). Todos estes problemas levam a grandes investimentos, da ordem de bilhões de dólares anuais, em políticas de saúde pública e em estratégias de controle tornando os artrópodes problemas de saúde e política públicas e econômicos.

Os principais artrópodes vetores de doenças humanas são mosquitos (Insecta) e carrapatos (Arachnida) (PAROLA e RAOULT, 2001), o que levou a escolha dos dois animais modelo utilizados neste estudo: o mosquito *Aedes aegypti* e o carrapato *Amblyomma cajennense*.

A ampla diversidade de espécies de artrópodes permitiu a colonização dos mais diversos nichos ecológicos. O sucesso desta ocupação certamente incluiu a

seleção de distintas adaptações em relação à dieta e digestão nestes animais. Portanto, um importante foco de estudo para a compreensão da fisiologia destes animais e da interação vetor – patógeno- hospedeiro é o sistema digestório dos vetores Arthropoda.

1.2 Amblyomma cajennense: o vetor modelo Arachnida

Os carrapatos estão distribuídos em praticamente todas as regiões do planeta e são responsáveis por uma grande variedade de doenças causadas por uma ampla gama de agentes patogênicos, que incluem protozoários, vírus, bactéria e fungos. Somado as infecções causadas por microorganismos, carrapatos podem causar paralisia, alergias e reações tóxicas severas em seus hospedeiros sendo que muitas dessas reações podem levar a morte. As perdas econômicas mundiais causadas por carrapatos apenas em criações de gado são estimadas em mais de 87 bilhões (RESH e CARDÉ, 2009).

O carrapato *Amblyomma cajennense* (Figura 1) está amplamente distribuído em áreas neotropicais do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, incluindo as Ilhas Caribenhas. Capivaras e antas são os hospedeiros primários do carrapato *Amblyomma cajennense* na América do Sul. Após a introdução dos cavalos na América Latina no período da colonização européia, o *Amblyomma cajennense* se tornou uma praga para estes animais, que se tornaram hospedeiros primários para todos os estágios do ciclo do parasita (LABRUNA et al., 2002).

O carrapato *Amblyomma cajennense* possui um ciclo trioxeno de desenvolvimento, ou seja, tem que se alimentar de pelo menos três hospedeiros para que possa completar o seu desenvolvimento. Sob condições naturais, o carrapato *Amblyomma cajennense* produz uma geração por ano (condições da região sudoeste). Entretanto, o ciclo de vida desta espécie pode variar de região para região e está associado ao comportamento de diapausa das larvas e temperatura do solo (LABRUNA et al., 2003).

O carrapato *Amblyomma cajennense* é o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, que é o agente da Febre Maculosa Brasileira (DEL FIOL et al., 2010; BRASIL, 2010).



Figura 1 - Fêmea do carrapato *Amblyomma cajennense* na fase adulta de desenvolvimento, em (A) podemos observar o carrapato antes da alimentação sanguínea e em (B) podemos observar a fêmea de carrapato após este processo.

Fonte: A) Genesio, 2009; B) Policlínica veterinária de Cotia, 2011.

A febre maculosa brasileira é causada por uma bactéria gram negativa *Rickettsia rickettsii*, a qual é um parasita intracelular obrigatório alojando-se no citoplasma dos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados que a transmitem. A febre maculosa ocorre em países ocidentais, particularmente nos Estados Unidos, Canadá, México, Panamá, Costa Rica, Argentina, Colômbia e Brasil. No Brasil a maioria dos casos se concentra na região Sudeste, com casos esparsos no sul do Brasil. A maior prevalência coincide com a presença do principal vetor, o carrapato *Amblyomma cajennense*.

A transmissão da *Rickettsia* se dá pela picada do carrapato em qualquer uma das fases do desenvolvimento (larva, ninfa e adulto). O carrapato transmite o microorganismo por meio de suas glândulas salivares. Após entrar na célula do hospedeiro humano, o microorganismo alcança o citoplasma onde se multiplica por fissão binária com tempo de replicação de aproximadamente 10 minutos. Com a penetração nas células endoteliais humanas, ocorre uma resposta inflamatória aguda, mediada pela produção de citocinas, resultando em aumento de permeabilidade vascular.

O estado de São Paulo corresponde sozinho por 45,1% de todos os casos notificados no país (1997 a 2009). A taxa de mortalidade no Brasil, de 20 a 30%, é considerada alta. A alta taxa de mortalidade está intimamente associada à dificuldade de realização do diagnóstico, o que leva a descoberta tardia da doença dificultando o tratamento (DEL FIOL et al., 2010).

1.3 Aedes aegypti: o vetor modelo Insecta

O principal problema relacionado à manutenção de populações do mosquito *Aedes aegypti*, se deve ao fato de ele ser o vetor de duas arboviroses de grande importância em saúde pública: a febre amarela e a dengue.

Acredita-se que o mosquito *Aedes aegypti* (Figura 2 e Figura 3) tenha migrado para o continente americano da região oeste do continente africano por volta dos séculos XVI ao XVIII a bordo de navios negreiros, e tendo nos dias de hoje uma ampla distribuição geográfica (LOUNIBOS, 2002).

O mosquito está intimamente associado com a presença humana tanto pelas condições necessárias para a sua reprodução favorecidas no ambiente peridomiciliar pela urbanização desordenada e políticas de infraestrutura e

saneamento básico como por ser o homem o seu hospedeiro preferencial (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001).

As fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti* têm como principal fonte protéica a alimentação sanguínea, que é necessária para o processo de oogênise (desenvolvimento do ovo), bem como para ser utilizada como fonte de energia para o vôo. A fêmea adulta pode se alimentar de múltiplos hospedeiros humanos durante um único ciclo gonotrófico (FORATTINI, 2002). A contaminação de um destes hospedeiros levará à contaminação do mosquito dado que este arbovírus entra no mosquito com a alimentação de sangue, portanto através do intestino médio. O vírus inicialmente replica nas células epiteliais constituintes do intestino médio e após este processo há um processo de dispersão por outros tecidos do inseto inclusive as glândulas salivares. Após a replicação viral nas glândulas salivares e a conseqüente contaminação da saliva destes animais é que as partículas virais serão injetadas em um novo hospedeiro (STEINERT e LEVASHINA, 2011).



Figura 2 – Larva do mosquito *Aedes aegypti*, no quarto estádio de desenvolvimento (L4). Fonte: Wikipedia, 2008.



Figura 3 – Fêmea do mosquito *Aedes aegypti* na fase adulta de desenvolvimento. (A) Fêmea deste mosquito antes da alimentação sanguínea e (B) fêmea durante o processo de alimentação sanguínea já parcialmente ingurgitada. Fonte: A) De Freitas, 2009; B) Jornal do Pontal, 2009.

O mosquito Aedes aegypti não necessita de grandes coleções de água para sua reprodução, colocando seus ovos em qualquer recipiente que contenha água limpa. Os ovos são colocados nas paredes de recipientes que possam acumular água e são resistentes a dessecação, podendo permanecer viáveis por meses até eclodirem quando submersos em água (FORATTINI, 2002).

1.3.1 Febre amarela

O vírus causador da febre amarela é um flavivirus (Flaviridae: Flavivirus), provavelmente de origem africana como indicado por estudos filogenéticos, sendo que a disseminação deste vírus no continente americano ocorreu durante o comércio de escravos, no início do século XVI (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007).

Até o início do século XX ocorreram muitas epidemias de febre amarela em cidades da América do Norte e do Sul, associadas ao mosquito *Aedes aegypti*. Neste período houve uma intensa campanha de erradicação do mosquito, com o amplo uso de DDT, o que fez com que a doença desaparecesse dos centros urbanos (KYLE e HARRIS, 2008). Com a descontinuidade das medidas de controle o mosquito reemergiu resultando no reaparecimento do ciclo zoonótico da febre amarela, culminando na re-emergência dos casos de dengue nesse mesmo período na América do Sul. A expansão epidêmica do vírus na Ásia e nas Américas, e a re-emergência dos mosquitos em centros urbanos podem aumentar as chances do estabelecimento de um ciclo endêmico permanente (MUTEBI et al., 2004; WEAVER e REISEN, 2010).

A cepa africana ainda mantém a capacidade de desenvolver seu ciclo em centros urbanos e, consequentemente, gerar epidemias, o que resulta em dezenas de milhares de casos notificados anualmente no continente africano (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007). As epidemias africanas ainda ocorrem apesar da existência de uma vacina efetiva (17DD), desenvolvida em 1937 (MONATH, 1988).

1.3.2 Dengue

A dengue é, dentre as doenças transmitidas por artrópodes, a mais comum no mundo (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2009). Essa doença é endêmica em mais de 100 países em regiões como a África, as Américas, o Leste Europeu, o Sudeste Ásiatico e o Oeste do Pacífico. Existem quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV) e cada um desses sorotipos pode causar os sintomas da doença que vão desde a febre de dengue acompanhada de fraqueza, dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue (World Health Organization, 2010).

A infecção por um sorotipo confere a imunidade contra o mesmo, mas não contra os outros sorotipos. Tem sido observado que uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo é um fator de risco para o desenvolvimento da dengue hemorrágica que pode levar ao choque de dengue (KYLE e HARRIS, 2008). Acredita-se que os anticorpos gerados em uma primeira infecção direcionam as partículas do vírus para células que carregam receptores Fc (FcR), dentre essas células estão monócitos, macrófagos e células dendríticas, que são alvos naturais para o vírus. Como a ligação anticorpo-vírus é de baixa afinidade, o vírus não é inativado, portanto, esse direcionamento por FcR promove um aumento da infecção dessas células, resultando em uma ativação extensiva de células T e consequentemente na liberação de altos níveis de citocinas e mediadores químicos. Essa liberação leva a um dano no endotélio celular e extravasamento do plasma (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

A dengue infecta 50 a 100 milhões de indivíduos anualmente (WHO, 2011). Tem sido observado um grande crescimento do número de pacientes que tem apresentado a forma mais severa da doença a dengue hemorrágica e o choque de dengue que tem uma estimativa de 500,000 casos anuais.

1.4 O sistema digestório em Artrópodes

O tubo digestivo dos artrópodes pode ser dividido em três regiões: Intestino anterior, médio e posterior (Figura 4). O intestino anterior e o posterior são derivados da ectoderme sendo revestidos de epiderme e cutícula. Somente a porção média do sistema digestório tem origem endodérmica. Na maioria dos insetos o intestino médio é revestido por uma membrana quitino-proteíca denominada de membrana

peritrófica. A presença de membrana peritrófica também já foi descrita em carrapatos. No entanto, não existem informações suficientes para a compreensão do papel fisiológico da membrana peritrófica nestes animais (COONS e ALBERTI, 1999; RUDZINSKA et al., 1982). O intestino anterior é responsável pela ingestão, armazenamento e processamento inicial do alimento prévio a digestão química. O intestino médio tem como funções a secreção de enzimas, a hidrólise e a absorção do alimento ingerido, absorção e secreção de água. O intestino posterior é responsável pela formação e armazenamento de fezes e pela reabsorção de água (TERRA e FERREIRA, 1994). O intestino constitui a primeira barreira de defesa contra a invasão de patógenos, essa barreira pode ser física (invasão das células epiteliais) ou química devido à presença das enzimas digestivas e da presença de inibidores enzimáticos (BATON e RANFORD-CARTWRIGHT, 2007). A compreensão deste sistema tem auxiliado no desenvolvimento de estratégias de controle. Encontramos na literatura diversas estratégias de controle que tem o sistema digestório como alvo: uso de toxinas como as de Bacillus thurigiensis (SOBERON et al., 2007), uso de RNA de interferência (GU et al., 2011), uso de inibidores enzimáticos, hormônios de crescimento para intervir na fisiologia do animal e viroses direcionadas ao estágio larval (GORDON e WATERHOUSE, 2007; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010; SPERANÇA e CAPURRO, 2007). Muitos patógenos se alojam nas células intestinais ou tem que passar por elas em algum momento para penetrar no animal, ficando dessa forma expostos às enzimas digestivas. As enzimas têm um papel fundamental no processo de digestão, o que é refletido na extensa literatura bioquímica encontrada para hidrolases digestivas (TERRA e FERREIRA, 2005). O grupo das hidrolases mais estudado é o das enzimas proteolíticas e seus inibidores. Contudo, pouco se sabe sobre a digestão de lipídeos em artrópodes e sobre as características das lipases digestivas presentes nos animais estudados.

O intestino de carrapatos da família Ixodidae (Figura 5) é composto por células complexas, possuindo diferentes organelas e diversas inclusões citoplasmáticas que refletem a atividade multifuncional do intestino médio desses animais, caracterizada por funções como armazenamento de alimento, regulação de água e íons, excreção e nutrição (COONS e ALBERTI, 1999). O intestino médio das fêmeas de *Amblyomma cajennense* sofrem grandes mudanças durante o período de alimentação. Apesar da intensa mudança estudos indicam que que algumas células

permanecem intactas (organelas preservadas) e existe a evidência de secreção de vesículas, o que provavelmente esta ligado a secreção de enzimas (CAPERUCCI; BECHARA; MATHIAS, 2010).

O intestino médio de *Aedes aegypti* larva (Figura 6) consiste em um simples tubo com uma camada única composta por células colunares, que possuem microvilosidades e citoplasma com presença abundante de mitocôndrias. Sua estrutura e função não difere muito de outros culicideos (CLARK et al., 2005). Em fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti* o intestino médio (Figura 7) é revestido de uma membrana peritrófica do tipo 1, que modula a digestão do sangue e protege o epitélio de danos físicos e químicos (KATO et al., 2008).

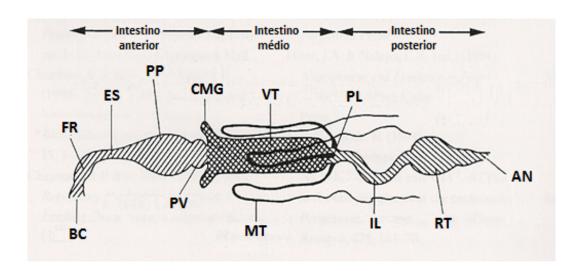


Figura 4 – Representação esquemática do sistema digestório dos insetos: (BC) Boca, (FR) Faringe, (ES) Esôfago, (PP) Papo, (PV) Proventrículo, (CMG) Ceco do Intestino médio, (VT) Ventrículo, (MT) Túbulos de Malpighi, (PL) Piloro, (IL) Íleo, (RT) Reto e (AN) Ânus. Diagrama mostrando as subdivisões em um inseto generalizado. Fonte: Chapman (1998).

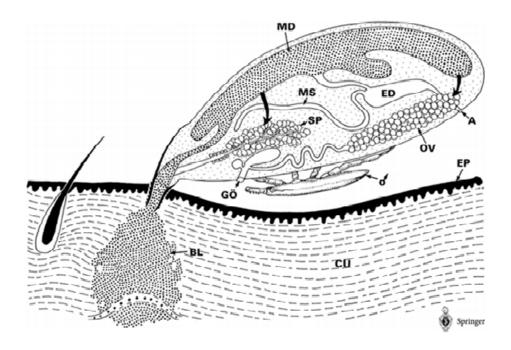


Figura 5 – Canal alimentar *Ixodes*. Representação do canal alimentar dos carrapatos: (BL) Lesão; (CU) Cutis; (EP) Epiderme; (GO) Abertura genital; (OV) Ovário; (SP) Glândula salivar; (MD) Intestino médio; (MS) Túbulos de Malphigui; (ED) Intestino posterior. Diagrama mostrando as subdivisões em carrapatos. Fonte: Mehlhorn (2001).

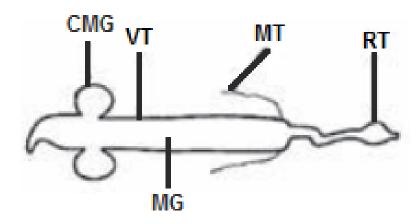


Figura 6 – Representação esquemática do sistema digestório de larvas de *Aedes aegypti*: (CMG) Ceco do Intestino médio, (VT) Ventrículo, (MT) Túbulos de Malpighi, (MG) Intestino médio e (RT) Reto.
Fonte: Resh e Cardé (2009).

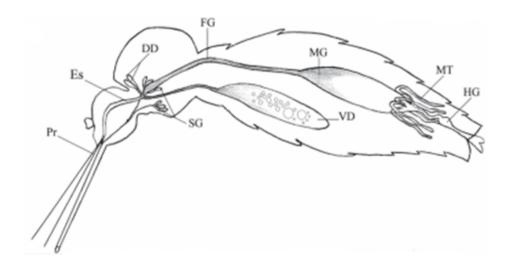


Figura 7 – Representação esquemática do sistema digestório de adultos de *Aedes aegypti*: (DD) Diverticulos, (FG) Intestino anterior, (HG) Intestino posterior, (MG) Intestino médio, (MT) Túbulos de Malpighi, (ES) Esôfago, (Pr) Probóscide, (SG) Glândula salivar e (VD) Ventrículo ventral. Fonte: Gusmão (2007).

1.5 Lipases

Lipídeos apresentam uma série de papéis no metabolismo e estrutura celulares como a composição de membranas, fonte e manutenção energética e precursores para síntese de hormônios e outras moléculas. Em insetos, os lipídeos são acumulados no corpo gorduroso e estão envolvidos na metamorfose, reprodução, vôo e produção de hidrocarbonetos cuticulares que são precursores da síntese de feromônios (ARRESE e SOULAGES, 2010; HAHN e DENLINGER, 2007; HORNE; HARITOS; OAKESHOTT, 2009). Assim como os insetos os carrapatos apresentam grandes reservas de lipídeos no corpo gorduroso (COONS e ALBERTI, 1999).

Os ácidos graxos poli-insaturados, essenciais para muitos artrópodes, são obtidos exclusivamente da digestão dos lipídeos da dieta (CANAVOSO et al., 2001). O principal componente lipídico presente na dieta são os triacilgliceróis (TAG), que são também a principal forma de armazenamento de ácidos graxos em insetos e aracnídeos (ARRESE et al., 2001). Após a alimentação os TAGs são hidrolisados no lúmen do intestino médio, os produtos da digestão são absorvidos e utilizados para a síntese de lipídeos como TAGs, diacilgliceróis (DAGs) e fosfolipídios (FP) (CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004).

Lipases (EC 3.1.1.3.) são triacilglicerol hidrolases que clivam ligações ester carboxílicas gerando glicerol e ácidos graxos. Outros produtos como diacilgliceróis, galactolipídeos e fosfolipídeos também podem ser formados, evidenciando assim o papel da lipase como enzima chave no processamento de lipídeos. Em mamíferos, vários passos podem ser distintos no processamento de lipídeos ingeridos na dieta incluindo a emulsificação destas moléculas, hidrólise e formação de micelas e finalmente a absorção pelos enterócitos. A emulsificação dos lipídeos tem início com a lipase lingual e gástrica (MILED et al., 2000; MU e PORSGAARD, 2005). A hidrólise deste substrato é continuada no duodeno pela lipase pancreática ativada na presença da colipase. A formação de micelas e absorção pelos enterócitos ocorre ainda no duodeno.

Todas as lipases pertencem ao grupo estrutural das α/β hidrolases e estão subdivididas em 6 famílias definidas por suas estruturas primárias já descritas. Estas são as lipases neutras, ácidas, lipase2, lipase3, GDSL e lipases sensíveis a hormônio (DEREWENDA, 1994; HOLMQUIST, 2000). Todas as seis famílias apresentam o mesmo mecanismo de reação em dois passos com base em uma tríade catalítica. A serina reativa essencial para a catálise encontra-se em uma sequência compartilhada por todas as lipases: Gly-X-Ser-X-Gly. Além do resíduo de Ser 152 (numeração da lipase pancreática humana) catalítico, estão também envolvidos neste processo dois outros resíduos constituintes da tríade catalítica: um resíduo de His (His 263) e um resíduo de Asp (Asp 176). A estrutura por difração de raio X da lipase pancreática humana (WINKLER; D'ARCY; HUNZIKER, 1990) revelou que estas enzimas apresentam dois domínios: um grande domínio Nterminal (resíduos 1-336) e um domínio pequeno C-terminal (resíduos 337-449) (Figura 8). O domínio N-terminal pertence ao grupo estrutural das α/β hidrolases e contém o sítio ativo com a tríade catalítica. Esta tríade catalítica é quimicamente análoga à tríade originariamente descrita em serino-endopeptidases como quimotripsina, mas é estruturalmente distinta. A atividade da lipase pancreática em mamíferos é dependente de um cofator protéico, a colipase. O domínio C-terminal da lipase apresenta uma estrutura em sanduícheβ o qual é importante para a ligação à colipase. Na ausência de micelas, o sítio ativo das lipases é coberto por uma alca denominada "lid" (tampa). Entretanto, na presença de micelas, a tampa sofre uma reorganização estrutural que expõem o sítio ativo da enzima formando uma superfície hidrofóbica na entrada do sítio ativo. Esse padrão hidrofóbico é importante para a ligação da colipase (THOMAS et al., 2005).

A ligação da colipase ao domínio C-terminal amplia a plataforma hidrofóbica, auxiliando na ligação ao substrato. Além disso, a colipase forma três pontes de hidrogênio com a tampa estabilizando-a na posição que mantém a enzima ativa. As informações correntes disponíveis na literatura estão principalmente baseadas em lipases de mamíferos.

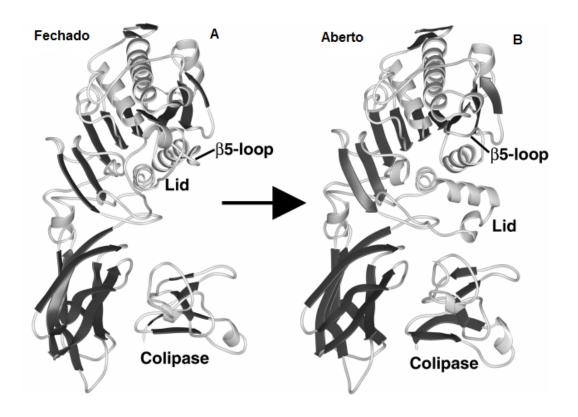


Figura 8 – Estrutura do complexo lipase pancreática humana e colipase em duas diferentes conformações: A) conformação fechada e B) conformação aberta. A porção globular, domínio N-terminal contém a lid (tampa) e a alça β5, a alça β9 não está indicada. A colipase se liga ao domínio C-terminal. Fonte: Lowe, 2002.

1.6 Lipases em artrópodes vetores e não vetores

O conhecimento sobre as lipases digestivas de invertebrados é bastante reduzido quando comparado ao estudo das lipases presentes em vertebrados. A atividade de lipase já foi medida em preparações brutas em algumas espécies de

artrópodes como Homarus americanus (Crustacea) (BROCKERHOFF; HOYLE; HWANG, 1970), Locusta migratoria (Orthoptera) (WEINTRAUB e TIETZ, 1973), Aedes aegypti (Diptera) (GEERING e FREYVOGEL, 1975), Periplaneta americana (BOLLADE; PARIS; MOULINS, 1970; HOFFMAN e DOWNER, 1979), Manduca sexta (TSUSHIDA e WELLS, 1988), Drosophila melanogaster (Diptera) (SMITH et al., 1994), Spilosoma obliqua (Lepidoptera) (ANWAR e SALEEMUDDIN 1997), Rhodnius prolixus Hemiptera (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007), Lymantria dispar (Lepidoptera) (MRDAKOVIC et al., 2008), Epiphyas postvittana (Lepidoptera) (CHRISTELLER et al., 2010), Hermetia illucens (Diptera) (KIM et al., 2011) e Neohelice granulata (Crustacea) (PINONI; IRIBARNE; LOPEZ MANANES, 2011). Algumas lipases presentes em artrópodes foram detectadas e isoladas, como é o caso das lipases presentes no intestino de Periplaneta americana e Locusta migratoria (MALE e STOREY, 1981), da lipase presente no suco digestivo da mariposa Bombyx mori (Lepidoptera) que apresentou uma forte atividade antiviral (PONNUVEL et al., 2003), da lipase do escorpião Scorpio maurus que foi purificada a partir do hepatopâncreas deste animal assim como a lipase do caranguejo Carcinus mediterraneus (Crustacea) (CHERIF et al., 2007).

Recentemente Horne et al. (2009) compilaram dados dos genomas de Anopheles gambiae, Drosophila melanogaster, Apis mellifera, Bombyx mori e Tribolium castaneum e realizaram um estudo comparativo das seis famílias de lipases nestas espécies de insetos holometábolos. Os autores observaram que os insetos não apresentam lipase do tipo 2, apresentam poucas copias de Lipase3, GDSL e lipase sensível a hormônio e apresentam um maior número de cópias de lipases ácidas e neutras. Outra verificação foi a de que muitas cópias das lipases tanto ácidas quanto neutras não apresentam a tríade catalítica e, portanto, não apresentam atividade lipolítica provavelmente estas proteínas estão relacionadas a outras funções como ligação a lipídeos e reserva de energia durante o desenvolvimento. Além disso, foi possível observar diferenças estruturais dentre as lipases neutras de insetos e as lipases neutras de mamíferos. Através das análises estruturais combinadas a estudos de caracterização de especificidade sobre diferentes substratos realizados com lipases de mamíferos foi possível indicar papeis fisiológicos para as diferentes lipases encontradas nos insetos. Estes estudos, no entanto, analisaram apenas as sequencias das lipases de alguns artrópodes sem os dados enzimológicos.

Os resultados enzimológicos e de análise de sequencias apresentados nesta dissertação colaboram com a compreensão do processo digestivo de lipídeos em outros dois artrópodes: o mosquito *Aedes aegypti* e o carrapato *Amblyomma cajennense* sendo ainda complementados com a análise do genoma de *Ixodes scapularis* quanto à presença de lipase.

2 CONCLUSÕES

A atividade de lipases digestivas foi identificada e medida em dois animais vetores modelos: o mosquito *Aedes aegypti* (fase larval e adulta) e o carrapato *Amblyomma cajennense*.

A caracterização destas enzimas quanto à especificidade de hidrólise de diferentes substratos, massa molecular, pH ótimo, estabilidade térmica e ao pH e separação por diferentes técnicas cromatográficas demonstrou que as lipases presentes nas diferentes fases de desenvolvimento do mosquito Aedes aegypti são enzimas distintas; produtos de genes específicos que fazem parte de uma família multigênica de lipases digestivas, cuja expressão é provavelmente controlada por componentes da dieta como já demonstrado para lipases digestivas de outros insetos. A expressão de diferentes genes pode estar também relacionada às diferentes condições do microambiente formado no lúmen do intestino médio nas duas fases de desenvolvimento: extremamente alcalino na fase larval e mais próximo da neutralidade na fase adulta. Já as enzimas dos dois hematófagos em estudo se mostraram bastante distintas. No entanto, o isolamento destas enzimas está sendo provavelmente afetado pela presença de enzimas proteolíticas tanto do tipo tripsinas e quimotripsinas (presentes tanto na fase larval quanto adulta de Aedes aegypti) como por enzimas do tipo catepsina L presentes no intestino de carrapatos como é o caso de Amblyomma cajennense.

REFERÊNCIAS1

- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline-pH-acting digestive enzymes of the polyphagous insect pest *Spilosoma obliqua*: stabilityand potential as detergent additives. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 25, p. 43-46, 1997.
- ARRESE, E. L.; CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; PENNINGTON, J. E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 7-17, 2001.
- ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, p. 195-201, 2006.
- AOKI, J.; INOUE, A.; MAKIDE, K.; SAIKI, N.; ARAI, H. Structure and function of extracellular phospholipase A₁ belonging to the pancreatic lipasegene family. **Biochimie**, v. 89, p. 197-204, 2007.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.
- BOLLADE, D.; PARIS, R.; MOULINS, M. Origine et mode d'action de la lipase intestinale chez les blattes. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, p. 45-53, 1970.
- BROCKERHOFF, H.; HOYLE, R. J.; HWANG, P. C. Digestive enzymes of the American Lobster (*Homarus americanus*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 27, p. 1357–1370, 1970.
- BOURNE, Y.; MARTINEZ, C.; KERFELEC, B.; LOMBARDO, D.; CHAPUS, C.; CAMBILLAU, C. Horse pancreatic lipase. The crystal structure refined at 2.3 A resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 238, p. 709, 1994.
- BILLKER, O.; MILLER, A. J.; SINDEN, R. E. Determination of mosquito bloodmeal pH *in situ* by ion-selective microlectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis. **Parasitology**, v.120, p. 547-551, 2000.
- BATON, L. A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Morphological evidence for proliferative regeneration of the *Anopheles stephensi* midgut epithelium following *Plasmodium falsiparum* ookinete invasion. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 244-254, 2007.
- BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. 0668-0673, 2007.

¹ De acordo com.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: www.saude.gov.br/svs> Acesso em: 07 maio 2011.
- COONS, L. B.; ALBERTI, G. Acari: Ticks. In: HARRISON, F. W.; FOELIX, R. F. **Microscopic anatomy of invertebrates:** Chelicerate arthropoda. New Jersey: J.Wiley & Sons, 1999. v. 8, pt. B. p. 373-398.
- CARRIÈRE, F.; RENOU, C.; LOPEZ, V.; DE CARO, J.; FERRATO, F.; LENGSFELD, H.; DE CARO, A.; LAUGIER, R.; VARGER, R. The specific activities of human digestive lipases measured from the *in vivo* and *in vitro* lipolysis of test meals. **Gastroenterology**, v. 119, p. 949-960, 2000.
- CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 23-46, 2001.
- CHOI, S-J.; HWANG, J. M.; KIM, S. A. Colorimetric Microplate Assay Method for High Throughput Analysis of Lipase Activity. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 417-420, 2003
- CANAVOSO, L. E.; FREDE, S.; RUBIOLO, E. R. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 845-854, 2004.
- CLARK, T. M.; HUTCHINSON, M. J.; HUEGEL, K. L.; MOFFETT, S. B.; MOFFETT, D. F. Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Tissue and Cell**, v. 37, p. 457-468, 2005.
- CHERIF, S.; FENDRI, A.; MILED, N.; TRABELSI, H.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Crab digestive lipase acting at high temperature: Purification and biochemical characterization. **Biochimie**, v. 89, p. 1012-1018, 2007.
- CHEMICAL BOOK. 4-Methylumbeliferil oleate, butirate, heptanoate and stearate. 2008. Disponível em: http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=4-Methylumbelliferyl%20oleate Acesso em: 13 Oct 2011.
- CAPERUCCI, D.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. **Micron**, v. 41, p. 710-721, 2010.
- CHRISTELLER, J. T.; POULTON, J.; MARKWICK, N. M.; SIMPSON, R. M. The effect of diet on the expression of lipase genes in the midgut of the lightbrown apple moth (*Epiphyas postvittana* Walker; Tortricidae). **Insect Molecular Biology**, v. 19, p. 9-25, 2010.

- DEREWENDA, Z. S. Structure and function of lipases. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 1-52, 1994.
- DE FREITAS, M. T. *Aedes aegypti.* 2009. Disponível em: http://www.djibnet.com/photo/mosquito/aedes-aegypti-3707897327.html Acesso em: 20 de Set 2011.
- DEL FIOL, F. S.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 461-466, 2010.
- FORATTINI, O. P. Aedes (Stegomyia). In:_____. Culicidologia médica. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2. p. 462-463,
- FILIETAZ, C. F. T.; LOPES, A. R. Caracterização de lipases em Arthropoda. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 2, p. 23-36, 2010.
- GEERING, K.; FREYVOGEL, T. A. Lipase activity and stimulation mechanism of esterase en midgut of female *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, p. 1251-1256, 1975.
- GRAF, R.; BRIEGEL, H. Isolation of trypsin isozymes from the mosquito *Aedes aegypti* (L.). **Insect Biochemistry**, v. 15, p. 611–618, 1985.
- GRAF, R.; BRIEGEL, H. The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) and *in vitro* stimulation in isolated midguts. **Insect Biochemistry**, v. 19, p. 129-137, 1989.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the Insects**. New York: Cambridge University Press; 2005. p. 3; 5, Diversity and Evolution.
- GORDON, K. H.; WATERHOUSE, P. M. RNAi for insect-proof plants. **Nature biotechnology**, v. 25, p. 1231-1232, 2007.
- GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 579–588, 2007
- GUSMÃO, D. S.; SANTOS, A. V.; MARINI, D. C.; RUSSO, E. S.; PEIXOTO, A. M. D.; JÚNIOR, M. B.; BERBET-MOLINA, M. A.; LEMOS, F. J. A. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culidae): new perspectives for insect-bacteria association. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 919–924, 2007.
- GENESIO, J. Cancer Research. 2009. Disponível em: https://naturalunseenhazards.wordpress.com/tag/cancer-research/ Acesso em: 20 Sep 2011.
- GU, J.; LIU, M.; DENG, Y.; PENG, H.; CHEN, X. Development of an efficient recombinant mosquito densovirus-mediated RNA interference system and its

- preliminary application in mosquito control. **PLoS ONE**, v. 6, p. e21329, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0021329
- HOFFMAN, A. G. D.; DOWNER, R. G. H. End product specificity of triacylglycerol lipases from intestine, fat body, muscle and hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. **Lipids**, v. 14, p. 893-899, 1979.
- HENDRICKSON, H. S. Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes. **Analytical Biochemistry**, v. 219, p. 1-8, 1994.
- HIRATA, K.; DICHEK, H. L.; CIOFFI, J. A.; CHOI, S. Y.; LEEPER, N. J.; QUINTANA, L.; KRONMAL, G. S.; COOPER, A. D.; QUERTERMOUS, T. Cloning of a Unique Lipase from Endothelial Cells Extends the Lipase Gene Family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 14170-14175, 1999.
- HOLMQUIST, M. Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 1, p. 209-235, 2000.
- HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Jounal of Medical Entomology**, v. 38, p. 411–422, 2001.
- HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 760-773, 2007.
- HAQ, S. K.; ATIF S. M.; KHAN R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, p. 145-159, 2004.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782-798, 2009.
- HORNE, I.; HARITOS, V. S.; OAKESHOTT, J. G. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 39, p. 547-567, 2009.
- HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 593-608, 2010.
- JACKS, T. J.; KIRCHER, H. W. Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone. **Insect Biochemistry**, v. 21, p. 279-285, 1967.
- JORNAL do Pontal. Com o período de chuvas, a Secretaria Municipal de Saúde vem se preocupando com os casos de Dengue. 2009. Disponível em: http://www.jornaldopontal.com.br/index.php?ac=news&id=1963> Acesso em: 20 set. 2011.

- KUROOKA, S.; OKAMOTO, S.; HASHIMOTO, M. A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. **Journal of Biochemistry**, v. 81, p. 361-369, 1977.
- KIMURA, H.; FUTAME, Y.; TARUI, S.; SHINOMIYA, T. Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bili salts. **Journal of Biochemistry**, v. 92, p. 243-251, 1982.
- KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KÜNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D387-D392, 2009.
- KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual Review of microbiology**, v. 62, p. 71-92, 2008.
- KIM, W.; BAE, S.; PARK, K.; LEE, S.; CHOI, Y.; HAN, S.; KOH, Y. Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, p. 11-14, 2011.
- LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, p. 65-77, 2002.
- LOWE, M. E. The triglyceride lipases of the pancreas. **Journal of Lipid Research**, v. 43, p. 2007-2016, 2002.
- LOUNIBOS, L. P. Invasions by insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 233-266, 2002.
- LABRUNA, M. B.; AMAKU, M.; METZNER, J. A.; PINTER, A.; FERREIRA, F. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 170-178, 2003.
- LAWSON, D.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.; BESANSKY, N. J.; BRUGGNER, R. V.; BUTLER, R.; CAMPBELL, K. S.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRISTLEY, S.; DIALYNAS, E.; HAMMOND, M.; HILL, C.; KONOPINSKI, N.; LOBO, N. F.; MACCALLUM, R. M.; MADEY, G.; MEGY, K.; MEYER, J.; REDMOND, S.; SEVERSON, D. W.; STINSON, E. O.; TOPALIS, P.; BIRNEY, E.; GELBART, W. M.; KAFATOS, F. C.; LOUIS, C.; COLLINS, F. F. VectorBase: a data resource for invertebrate vector genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D583-D587, 2009.
- MALE, K. B.; STOREY, K. B. Triglyceride, diglyceride and monoglyceride lipases in *Periplaneta Americana*, *Locusta migratoria* and *Polia adjunct*. **Insect Biochemistry**, v. 11, p. 423-427, 1981.
- MONATH, T. P. Yellow Fever. In:_____ **The Arboviruses:** epidemiology and ecology. Florida: CRC Press; 1989. v. 5. p. 139–231.

- MICKEL, F. S.; WEIDENBACH, F.; SWAROVSKY, B.; LAFORGE, K. S.; SCHEELE, G. A. Structure of the canine pancreatic lipase gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 12895-12901, 1989.
- MILLER, S. S.; FULCHER, R. G.; ALTOSAAR, I. Evaluation of 4-Methylumbelliferyl heptanoate as a substrate for oat lipase. **Journal of Cereal Science**, v. 10, p. 61-68, 1989.
- MILED, N.; CANAAN, S.; DUPUIS, L.; ROUSSEL, A.; RIVIÈRE, M.; CARRIÈRE, F.; CARO, A.; CAMBILLAU, C.; VERGER, R. Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. **Biochimie**, v. 82, p. 973-986, 2000.
- MEHLHORN, H. **Encyclopedic reference of parasitology**. 2nd ed. Berlin: Springer: Verlag Heidelberg, 2001.
- MILED, N.; BUSSETTA, C.; DE CARO, A.; RIVIÈRE, M.; BERTI, L.; CANAAN, S. Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases. **Comparative Biochemistry Pysiology Part B**, v. 136, p. 131-138, 2003.
- MUELLER, J. L.; RIPOLL, D. R.; AQUADRO, C. F.; WOLFNER, M. F. Comparative structural modeling and inference of conserved protein classes in *Drosophila* seminal fluid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 13542-13547, 2004.
- MUTEBI, J. P.; GIANELLA, A.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever virus infectivity for Bolivian *Aedes aegypti* mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1657-1660, 2004.
- MU, H.; PORSGAARD, T. The metabolism of structured triacylglycerols. **Progress in Lipid Research**, v. 44, p. 430-448, 2005.
- MRDAKOVIC, M.; LAZAREVIC, J.; PERIC-MATARUGA, V.; IJIN, L.; VLAHOVIC, M. Partial characterization of a lipase from gypsy moth (*Lymantria dispar L.*) larval midgut. **Folia Biologica (Krakow)**, v. 56, p. 103-110, 2008.
- NENE, V.; WORTMAN, J. R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C.; TU, Z.; LOFTUS, B.; XI, Z.; MEGY, K.; GRABHERR, M.; REN, Q.; ZDOBNOV, E. M.; LOBO, N. F.; CAMPBELL, K. S.; BROWN, S. E.; BONALDO, M. F.; ZHU, J.; SINKINS, S. P.; HOGENKAMP, D. G.; AMEDEO, A.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BIDWELL, S.; BIEDLER, J.; BIRNEY, E.; BRUGGNER, R. V.; COSTAS, J.; COY, M. R.; CRABTREE, J.; CRAWFORD, M.; DEBRUYN, B.; DECAPRIO, D.; EIGLMEIER, K.; EISENSTADT, E.; EL-DORRY, H.; GELBART, W. M.; GOMES, S. L.; HAMMOND, M.; HANNICK, L. I.; HOGAN, J. R.; HOLMES, M. H.; JAFFE, D.; JOHNSTON, J. S.; KENNEDY, R. C.; KOO, H.; KRAVITZ, S.; KRIVENTSEVA, E. V.; KULP, D.; LABUTTI, K.; LEE, E.; LI, S.; LOVIN, D. D.; MAO, C.; MAUCELI, E.; MENCK, C. F. M.; MILLER, J. R.; MONTGOMERY, P.; MORI, A.; NASCIMENTO, A. L.; NAVEIRA, H. F.; NUSBAUM, C.; O'LEARY, S.; ORVIS, J.; PERTEA, M.; QUESNEVILLE, H.; REIDENBACH, K. R.; ROGERS, Y.; ROTH, C. W.; SCHNEIDER, J. R.; SCHATZ, M.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STINSON, E. O.; TUBIO, J. M. C.; VANZEE, J. P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WERNER, D.; WHITE,

- O.; WYDER, S.; ZENG, Q.; ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; HILL, C. A.; RAIKHEL, A. S.; SOARES, M. B.; KNUDSON, D. L.; LEE, N. H.; GALAGAN, I. J.; SALZBERG, S. L.; PAULSEN, I. T.; DIMOPOULOS, G.; COLLINS, F. H.; BIRREN, B.; FRASER-LIGGETT, C. M.; SEVERSON, D. W. Genome sequence of *Aedes aegypti* a major arbovirus vector, **Science**, v. 316, p. 1718-1722, 2007.
- PEITSCH, M. C. Protein modeling by E-mail. **Nature Biotechnology**, v. 13, p. 658-660, 1995.
- PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 897-928, 2001.
- PONNUVEL, K. M.; NAKAZAWA, H.; FURUKAWA, S.; ASAOKA, A.; ISHIBASHI, J.; TANAKA, H.; YAMAKAWA, M. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10725-10729, 2003.
- PINONI, S. A.; IRIBARNE, O.; LÓPEZ MAÑANES, A. A. Between-habitat comparison of digestive enzymes activities and energy reserves in the SW Atlantic euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 158, p. 552-559, 2011.
- POLICLÍNICA VATERINÁRIA DE COTIA. Febre Maculosa, Cuidado com o carrapato.

 Disponível

 em: http://www.policlinicaveterinaria.com.br/artigos.asp?xcod=33 Acesso em: 20 set 2011.
- RUDZINSKA, M. A.; SPIELMAN, A.; LEWENGRUB, S.; PIESMAN, J.; KARAKASHIAN, S. Penetration of the peritrophic membrane of the tick by *Babesia microti.* **Cell and Tissue Research**, v. 221, p. 471–481, 1982.
- REYNOLDS, L. R.; WASHBURN, W. N.; DEEMS, R. A.; DENNIS, E. A. Assay strategies and methods for phospholipases. **Methods in Enzymology**, v. 197, p. 3-23, 1991.
- RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of insects**. 2nd ed. Burlington: Academic Press. 2009.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 2773-2786, 2010.
- RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; CORDEIRO, M. T.; BRAGA, C.; DE SOUZA, W. V.; MARQUES, E. T.; CUMMINGS, D. A. T. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of dengue epidemic in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e935, 2011. doi:10.1371/journal.pntd.0000935.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D.

- C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- SMITH, G. M.; ROTHWELL, K.; WOOD, S. L.; YEAMAN, S. J.; BOWNES, M. Specificity and localization of lipolytic activity in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Journal**, v. 304, p. 775-779, 1994.
- SALVESEN, G. S.; NAGASE, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes:** a practical approach. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2001. p. 105-128.
- SOBERÓN, M.; FERNÁNDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 597-600, 2007.
- SPERANÇA, M. A.; CAPURRO, M. L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 425-433, 2007.
- STEINERT, S.; LEVASHINA, E. A. Intracellular immune dipteran insects. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 129-140, 2011.
- TSUSHIDA, K.; WELLS, M. A. Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipids to the fat body. **Insect Biochemistry**, v. 18, p. 263-268, 1988.
- TIETZ, N. W.; SHUEY, D. F. Lipase in serum the elusive enzyme an overview. **Clinical Chemistry**, v. 39, p.746-756, 1993.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109B, p. 1-62, 1994.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. Comprehensive molecular insect science, **Comprehensive Molecular Insect Science**, v.4, p.171-224, 2005.
- THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 48, p. 40074-40083, 2005.
- TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. D. C. N.; BARRETO, F.; BARRETO, M. L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. S7-S18, 2009.
- WEINTRAUB, H.; TIETZ, A. Triglyceride digestion and absorption in the locust, *Locusta migratoria*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 306, p. 31-41, 1973.
- WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.

- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, p. 328-345, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases-dengue and dengue haemorrhagic fever. 2011. Disponível em: http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/CSR ISR 2000 1/en/>.

http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/CSR_ISR_2000_1/en/> Acesso em: 05 May 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue and dengue hemorrhagic fever. 2009. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html Acesso em: 18 Ago 2011.

WIKIPEDIA. *Aedes aegypti* larva. 2008. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Aedes_aegypti_larva.jpg> Acesso em: 20 Sep 2011.

ZANGENBERG, N. H.; MULLERTZ, A.; KRISTENSEN, H. G.; HOVGAARD, L. A dynamics *in vitro* lipolysis model II: Evaluation of the model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, p. 237-244, 2001.

ZOUARI, N.; MILED, N.; ROUIS, S.; GARGOURI, Y. Scorpion digestive lipase: A member of a new invertebrate's lipase group presenting novel characteristics. The scorpion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 67–74, 2005.

ZOUARI, N.; MILED, N.; CHERIF, S.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: **Biochimie**, v. 89, p. 403-409, 2007.

ZEE, J. P. V.; GERACI, N. S.; GUERRERO, F. D.; WIKEL, S. K.; STUART, J. J.; NENE, V. M.; HILL, C. A. Tick genomics: The *lxodes* genome project and beyond. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1297–1305, 2007.