

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Bioquímica Médica

Caracterização do Agregado de Heme do Intestino Médio do
Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Tiago Opala Vieira

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tiago Opala Vieira

**Caracterização do Agregado de Heme do Intestino Médio do Mosquito *Aedes aegypti*
(Linnaeus, 1762)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Orientador:

Pedro Lagerblad de Oliveira
Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica
IBqM - UFRJ

Rio de Janeiro

2010

A auto-estima é requisito para grandes realizações

Autor desconhecido

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Tiago Opala
Caracterização do Agregado de Heme do Intestino Médio do Mosquito *Aedes aegypti*
(Linnaeus, 1762) / Tiago Opala Vieira
Rio de Janeiro, 2010

Dissertação (Mestre em Química Biológica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica – IBqM
2010

Orientador: Pedro Lagerblad de Oliveira

1- *Aedes aegypti*
2- Agregado de heme
3- Matriz peritrófica
I – Oliveira, Pedro Lagerblad
II – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Bioquímica Médica
III - Caracterização do Agregado de Heme no Intestino Médio do Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tiago Opala Vieira

Caracterização do Agregado de Heme do Intestino Médio do Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Rio de Janeiro, 08 de Março de 2010.

(Pedro Lagerblad de Oliveira, Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica - Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro).

(Hatisuburo Masuda, Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro).

(Kildare Rocha de Miranda, Professor Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro).

(Marcelo Jacobs Lorena, Professor da Universidade Johns Hopkins/Baltimore/USA).

(Ednildo Alcântara Machado, Professor Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro).

(Marcus Fernandes de Oliveira, Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro).

RESUMO

Vieira, Tiago Opala. Caracterização do Agregado de Heme do Intestino Médio do Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Rio de Janeiro, 2010. Dissertação de Mestrado em Química Biológica – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os insetos hematófagos como o mosquito *Aedes aegypti* ingerem grandes quantidades de sangue em um único repasto. A hidrólise da hemoglobina libera no trato intestinal grande quantidade de heme, molécula capaz de promover danos oxidativos a biomoléculas. Para contornar essa situação potencialmente problemática esses organismos possuem eficientes mecanismos antioxidantes que garantem seu sucesso ecológico. A insolubilização de heme é um fenômeno comum aos insetos hematófagos. Além disso, mosquitos secretam uma estrutura em resposta a alimentação que envolve o bolo alimentar, separando-o do epitélio, denominada matriz peritrófica. Foi demonstrado que a matriz peritrófica de mosquitos é capaz de ligar grande quantidade de heme, sugerindo que está poderia constituir um importante papel no mecanismo de detoxificação de heme. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a formação de agregados de heme no intestino médio de *Aedes aegypti* ao longo da digestão. O fracionamento do conteúdo alimentar em gradiente de sacarose em diferentes horas após a alimentação permitiu estudar o destino do heme e a formação de agregados de heme ao longo do curso da digestão, além de permitir o isolamento desses agregados. Esse material precipitado é composto de heme e é diferente da hemozoína, cristal de heme presente no intestino de triatomíneos. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura mostram a presença de agregados de heme na camada subperitrófica. A regularidade estrutural do agregado, na forma de um polígono regular achatado, aproximando-se de um círculo, com tamanho variando entre 50 a 150 nm, pode ser interpretada como indicativo da existência de um processo organizado e controlado na formação do agregado. O estudo da formação destes agregados ao longo do curso da digestão sugere que sua formação ocorre de forma gradual possivelmente com o envolvimento de proteínas. Os resultados nos levaram a hipotetizar que a digestão da hemoglobina acontece em compartimentos da camada subperitrófica que restringe a difusão de moléculas, aumentando a chance do encontro das moléculas de heme liberadas da degradação da hemoglobina, favorecendo a sua precipitação e proporcionando a formação do agregado.

ABSTRACT

Vieira, Tiago Opala. Characterization of heme aggregate of midgut of *Aedes aegypti* mosquito (Linnaeus, 1762). Rio de Janeiro, 2010. Dissertação de Mestrado em Química Biológica – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

The blood-sucking insects like the mosquito *Aedes aegypti* ingest large amounts of blood in a single meal. Hydrolysis of hemoglobin release in the intestinal tract large amounts of heme, a molecule capable of promoting oxidative damage to biomolecules. To work around this potentially problematic these organisms have efficient antioxidant mechanisms that ensure their ecological success. The insolubilization of heme is a phenomenon common to insect bites. In addition, mosquitoes secrete a structure called the peritrophic membrane in response to food. Intake peritrophic membrane involves the bolus, separating it the epithelium. It was shown that the peritrophic membrane is capable of binding large amounts of heme, forming a mechanism for detoxification of heme. Therefore, the objective of this study was to characterize the heme aggregation in the midgut of *Aedes aegypti* during the digestion. Fractionation of food contents in sucrose gradient at different times after feeding permitted to study heme aggregation during the course of digestion, and allowed the isolation of these aggregates. This precipitated material is composed of heme and is different from hemozoin, a crystal heme present in the gut of triatomines. Images of transmission electron microscopy and scanning show the presence of aggregates of heme in the subperitrophic layer. The aggregates have all a mililar shape, in the form of a flat regular polygon, approaching a circle, with sizes ranging from 50 to 150 nm can be interpreted as indicative of an organized process involved in aggregate formation. The study of the formation of these aggregates over the course of digestion suggests that it is gradual process, possibly accomplish with the involvement of proteins. This led us to hypothesize that the digestion of hemoglobin occurs in a subperitrophic layer of the peritrophic membrane, which restricts the diffusion of molecules, increasing the chance trapping heme molecules released from hemoglobin degradation and resulting in its precipitation and providing a scaffold that drives the assembly of the heme aggregation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

Figura 2: *Aedes aegypti*

Figura 3: Representação esquemática da matriz peritrófica do tipo 1

Figura 4: Microscopia ótica do intestino médio alimentado com sangue

Figura 5: Estrutura química da ferroprotoporfirina IX (heme)

Figura 6: Esquema da peroxidação lipídica mediada por heme e/ou ferro

Figura 7: Fracionamento do conteúdo alimentar de *Aedes aegypti* 12, 24, 36, 44 hs após alimentação com sangue em gradiente descontínuo de sacarose

Figura 8: Espectroscopia de absorção de luz e de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada do precipitado

Figura 9: Dosagem de heme e proteína nas frações coletadas do gradiente de sacarose

Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão do intestino médio alimentado com sangue

Figura 11: Medidas morfométricas dos agregados de heme

Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do intestino médio cortado transversalmente

Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do intestino médio

Figura 14: Medidas morfométricas dos agregados de heme

Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do precipitado

Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do precipitado

Figura 17: Microscopia eletrônica de transmissão e espectro de microanálise de raio-X do precipitado

Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão e espectro de microanálise de raio-X do precipitado tratado com EGTA

Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão e espectro de microanálise de raio-X da fração 5

Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do conteúdo alimentar

Figura 21: Modelo hipotético de formação de agregado de heme

LISTA DE SIGLAS

AgIMuc1 – Mucina intestinal de *Aedes aegypti*

AgMuc1 – Mucina 1 de *Anopheles gambiae*

ATR-FTIR - Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada

CBDs – Domínios de ligação em quitina

EGTA – Ácido Etilenoglicol Tetra-acético

FORMVAR – Polivinil formal

HEPES - Ácido Etanosulfônico 4-(2-Hidroxietil)Piperazina-1

IIM – Mucina Intestinal de inseto

PBS – Tampão fosfato salino

PM – Matriz peritrófica

PG – Camada subperitrófica

RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro

RNA_i - Ácido ribonucléico de interferência

SDS - dodecil-sulfato de sódio

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 <i>Aedes aegypti</i>	1
1.2 Hematofagia/Digestão	3
1.3 Matriz peritrófica	6
1.3.1 Composição	7
1.3.2 Funções	10
1.4 Heme/Estresse oxidativo	14
1.5 Defesas antioxidantes de insetos hematófagos contra o heme	17
1.5.1 Degradação enzimática	17
1.5.2 Proteínas ligadoras de heme	18
1.5.3 Agregação de heme	19
2. Objetivos	22
3. Materiais e métodos	23
3.1 Mosquitos	23
3.2 Dissecção de intestinos médios e PMs de <i>Aedes aegypti</i>	23
3.3 Fracionamento do intestino médio de <i>Aedes aegypti</i> em gradiente descontínuo de sacarose	23
3.4 Dosagem de proteína	24
3.5 Dosagem de heme	24
3.6 Espectrometria de absorção de luz	24
3.7 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada	24
3.8 Microscopia eletrônica de varredura	25

3.9 Microscopia eletrônica de transmissão e microanálise de raios-X	26
3.10 Morfometria	27
4. Resultados	28
5. Discussão	55
6. Referências Bibliográficas	61

1. Introdução

1.1 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* está entre os mais importantes insetos transmissores de doenças ao homem. É o vetor de febre amarela urbana e da dengue em vários países tropicais e subtropicais em razão do clima quente e úmido, adequado para o desenvolvimento do mosquito. As doenças veiculadas pelos mosquitos causam grande impacto econômico e na saúde pública. Atualmente a dengue é alvo de grandes campanhas de saúde pública realizadas no Brasil.

As dificuldades de se combater o vetor devido a sua alta capacidade reprodutiva e resistência aos inseticidas utilizados, associada a falta de vacina efetiva e problemas sócio-econômicos e políticos, são motivos que dificultam o controle de número de casos de dengue no Brasil. Nos últimos 10 anos foram registrados mais de 4 milhões de casos de dengue no país. Somente no ano de 2008 foram registrados 734384 casos de dengue no Brasil - <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2008.htm> (World Health Organization).

Os insetos popularmente conhecidos como mosquitos pertencem a família Culicidae, ordem Diptera. Alimentam-se das seivas de plantas, porém as fêmeas são hematófagas e utilizam os nutrientes provenientes da digestão do sangue para produção dos seus ovos, completando posteriormente o seu ciclo gonotrófico. Esse hábito alimentar possibilita a transmissão de agentes patogênicos ao homem. Os patógenos são injetados na corrente sanguínea do hospedeiro através da saliva. Dentre os patógenos transmitidos pelos mosquitos, os protozoários do gênero *Plasmodium*, nematóides (filárias) e os vírus da Dengue e Febre Amarela são os de maior importância e as espécies de mosquitos vetores dessas doenças são principalmente mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*, respectivamente.

O mosquito possui o ciclo biológico curto, entre 9 a 12 dias, se desenvolve por metamorfose completa, que corresponde as fases de ovo, quatro estágios larvais, pupa até o indivíduo adulto. Após a alimentação com sangue e maturação dos ovos, as fêmeas depositam os ovos em locais úmidos e preferencialmente de água límpida. O contato dos ovos com a água determina a eclosão de larvas de primeiro estágio, que durante o período de 7-8 dias passam por um total de quatro estágios larvais até se transformarem em pupas. Das pupas após 2 dias surgem os mosquitos adultos. A fêmea se alimentando de sangue, ocorre a maturação dos ovos e a ovoposição, completando o ciclo gonotrófico (Figura 1).

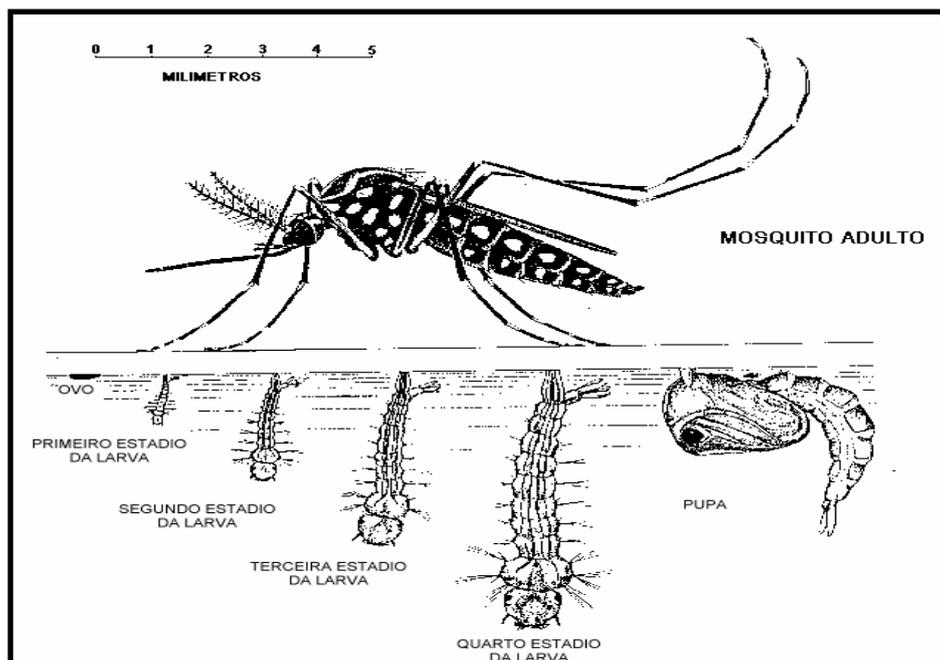


Figura 1 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

Fonte: <http://www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/ca/DENGUE/AEDES2.gif>

Recentemente o genoma do mosquito *Aedes aegypti* foi seqüenciado, gerando um enorme conjunto de informações que deverá levar a um novo quadro nos estudos biológicos do mosquito. O genoma completo tem aproximadamente 1,38Gbp, cinco vezes maior do que o genoma do vetor da malária, *Anopheles gambiae* (Nene *et al.*, 2007).

1.2 Hematofagia/ Digestão

A habilidade de insetos em explorar um recurso alimentar como o sangue necessitou de várias adaptações as quais, se acredita, teriam sido geradas através de duas rotas principais ao longo da evolução dos principais grupos de insetos hematófagos. De um lado sugere-se que formas hematófagas podem ter se desenvolvido decorrência da associação entre o vertebrado e o inseto, devido a atração dos insetos para ninhos ou tocas de vertebrados. Inicialmente, os insetos associados a esses habitats teriam começado a se alimentar de matéria orgânica, como pedaços de pele, pêlos ou penas, sendo que a ingestão desse tipo de alimento levou à seleção de indivíduos com sistema fisiológico capaz de processá-los. Posteriormente, modificações nas peças bucais e adaptações comportamentais podem ter levado os insetos a se alimentarem diretamente dos hospedeiros (Lehane, 1991).

A segunda rota estaria relacionada a insetos entomófagos, que podem ter sido atraídos para ninhos e cavernas onde outros insetos poderiam ser encontrados com abundância, além dos vertebrados. Como o contato com os vertebrados pode ter acontecido repetidamente, os insetos teriam acumulado adaptações morfológicas e fisiológicas, que teriam permitido a hematofagia. Os mosquitos podem estar envolvidos nessa rota, ou seja, inicialmente os adultos de espécies ancestrais podem ter se alimentado de fluídos de larvas de outros insetos e posteriormente teriam passado ao sangue de hospedeiros vertebrados, se tornando um ectoparasita (Lehane, 1991).

A hematofagia é um hábito que envolve diversas adaptações desenvolvidas pelos insetos sugadores de sangue. O sucesso dessa prática se deve ao fato de que o sangue é uma fonte de alto valor nutricional. Os nutrientes provenientes do sangue durante a fase adulta fornece energia para a ovogênese e o desenvolvimento durante o estágio de larva, pupa e ninfa (Romoser, 1996).

No meio ambiente tanto o macho como a fêmea se alimentam da seiva e néctar das plantas, sustentando o metabolismo basal (Clements, 1992). Mosquitos fêmea costumam ingerir entre 3 e 5 vezes seu próprio peso a cada repasto sanguíneo (Figura 2).



Figura 2: Fêmea de *Aedes aegypti* depois da alimentação com sangue.

Fonte: <http://aegypti.vectorbase.org/Images/OrganismImages/>

Nos insetos hematófagos, o intestino médio tem um papel central diversos aspectos da biologia do inseto relacionados a hematofagia, sendo local da digestão e absorção de nutrientes e também a via por onde parasitas e vírus entram no vetor. Nos dipteras, o bolo alimentar é separado do epitélio por uma camada extracelular conhecida como membrana ou matriz peritrófica (Diptera) ou membrana perimicrovililar (Hemiptera) (Pennington & Wells, 2005).

Comparados com a quantidade de proteína, carboidratos e lipídeos contribuem de forma minoritária como combustível para a produção de ovos. Uma vez que as proteínas do

sangue, composto principalmente por albumina e hemoglobina, são os principais nutrientes para os insetos sugadores de sangue, diversas proteases digestivas foram caracterizadas nesses organismos. (Lehane, 1991). Na maioria dos insetos hematófagos o pH do intestino médio é alcalino e a completa digestão das proteínas requer a ação de endoproteases (tripsina e quimiotripsina) e exoproteases (carboxipeptidase e aminopeptidase). Assim, no *Aedes aegypti* as principais proteases envolvidas na digestão das proteínas do sangue são as tripsinas, endopeptidases da classe das serino-proteases, com pH ótimo entre neutro e alcalino, que clivam a cadeia polipeptídica em resíduos de aminoácidos, como lisina e arginina (Lehane & Billingsley, 1996).

Foram descritas duas tripsinas no intestino de *Aedes aegypti* após a alimentação com sangue; a tripsina-precoce, cuja síntese é regulada ao nível traducional, que tem seu pico em 3 horas após a alimentação e a tripsina-tardia, regulada ao nível transcricional, presente em grandes quantidades a partir de 18 horas após a alimentação (Noriega & Wells, 1999, Lu et al., 2006).

Além de sua função majoritária no processo de digestão, foi sugerido recentemente que a atividade de tripsina influencia a taxa de infecção, replicação e disseminação do vírus da dengue no mosquito, podendo ser um importante determinante de sua capacidade vetorial. Imagina-se que a atividade de tripsina pode ser necessária para um processo de ativação viral mediado por proteólise (Molina-Cruz et al., 2005).

A atividade de exopeptidases como carboxipeptidases e de uma aminopeptidase também foi caracterizada ao longo do processo de digestão do sangue e seus perfis se mostraram muito similares aos da tripsina-tardia, com um pico de atividade no meio do processo de digestão, 24 horas após a alimentação com sangue (Noriega et al., 2002).

1.3 Matriz peritrófica

O intestino da maioria dos insetos contém uma camada semipermeável de material acelular denominada matriz peritrófica, composta predominantemente de fibras de quitina, glicoproteínas e proteoglicanas separando o bolo alimentar das células epiteliais e atuando como uma peneira molecular que medeia o tráfego de moléculas (Shao et. al, 2001). A fim de controlar eficazmente a passagem de biomoléculas, a matriz peritrófica é altamente estruturada e dinâmica, alterando-se a sua espessura e porosidade em diferentes graus (Peters, 1992; Shen & Jacobs-Lorena, 1999). A matriz peritrófica é considerada fisiologicamente análoga ao muco gastrointestinal de mamíferos e muitas funções comuns foram definidas para essas duas camadas extracelulares.

A matriz peritrófica é classificada em dois tipos distintos (PM 1 e PM 2) baseados no local de síntese e tendo diferentes propriedades. A maioria dos insetos possui matriz peritrófica tanto no estágio larval quanto no adulto, embora em alguns casos esta seja encontrada em apenas um dos dois estágios (Wigglesworth, 1930).

A matriz peritrófica do tipo 2 é produzida por um pequeno grupo de células altamente especializado na cárdia, um órgão localizado entre a junção do intestino anterior e o intestino médio. Este tipo de PM é constitutivamente secretada independente da ingestão de comida na forma de um fino tubo contínuo com espessura entre 0,1 – 2 μm (Tellan, 1996; Jacobs-Lorena & Oo, 1996).

A matriz peritrófica do tipo 1, ou matriz peritrófica (Figura 3) é a mais comum em Dípteros hematófagos, como mosquitos, simulídeos e flebotomíneos, sendo produzida em resposta direta a alimentação. Seus componentes são secretados ao longo de todo o intestino médio, envolvendo o bolo alimentar (Tellan, 1996; Lehane, 1997; Terra, 2001). Nos mosquitos fêmea adultos essa camada com espessura por volta de 1 – 20 μm é

transitoriamente formada no intestino médio do inseto em resposta direta à distensão do epitélio intestinal médio decorrente da alimentação com sangue (Freyvogel & Jaquet, 1965; Richards & Richards, 1977; Billingsley, 1992).

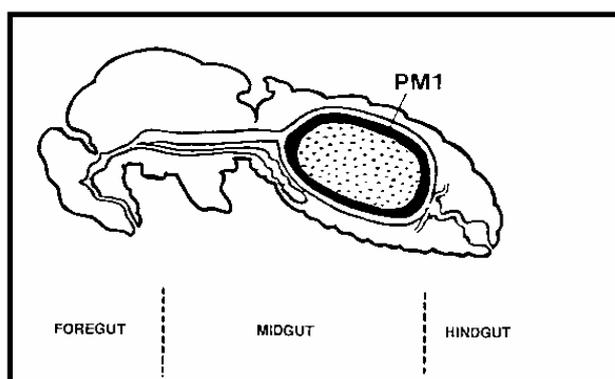


Figura 3: Representação esquemática da matriz peritrófica do tipo 1.

Fonte: Biology of Disease Vectors capítulo 19, pp. 321.

1.3.1 Composição

Segundo Peters (1992), matrizes peritróficas são compostas basicamente por quitina, proteínas e proteoglicanas. No entanto, embora seja uma estrutura fundamental em diversos aspectos para os insetos, conforme discutido mais adiante, muitos aspectos acerca dos componentes individuais e sua presença nas diferentes espécies ainda permanecem obscuros.

Em mosquitos hematófagos, não há nenhum estudo bioquímico mais aprofundado a respeito dos componentes da matriz peritrófica de adultos. Assim, é importante ressaltar que os dados apresentados a seguir são bastante genéricos e baseados nos poucos estudos que se tem a respeito da composição de matrizes peritróficas.

Foi estimado que a quitina corresponde à cerca de 3 a 13% da massa total da PM (Peters 1992), contrastando com a cutícula dos insetos, onde corresponde à cerca de 25 a 40% (Richards, 1978). Em *Aedes aegypti*, modelo de estudo desta dissertação, não se tem uma estimativa do conteúdo de quitina presente na matriz peritrófica. A síntese de quitina a partir de frutose-6-fosfato ocorre por uma via de cinco reações enzimáticas. Quando o mosquito é alimentado com sangue induz a expressão do RNAm tanto da glutamina: frutose-6-fosfato amidotransferase-1 como da quitina sintase, a primeira e última enzimas da via de biosíntese, respectivamente (Kramer & Koga, 1986). No entanto, a formação da PM é comprometida quando a transcrição desses genes é silenciada através do uso de RNA de interferência, afetando dramaticamente a integridade estrutural da PM (Kato et al., 2006). Mosquitos alimentados com sangue enriquecido de quitinase (1 U/mL) mostram bloqueio completo da formação da PM (Filho et al., 2002). Alimentando mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*) com sangue e 100 µM de Polioxina D, potente inibidor da síntese de quitina, ocorre também inibição da formação da PM (Shahabuddin et al., 1995). Em seu conjunto, estes resultados demonstram a importância da quitina na estrutura da PM destes modelos.

Acredita-se que as proteoglicanas estejam presentes na matriz peritrófica da grande maioria das espécies estudadas (Tellam, 1996) e que cheguem a contribuir com 13% da massa total da PM. Provavelmente têm grande importância na estrutura, na resistência e na permeabilidade da PM.

Apesar das proteínas serem os principais constituintes da PM de insetos, cerca de 21-55,5% da massa total da PM (Peters, 1992), pouco se sabe sobre suas funções. A presença de domínios de ligação de quitina (CBDs) em diversas proteínas da PM sugere um papel estrutural na organização das fibras de quitina. As proteínas da PM têm sido classificadas de

acordo com a sua solubilidade em uma série de tampões e a susceptibilização a denaturação por agentes caotrópicos (Tellam et al., 1999).

- Classe 1: proteínas que podem ser removidas com tampões fisiológicos: esse primeiro grupo apresenta contaminação de proteínas do lúmen intestinal e enzimas digestivas.
- Classe 2: removidas com detergentes: acreditando que a PM contém um pouco ou nenhum lipídeo, a ação de detergentes compromete as interações fracas proteína-proteína, proteína-oligossacarídeo ou proteína-quitina.
- Classe 3: removidas com agentes denaturantes: as proteínas deste grupo são as mais abundantes, devido à sua forte interação com a PM são denominadas proteínas integrais/intrínsecas ou peritrofinas.
- Classe 4: proteínas residuais que não são extraídas: por serem proteínas não extraíveis pelo tratamento com detergentes ou agentes denaturantes esse grupo é pouco estudado, embora responda por uma porção substancial do total de proteínas da PM. Mesmo se essas proteínas (classe 4) são ou não diferentes serem diferentes da classe 3, é ainda uma questão a ser esclarecida.

Como citado anteriormente, determinadas proteínas presentes na matriz peritrófica recebem o nome de peritrofinas, devido à sua forte interação com esta camada (Tellam et al., 1999). Muitas peritrofinas são glicosiladas e teriam um papel fundamental na estrutura e na permeabilidade da PM principalmente por apresentarem domínios ricos em cisteína, responsáveis pela ligação às fibras de quitina e formando a rede estrutural das matrizes peritróficas (Elvin et al, 1996; Shen & Jacobs–Lorena, 1999).

Foi demonstrado também que algumas peritrofinas, como a peritrofina-95, a peritrofina-55, a IIM (Insect Intestinal Mucin), AgMuc 1 (*Anopheles gambiae* Mucin 1) e AeIMUC 1 (*Aedes aegypti* Intestinal Mucin 1) possuem regiões ricas em serina, prolina e treonina que são características da família das mucinas (Casu et al, 1997; Wang & Granados,

1997; Shen et al., 1999 a; Rayms-Keller et al., 2000). Sua presença é de extrema importância, pois além de possuírem os domínios de ligação à quitina, poderiam estar desenvolvendo papéis análogos aos da mucina de vertebrados, como por exemplo, lubrificação e proteção do sistema digestório. Uma vez que estes domínios são ricos em serina e treonina, também sítios potenciais de glicosilação. (Sarauer et. al. 2003; Wang et. al, 2004; Shi et. al., 2004).

1.3.2 Funções

Como comentado anteriormente a presença de uma cobertura extracelular rica em mucinas como a da matriz peritrófica não está restrita aos invertebrados, uma vez que muitos grupos de vertebrados possuem um muco revestindo o sistema digestório que tem como principal componente a mucina. Este muco possui várias funções: lubrificação do intestino (proteção mecânica); barreira contra parasitas e bactérias; retardamento da taxa de transporte de prótons e da pepsina, protegendo assim a mucosa intestinal; e imobilização das enzimas pancreáticas otimizando a digestão (Terra, 1996). Outra importante função da mucina é a proteção contra radicais livres, tanto no trato intestinal (Cross et al., 1984; Gong et al., 1990) quanto no respiratório (Cross et al., 1984), que estão frequentemente expostos a níveis elevados de espécies reativas de oxigênio. Já foi mostrado inclusive que metabólitos de oxigênio são capazes de estimular a secreção de mucina em células gástricas de rato (Hiraishi et. al, 1991) e que a secreção deste muco pode ser induzida por vários fatores de estresse e mediada por sinalizadores intracelulares como proteína quinase C e fosfolipase C (Wright et al., 1996)

Os insetos, assim como outros invertebrados, não produzem este muco intestinal propriamente dito, composto por mucina, porém, acredita-se que a matriz peritrófica seja uma estrutura análoga cujas principais funções estão relacionadas à digestão e à proteção do epitélio do intestino médio (Terra, 2001).

Assim como os dados sobre a composição da matriz peritrófica, os estudos sobre suas funções ainda são bem preliminares, sendo muitas vezes baseados na sua estrutura. São apresentadas abaixo algumas funções propostas na literatura.

- **Permeabilidade:** A matriz peritrófica é uma camada semipermeável que permite o movimento seletivo de moléculas do lumen do intestino para as células digestivas do epitélio e a retenção de moléculas maiores no lumen (Tellam, 1996). As propriedades deste filtro são determinadas por sua estrutura e composição química, sendo muito importante a associação de quitina com proteoglicanas na manutenção da estrutura e conseqüentemente da permeabilidade (Lehane, 1997). Graças a esta característica, a matriz peritrófica exerce uma série de funções na digestão.

Uma vez que o processo de digestão e de absorção ocorrem no intestino médio, a organização espacial da digestão depende da relação de cada um dos compartimentos (célula, espaço ectoperitrófico e espaço endoperitrófico) com as diferentes fases da digestão e enzimas correspondentes (Terra, 1996).

As enzimas digestivas são sintetizadas pelas células do epitélio intestinal. Algumas destas enzimas (aquelas de menor tamanho) cruzam a PM e vão para o espaço endoperitrófico, onde ocorre a fase inicial da digestão que constitui na quebra dos polímeros ingeridos em oligômeros por hidrolases (tripsina, aminopeptidase e celulase) (Terra & Ferreira, 1994; Terra, 1996). Estes fragmentos menores agora são capazes de atravessar a matriz peritrófica, e no espaço ectoperitrófico são degradados a oligômeros menores ou dímeros (fase intermediária). Finalmente estas moléculas são quebradas em monômeros e absorvidas (fase final) (Terra 1996; Tellam, 1996).

A matriz peritrófica também é capaz de imobilizar algumas enzimas digestivas (Ferreira et al., 1994 ; Terra, 1996; Tellam, 1996), como foi descrito para amilase e tripsina de

larva de *Spodoptera frugiperda* (Ferreira et al., 1994), minimizando assim a perda das mesmas e otimizando o processo de digestão.

Foi proposto também um mecanismo de reciclagem de enzimas digestivas graças a circulação das mesmas em contra corrente entre os espaços endo e ectoperitrófico, permitindo a recuperação de parte destas enzimas antes da excreção do conteúdo luminal (espaço endoperitrófico) (Terra, 1996).

No entanto, há poucos estudos a respeito do papel da matriz peritrófica na digestão de mosquitos. Em 1992 Billingsley & Ruddin, estudando o papel da PM na infectividade e na digestão de *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*, relataram que a ausência de PM, não interferia na atividade de tripsina nem de aminopeptidase. Por outro lado, o espessamento da matriz peritrófica devido a alimentação de *A. aegypti* também não teve efeito na atividade das enzimas. Porém estes resultados não provam que a PM não tenha papel na organização e otimização da digestão uma vez que não foram estudados parâmetros diretos a respeito da eficiência da digestão, como digestibilidade, eficiência da conversão ou utilização dos nutrientes.

Recentemente Villalon e colaboradores (2003) mostraram que ao comprometer a integridade da matriz peritrófica de fêmeas de *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* por alimentação com quitinase ou de anticorpos anti-proteínas de PM, havia uma aceleração no processo de digestão porém sem nenhum efeito no curso-temporal da postura de ovos. Ou seja, o papel da matriz no adulto seria apenas de limitar a velocidade de digestão, sem nenhum outro efeito mais significativo como observado em outros modelos. Esses efeitos seriam:

- Proteção mecânica: barreira que evita a abrasão de partículas ingeridas contra a o epitélio intestinal, (Richards e Richards, 1977).

- Barreira contra microorganismos: a matriz peritrófica atua como um obstáculo evitando ou dificultando a passagem de possíveis parasitas do bolo alimentar para as células epiteliais (Lehane, 1991). Os insetos vetores de doenças, possuem graus diferentes de susceptibilidade aos parasitas que eles transmitem (Shahabuddin et al 1995). Vários são os fatores sugeridos como determinantes na interação parasito-vetor, entre eles o tempo de formação, a maturidade e a espessura da matriz peritrófica (Berner et al., 1983; Shahabuddin et al., 2001).

- Proteção Química: evitando que substâncias tóxicas, por exemplo, heme, DDT e/ou que compostos fenólicos de plantas conhecidos como prooxidantes, causem prejuízo aos insetos (Páscoa, et al., 2002; Adebí & Brown, 1961; Bernays & Chamberlain, 1980).

Durante a digestão do sangue ocorre uma grande liberação de heme, grande parte desta molécula fica associada à matriz peritrófica, sugerindo que esta poderia ter também um importante papel no mecanismo de detoxificação de heme. A matriz peritrófica de *Aedes aegypti* é capaz de ligar heme e foi mostrado que a quantidade de heme ligado a PM aumenta em paralelo ao curso da digestão, atingindo seu máximo (18 nmoles) 48 horas após a alimentação (Páscoa et al., 2002) (Figura 4). Esta quantidade de heme associado à PM no final da digestão é próximo ao que seria esperado após a digestão completa de quase 2 μ L de sangue. Ao final da digestão esta estrutura, juntamente com o heme ligado a ela, é excretada com as fezes. Tal fato sugere que a matriz peritrófica tem um papel no mecanismo de seqüestro e detoxificação de heme.

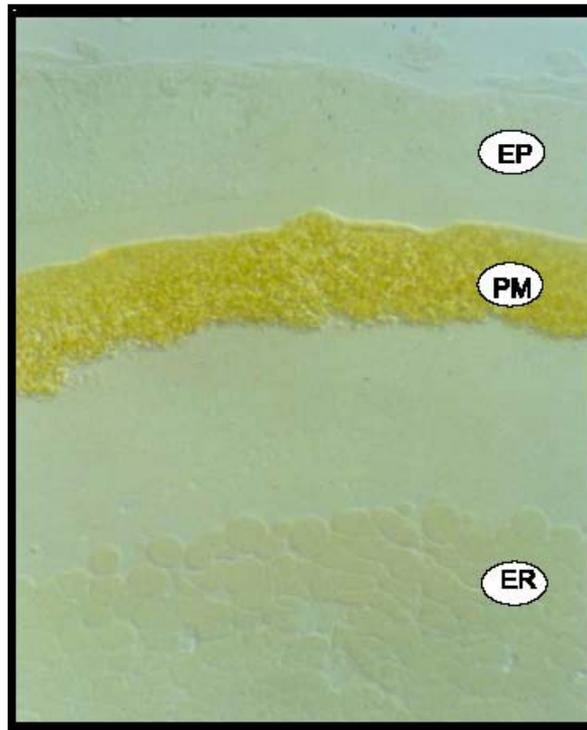


Figura 4: Microscopia ótica não corada de um corte transversal do intestino médio 20 h após alimentação com sangue. EP = epitélio, PM = matriz peritrófica, ER = eritrócitos. A natural coloração marrom da matriz peritrófica é atribuída à presença de heme (Páscoa et al., 2002).

1.4 Heme / estresse oxidativo

A ferroprotoporfirina IX ou heme faz parte de um grupo de moléculas denominada porfirinas. O heme apresenta uma estrutura cíclica formada por 4 anéis pirrólicos ligados a um átomo de ferro. O ferro pode ser encontrado em duas formas redox, tanto no estado reduzido (Fe^{+2}), como oxidado (Fe^{+3}). Nesse anel tetrapirrólico estão ligados também dois grupamentos vinílicos, 2 grupamentos carboxílicos e 4 radicais metil (Figura 5) (Milgrom, 1997). Essa molécula é o grupamento prostético da hemoglobina e mioglobina, proteínas envolvidas no transporte e armazenamento do oxigênio, respectivamente. Nos citocromos, está envolvida na com o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Ainda podemos destacar

outras proteínas como catalase, óxido nítrico sintase e glutationa peroxidase (Halliwell & Gutteridge, 2004).

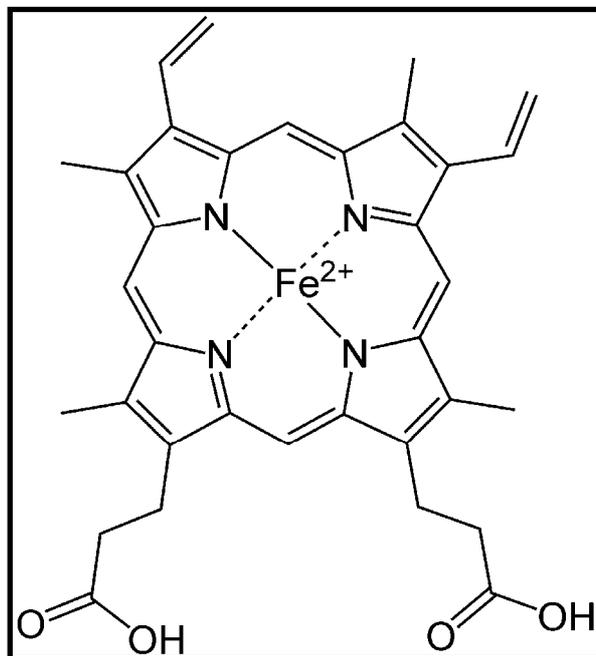


Figura 5: Estrutura química da ferroporfirina IX (heme)

Fonte: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/6/6c/20090607121334>

!Heme_b.png

O heme quando presente na forma livre pode ser tóxico, causando efeitos deletérios. Por ser uma molécula anfipática, isto é, que apresenta tanto porções polares como apolares, é capaz de se intercalar na matriz plasmática ocasionando a desestabilização de matriz e a lise celular (Chou & Fitch, 1981). A exposição a baixas concentrações de hemina conduz a lise celular de hemácias, *Plasmodium* e *Trypanosoma brucei* (Chiu & Lubin, 1989; Orjih et al., 1981; Meshnick et al., 1977). Além disso, o heme livre pode atuar como agente pró-oxidante, amplificando a geração de radicais livres, assim promovendo a oxidação de biomoléculas (Halliwell & Gutteridge, 2004) A figura 6 mostra esquematicamente que a peroxidação lipídica mediada por ferro ou por heme ocorre por diferentes vias. Através da reação de

Fenton o ferro pode gerar radicais hidroxil (OH^\bullet). Estes radicais são capazes de iniciar uma cadeia de peroxidação lipídica removendo elétrons de outras moléculas como ácidos graxos insaturados (RH), gerando radicais alquil (R^\bullet). O heme não produz radical hidroxil e não é reagente na reação de Fenton, mas o heme induz a conversão de hidroperóxidos orgânicos de baixa reatividade (ROOH) em radicais alcoxil (RO^\bullet) e peroxil (ROO^\bullet) de alta reatividade e desta forma são também geradores de radicais livres (Graça-Souza, et al., 2006). Sendo assim, a alimentação hematófaga pode ser considerada um desafio oxidativo, tendo um impacto relevante sobre o equilíbrio redox nos organismos hematófagos.

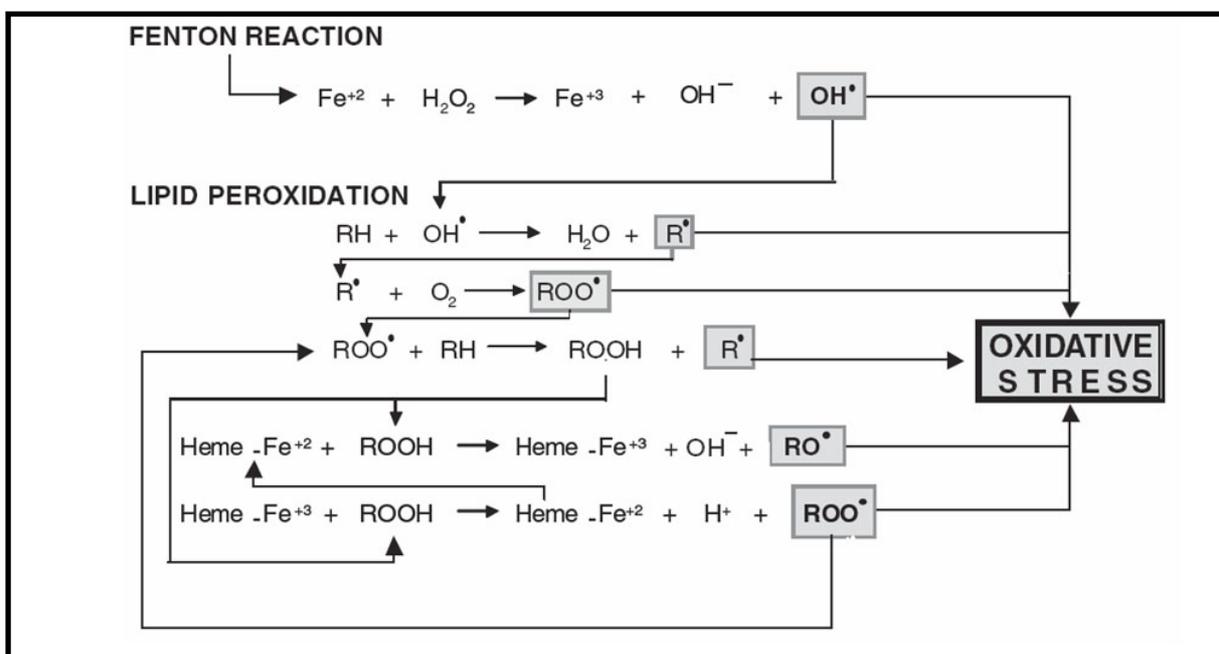


Figura 6: Esquema da peroxidação lipídica mediada por heme e/ou ferro, ocasionando o estresse oxidativo. OH^\bullet = radical hidroxil, RH = ácidos graxos insaturados, R^\bullet = radical alquil, ROOH = hidroperóxidos orgânicos, RO^\bullet = radical alcoxil e ROO^\bullet = radical peroxil (Graça-Souza et al., 2006).

1.5 Defesas antioxidantes de insetos hematófagos contra o heme:

Uma vez que a ingestão de sangue constitui um desafio oxidativo, os insetos hematófagos devem possuir defesas antioxidantes e mecanismos de detoxificação de heme capazes de neutralizar o estresse oxidativo gerado, garantido o sucesso da alimentação sanguínea. Insetos e outros artrópodes sugadores de sangue desenvolveram vários mecanismos contra a propriedades tóxicas do heme, incluindo a degradação enzimática do heme convertendo-o em produtos mais hidrofílicos que facilitam a excreção, formação de agregados de heme e propriedades antioxidantes na hemolinfa e intestino médio: ferritina, enzimas antioxidantes, proteínas ligadoras de heme e antioxidantes de baixo peso molecular, isto tudo proporcionando o controle homeostático do metabolismo redox (Graça-Souza, 2006).

1.5.1 Degradação enzimática

Degradação enzimática de heme é um mecanismo de proteção que foi descrito em vários organismos, incluindo plantas, bactérias e mamíferos. Esta reação é catalisada na presença de oxigênio pela enzima heme oxigenase e resulta na formação de monóxido de carbono, íon ferroso e biliverdina. Em mamíferos, a biliverdina gerada é rapidamente convertida em bilirrubina, pela enzima citoplasmática biliverdina reductase (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Em *Rhodnius prolixus* e *Aedes aegypti*, o produto de final de degradação de heme são biliverdinas conjugadas a aminoácidos, cisteína e glutamima, respectivamente. No barbeiro foi elucidado uma via de degradação única, com 4 intermediários distintos resultando no final dicisteinil-biliverdina gama (Paiva-Silva, et. al., 2006). No mosquito o pigmento foi estruturalmente caracterizado como um isômero alfa da biliverdina modificada por dois resíduos de glutamina, gerando uma biglutaminil-biliveridina alfa (Pereira, et al., 2007). Em

Aedes aegypti o pico da produção de biliverdina (isômero, bi-glutaminado alfa) no intestino médio é máximo em torno de 24 horas após alimentação, próximo ao pico de digestão do sangue, reforçando o papel desta enzima na detoxificação do heme gerado na digestão de hemoglobina (dados não publicados) (Pereira, 2008).

1.5.2 Proteínas ligadoras de heme:

O heme, como comentado anteriormente, é o grupamento prostético de várias enzimas (ex: catalase), citocromos e globinas. Nestes casos, a ligação deste grupamento prostético com estas proteínas é forte e algumas vezes é covalente, sendo que geralmente, os resíduos de aminoácidos que são ligantes axiais do ferro do heme são pares histidina/metionina ou histidina/histidina (Zhang & Guarente, 1995). Esta ligação desloca o pico de absorção de luz (Soret) do heme livre (389 nm) para comprimentos de onda mais longos (ex: hemoglobina – 412 nm) devido a alterações da distribuição dos elétrons no anel porfirínico.

Um outro grupo de proteínas ligadoras de heme são as que contêm os motivos de regulação por heme (HRMs – heme regulatory motifs), nos quais a ligação ao heme se faz entre o átomo de ferro presente no centro do anel porfirínico e o grupamento tiol de uma cisteína (Lathrop & Timko, 1993; Huang et al., 2001). A cisteína responsável pela ligação nas HRMs é frequentemente seguida por uma prolina, que não é essencial para que a ligação ocorra, mas facilita este processo (Zhang & Guarente, 1995, Huang et al., 2001). Dentre as proteínas contendo motivos de regulação por heme podemos citar a heme oxigenase-2, heme oxigenase-3 (McCoubrey Jr. et al, 1997, Huang et al. 2001), HAP-1 (heme activator protein), descrita em leveduras (Lee et al., 2003) e a enzima chave na síntese de heme- α -aminolevulinato sintase, descrita em eritrócitos (Lathrop & Timko, 1993).

A AEIMUC 1 é única proteína de PM de *Aedes aegypti* descrita até o presente momento na literatura como proteína ligadora de heme. (Devenport, et. al, 2006). É composta

por três domínios ricos em cisteína, domínios de peritrofina-A, contendo 6 cisteínas cuja distância é conservada obedecendo o padrão $CX_{13-20}CX_{5-6}CX_{9-19}CX_{10-14}CX_{4-14}C$, onde X é qualquer aminoácido (Tellam et al., 1999), e por um domínio tipo mucina, rico em serina, prolina e treonina (Rayms-Keller et al., 2000). A expressão desta proteína é induzida no intestino médio de larvas por exposição a metais, como o cádmio, e de adultos em resposta à exposição a ferro ou cádmio e por alimentação com sangue (Rayms-Keller et al., 2000). Estes resultados nos levaram a hipotetizar que esta proteína poderia ser uma biomolécula responsável pela formação do agregado de heme.

1.5.3 Agregação de heme

A formação de agregados de heme dentro do sistema digestório de insetos hematófagos seria talvez a principal linha de defesa contra a toxicidade do heme livre. A formação de agregados de heme é um fenômeno comum aos organismos hematófagos já estudado, mostrando no entanto uma grande diversidade morfológica e de mecanismos de formação, que revelam um alto nível de especificidade biológica. Essa forma de detoxificação de heme representa um importante alvo no desenvolvimento de possíveis drogas que bloqueiam o processo de formação de hemozoína (Egan, 2003).

Um desses mecanismos representa a cristalização de heme, a hemozoína é um cristal de heme, formado através de interações entre estas moléculas através de ligações iônicas (ferro-carboxilato) recíprocas entre o átomo de ferro de uma molécula de heme e a carboxila dissociada de um outro heme, formando dímeros. Estes dímeros por sua vez, interagem entre si por pontes de hidrogênio dos grupamentos carboxílicos não-dissociados do anel porfirínico (Pagola et al, 2000).

Por muito tempo a formação de hemozoína foi considerada como exclusiva do parasito da malária (Slater et al., 1991). No entanto foi demonstrada a presença de hemozoína

em outros organismos hematófagos como nos insetos triatomíneos (Oliveira et al. 2007), no helminto *Schistosoma mansoni* (Oliveira et al, 2000) e no protozoário *Haemoproteus columbae* (Chen et al., 2001).

A formação de uma estrutura deste tipo é favorecida quando metade dos grupamentos de ácido propiônico do heme estão desprotonados, o que ocorre em valores entre os pKas das carboxilas do heme (4,8 – 5). Essa condição coincide com o pH encontrado nos vacúolos digestivos do plasmódio (Ridley et al., 1996), no intestino médio do barbeiro (Terra et al., 1988) e do trematódeo (Bogitsh & Davenport, 1991).

A hemozoína apresenta algumas propriedades bastante peculiares tais como o espectro de infravermelho, o espectro de absorção de luz visível, solubilidade em solventes alcalinos e apróticos. A observação de hemozoína por infravermelho demonstra um espectro peculiar com dois picos de transmitância em torno de 1210 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} que são atribuídos a ligação iônica ferro-carboxilato, responsável pela manutenção da estrutura da hemozoína (Slater et al. 1991). Já o espectro de absorção de luz visível revela presença de um pico em aproximadamente 650 nm, característica não encontrada na molécula de heme (Oliveira, et al., 2007).

Distintamente de outros artrópodes onde a digestão localiza-se no lúmem do intestino médio, no carrapato a digestão é intracelular atuando enzimas proteolíticas com atividade ótima em meio ácido. Lara e colaboradores (2003) descreveram a formação de um agregado de heme não-cristalino nas células digestivas do carrapato *Boophilus microplus*. Este agregado é formado e estocado em um tipo peculiar de vesícula intracelular ácida distinta das vesículas digestivas denominada de hemossomo (Lara et al., 2005).

A digestão do sangue em mosquitos é bastante diferente em relação a barbeiros e carrapatos. Uma importante distinção é o pH do trato digestivo dos mosquitos ser levemente básico, ambiente inapropriado para a formação de hemozoína. No *Aedes aegypti*, foram

descritos agregados são pequenos e vistos em toda a matriz peritrófica. Já em *Anopheles gambiae* os agregados de heme são maiores e observados somente no lado luminal da matriz peritrófica (Devenport, M. & Jacobs-Lorena, M., 2004). No entanto pouco se sabe do mecanismo de formação e da estrutura dos agregados de heme em mosquitos.

2. Objetivos

Esta dissertação teve como objetivos:

- Estudar o destino do heme e a formação de agregados ao longo do curso da digestão;
- Investigar a natureza química e a formação do agregado de heme encontrados no intestino de *Aedes aegypti*;

3. Materiais e Métodos:

3.1 Mosquitos

Os mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem Red Eyes) foram mantidos no mosquitário em temperatura média de 28 ° C e 80% de umidade relativa do ar em fotoperíodo 12 h claro: 12 h escuro. Os ovos foram eclodidos em água filtrada no vácuo por 20 minutos. Após eclosão as larvas eram transferidas para bandejas com água filtrada e desclorada, alimentadas com ração para cachorro triturada (Marca Purina). Os indivíduos adultos eram mantidos em gaiolas plásticas e com um recipiente contendo algodão embebido com solução de sacarose 10% oferecida *ad libitum*. Para a postura de ovos as fêmeas realizavam repasto sanguíneo na orelha de coelhos, e 48 h após a alimentação era colocado um recipiente com água com um pedaço de papel filtro. Depois do período de ovogênese os ovos eram eclodidos conforme descrito acima.

3.2 Dissecção de intestinos médios e PMs de *Aedes aegypti*

Os mosquitos foram colocados no freezer a -20 °C por 2 min. e transferidos para uma placa de Petri mantida no gelo. As dissecções foram feitas em solução PBS (tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) com auxílio de microscópio estereoscópio e pinças.

3.3 Fracionamento do intestino médio de *Aedes aegypti* em gradiente descontínuo de sacarose

Os mosquitos foram alimentados com sangue de coelho e os intestinos médios, sem epitélio foram dissecados em PBS e colocados (20 por preparação) em um homogeneizador Dounce (Tight) com volume final de 1 mL em PBS contendo coquetel de inibidores de protease (AEBSF, aprotinina, leupeptina, bestatina, pepstatina A e E-64) para células de mamíferos e extratos de tecido (Sigma), diluído 1:100.

O material era homogeneizado e aplicado no topo de um gradiente descontínuo de sacarose 20/40/80% (p/v) em PBS. O gradiente era então centrifugado por 2 horas a 4°C, a 21000 x g, em um rotor do tipo “swinging bucket” (Beckman, SW40Ti). Após a centrifugação eram coletadas 20 frações de 0,5 mL com a ajuda de um capilar de vidro de 20 µL conectado a uma bomba peristáltica. As frações foram enumeradas de 0 a 19, onde a fração 0 representa o fundo do tudo (maior concentração de sacarose) e a fração 19 o topo do tubo (menor concentração de sacarose).

3.4 Dosagem de proteína

As dosagens de proteína foram feitas utilizando o método descrito por Lowry e colaboradores (1951) usando albumina sérica bovina como padrão.

3.5 Dosagem de heme

O conteúdo de heme presente nas frações dos gradientes de sacarose foi estimado tratando-se uma alíquota (20 µL) com NaOH 0,1M. Em seguida, os tubos foram mantidos sob agitação por 30 minutos. A quantificação de heme nestas amostras foi feita por leitura espectrofotométrica com comprimento de onda de 400 nm, utilizando uma curva-padrão de hemina em NaOH 0,1M (Oliveira, et al., 2000).

3.6 Espectrometria de absorção de luz

Uma alíquota das 20 frações era diluída 20 ou 40 vezes em PBS e estas soluções foram analisadas no espectrofotômetro GBC UV/VIS 920 através de varredura de duplo feixe entre os comprimentos de onda de 300 a 800 nm para a obtenção dos espectros.

3.7 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total

atenuada (ATR-FTIR)

Aproximadamente 2000 intestinos médios sem epitélio de mosquitos entre 40 - 44 h após alimentação com sangue foram dissecados e fracionados em gradiente de sacarose. Os precipitados eram recolhidos e misturados em um tubo, a amostra final foi lavada 5 vezes em 500 μL de água ultra pura para eliminar resquícios de sacarose. As amostras a serem analisadas foram previamente secas no SpeedVAc. As análises foram feitas sob atmosfera de nitrogênio gasoso em um aparelho Nicolet 6700. Os espectros obtidos correspondem a uma média de 64 varreduras.

3.8 Microscopia eletrônica de varredura

Mosquitos alimentados com sangue foram dissecados em PBS e os intestinos médios fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e paraformaldeído 2% por 2 horas a temperatura ambiente. Após a fixação os intestinos médios foram lavados 3 vezes em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2. A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio 1%, em ferrocianeto de potássio 0,9%, CaCl_2 5 mM e cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 90 min a temperatura ambiente e no escuro. As amostras foram lavadas exaustivamente em água e posteriormente desidratadas gradualmente em concentrações crescentes de etanol. Após a desidratação foi feita a secagem (pelo método do ponto crítico) e depois o material era metalizado com ouro por 50 segundos e observado com distância de trabalho de 15 mm.

Agregados de heme provenientes da fração de maior densidade de sacarose do gradiente foram resuspenso em tampão HEPES 10 mM pH 7,4 e lavados 3 vezes por agitação e posterior centrifugação a 14000 rpm no mesmo tampão para retirar o excesso de sacarose. Na última lavagem o material foi resuspenso em 200 μL de HEPES. Deste volume foi retirada uma alíquota de 10 μL sendo transferida para uma grade de cobre de 100 “mesh”

revestida com FORMVAR 0,5%. A parte inferior da grade era cuidadosamente pressionada em papel filtro para remover o excesso de tampão e deixada secar por 24 h. Em seguida o material foi metalizado com cromo por 75 segundos e observado com distância de trabalho de 8 mm. Ambos grupos (intestino médio e agregado de heme) foram observadas com microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6340F, operando em 5 ou 10 kV.

3.9 Microscopia eletrônica de transmissão e microanálise de raios-X

Intestinos médios eram preparados conforme a seção 3.8 com algumas modificações. As amostras foram fixadas, pós-fixadas, lavadas em tampão cacodilato e desidratadas em uma série de concentrações crescentes de acetona (30 - 100%). Após a desidratação o material era infiltrado, incluído em resina EPON e seco por 48 h a 60 ° C. Cortes ultrafinos (70 nm) obtidos, colhidos em grades de cobre de 300 mesh e contrastados por 40 min em acetato de uranila 5% e por 5 min em citrato de chumbo (nitrato de chumbo 40 mM + citrato de sódio 60 mM). As amostras foram lavadas com excesso de água e deixadas para secar por 24 h a temperatura ambiente.

Agregados de heme provenientes do fundo do gradiente foram resuspenso em água ultra pura e lavados 3 vezes por centrifugação a 14000 rpm para tirar o excesso de sacarose. Na última lavagem o material foi dividido em 2 tubos com volumes iguais. Sendo um resuspenso em tampão HEPES 10 mM pH 7,4 e o outro em solução EGTA 0,1 M pH 7,4. Cada tudo foi lavado 3 vezes nas mesmas soluções. Em seguida os dois tubos foram lavados 3 vezes em tampão HEPES 10 mM pH 7,4. Deste, 10 µL foram transferidos para uma grade de cobre de 100 mesh, revestida com FORMVAR 0,5% e carbono. A parte inferior da grade era cuidadosamente pressionada em papel filtro para retirar o excesso de tampão e deixada secar por 24 h. As amostras foram lavadas em tampão HEPES e não em PBS no intuito de evitar a cristalização do cloreto de sódio na grade após a evaporação da água. Ambas as amostras

(intestino médio e agregado de heme) foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX operando em 60 kV.

Espectros de raios-X por energia dispersiva foram obtidos por 100 segundos utilizando-se um detector de Si(Li) com janela Norvar, 0-10 KeV de dispersão de energia. As análises foram feitas utilizando um sistema de análise Noran/Voyager III no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX operando em 60 kV.

3.10 Morfometria

Os agregados de heme dos cortes ultrafinos, de intestino médio inteiro e isolados tiveram a suas áreas medidas com auxílio do programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para determinação do diâmetro foi considerado cada estrutura um círculo, sendo assim, o diâmetro calculado é relativo a um círculo.

4. Resultados

A observação do intestino de indivíduos adultos de *Aedes aegypti* após alimentação com sangue mostra o aparecimento de uma coloração marrom escuro na periferia do bolo alimentar durante o curso da digestão, indicando que moléculas de heme são liberadas a partir da digestão de hemoglobina no interior do intestino (Páscoa, et al., 2002). A existência de um agregado de heme no intestino do *Aedes aegypti* já havia sido apontada pelo nosso grupo, mas não havia sido estudado o processo de formação e a natureza deste agregado, que foi o objetivo do nosso trabalho.

O primeiro passo foi realizar o fracionamento do conteúdo alimentar em um gradiente descontínuo de sacarose (20 %, 40 % e 80 %), de modo a verificar a possibilidade de isolar componentes da matriz peritrófica. A figura 7 mostra o resultado do fracionamento do conteúdo alimentar de 12, 24, 36, 44 hs após alimentação com sangue, onde nota-se claramente que durante o curso da digestão a coloração vermelha característica do sangue é substituída pela formação de uma banda de material particulado de coloração marrom, na interface entre 40 - 80 % de sacarose, indicado pela seta azul. Há também o aparecimento de um material de coloração marrom precipitado no fundo dos tubos em amostras obtidas de insetos a partir de 24 h após alimentação, o qual aumenta de tamanho ao longo do curso temporal de digestão, indicado pela seta preta.

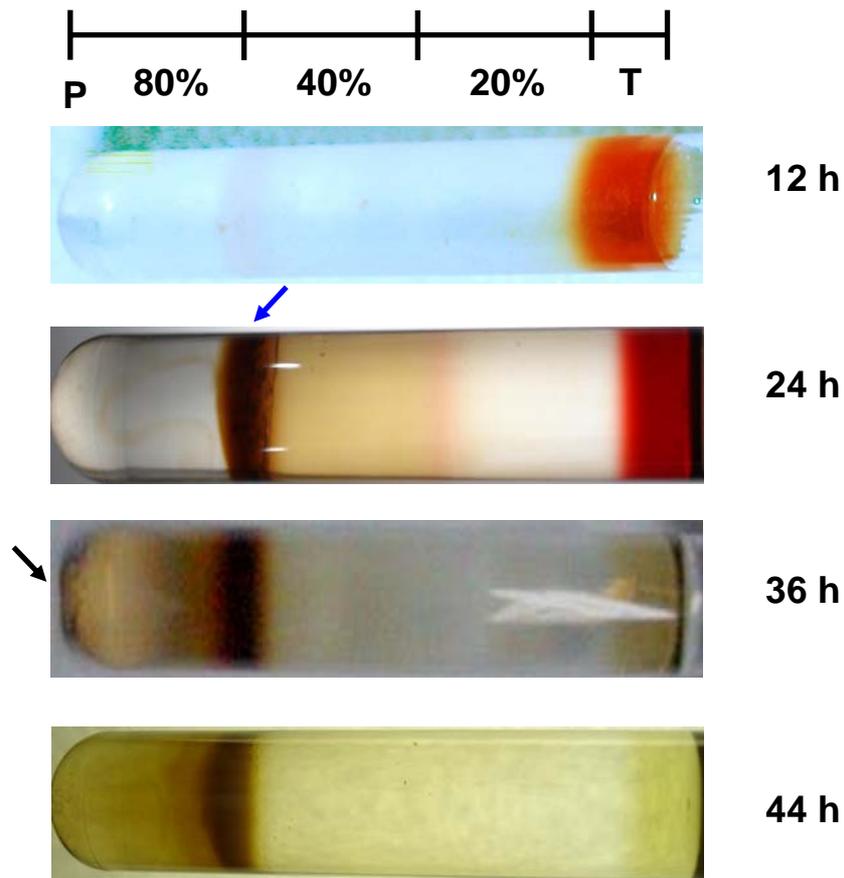


Figura 7: Fracionamento em gradiente descontinuo de sacarose do conteúdo alimentar de *Aedes aegypti* 12, 24, 36, 44 hs após alimentação com sangue. O intestino médio de 20 fêmeas adultas foi dissecado em PBS, o epitélio foi descartado e a matriz peritrófica e conteúdo homogenizados e aplicados em um gradiente descontinuo (20%, 40% e 80%) de sacarose. As letras representam: (P) precipitado e (T) topo: local onde foi aplicado o homogenato. Após a centrifugação foram coletadas 20 frações de 500 μ L. As frações foram enumeradas de 0 a 19, onde a fração 0 representa o fundo do tudo (maior densidade de sacarose) e a fração 19 o topo do tubo (menor densidade de sacarose).

A análise desse precipitado ressuspenso em água (fração 0) obtido pelo fracionamento do conteúdo intestinal de mosquitos com 44 h após alimentação por espectrofotometria de absorção de luz mostrou espectros com picos largos com máximos em 401 nm e 645 nm – linha preta (Figura 8A). A mesma amostra quando solubilizada em NaOH 0,1 M – linha cinza, apresenta um espectro diferente, com picos mais estreitos e com máximos de absorção em 386 nm e 617 nm, idêntico ao da hemina – linha vermelha, com bandas de Soret e Q bem característicos.

Na intenção de identificar e caracterizar o agregado presente no intestino do mosquito *Aedes aegypti*, foi feita a análise do precipitado (fração 0) de mosquitos com 40 - 44hr após alimentação com sangue e de hemina por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada. Como mostrado na figura 8B, o espectro de infravermelho da hemina é diferente ao exibido pelo precipitado. Os picos de transmitância proeminentes da hemina são 938 cm^{-1} , 1279 cm^{-1} , 1413 cm^{-1} e 1698 cm^{-1} referentes aos dois grupamentos de ácido propílico. (Silverstein et al., 1994). Embora os picos de heme apareçam também nos espectros do precipitado, este exhibe outros picos de transmitância distintos em 1023 cm^{-1} , 1176 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} , 1561 cm^{-1} e 1659 cm^{-1} indicados pelas setas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente, podendo ser a assinatura de outros componentes do agregado. Nota-se ainda a ausência do pico em 1698 cm^{-1} característico da vibração de alongamento da ligação C=O do grupamento carboxílico da hemina, (Silverstein et al., 1994) sugerindo que essa ligação interage com outros átomos dentro da estrutura do agregado. No entanto, o precipitado (fração 0) não exibiu picos de transmitância em torno 1210 cm^{-1} e 1663 cm^{-1} que são característicos da hemozóina. (Slater, et al., 1991). Estes picos correspondem às ligações ferro-carboxilato entre as moléculas de heme, responsáveis pela estrutura desse cristal. Esses resultados indicam que no precipitado (fração 0) há um agregado de heme que não envolve a formação de ligação ferro-carboxilato (Oliveira et al., 2005, Pagola, et al., 2000) e tendo uma certa

semelhança ao agregado de heme do carrapato *Boophilus microplus* (Lara, et al., 2003), existindo dois picos de transmitância coincidentes, em torno de 1659 cm^{-1} e 1561 cm^{-1} e outros 5 distintos, 1392 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} , 1279 cm^{-1} , 1176 cm^{-1} e 1023 cm^{-1} , além de ambos terem a ausência do pico de 1698 cm^{-1} .

O fracionamento do conteúdo intestinal dissecado 12 h após a alimentação (Figura 9A) mostra possível hemoglobina ainda não digerida no topo do gradiente, onde se concentram tanto a maior parte do heme total quanto as proteínas (frações 15-19), mantendo coloração vermelha, característica da hemoglobina. Já 24 h após a alimentação (Figura 9B), 47,9 % do heme presente no gradiente encontra-se no topo, ainda na forma de hemoglobina, mas já há uma banda difusa de heme na região de 40 % de sacarose (frações 7-12) e ocorre a formação de uma banda marrom escura com material particulado na interface 40-80 % sacarose, contendo 23 % do heme. Observa-se também um precipitado aderido ao fundo do tubo (fração 0) contendo cerca de 7,1 % do heme total do gradiente. Esse perfil muda 36 h após a alimentação (Figura 9C). Podemos observar uma queda nos níveis de proteína no topo em relação às demais frações, assim como da quantidade de heme nestas frações, que não possuem mais coloração típica vermelha da hemoglobina. Também se observa um resquício de heme na região contendo 40 % de sacarose, e há a presença da banda marrom na interface 40-80 %, porém mais escura quando comparada com os gradientes obtidos 24 h após a alimentação. Esta banda contém cerca de 57,4 % do heme e é acompanhada outra vez por uma grande quantidade de proteína. Porém podemos observar uma queda nos níveis de proteína no topo em relação às demais frações. Há um aumento na quantidade de precipitado no fundo do tubo, com 22,4 % do heme que foi fracionado.

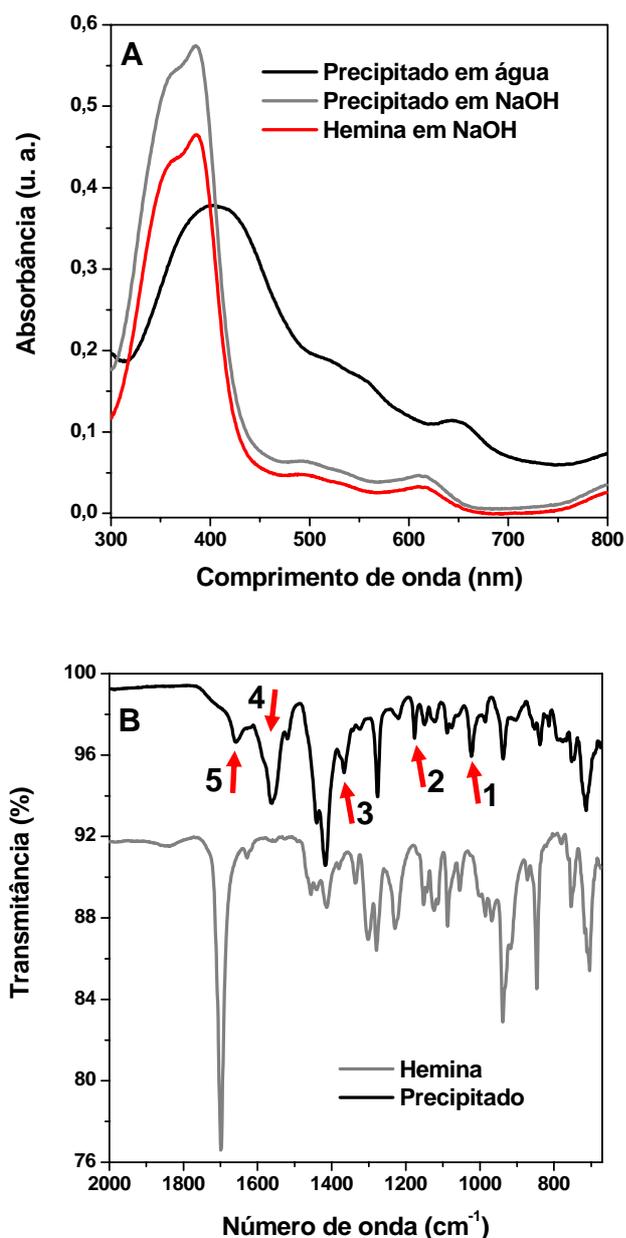


Figura 8: Espectroscopia de absorção de luz e de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada do precipitado (fração 0). **A** - Espectros de absorção do precipitado em água (linha preta); precipitado em NaOH 0,1 M (linha cinza) e hemina 12 μ M em NaOH 0,1 M (linha vermelha). **B** - Espectros de ATR-FTIR do precipitado (linha preta) e hemina (linha cinza). As setas 1, 2, 3, 4 e 5 indicam os picos de transmitâncias do precipitado distintos do espectro de hemina, 1023 cm^{-1} , 1176 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} , 1561 cm^{-1} e 1659 cm^{-1} , respectivamente.

O último ponto do curso temporal foi colhido em 44 h, pouco antes da excreção total dos resíduos da digestão (~48 h). O perfil do fracionamento (Figura 9D) apresenta uma quantidade de proteína 3 vezes menor no precipitado (fração 0) quando comparado com a fração 0 do gradiente de 36 h. A quantidade de heme presente na banda e no precipitado é 51,2% e 32,1% respectivamente, em relação ao heme total do gradiente. Os resultados que apresentados até este ponto indicam que o heme tende a agregar no sistema digestório do *Aedes aegypti* ao longo da digestão do sangue.

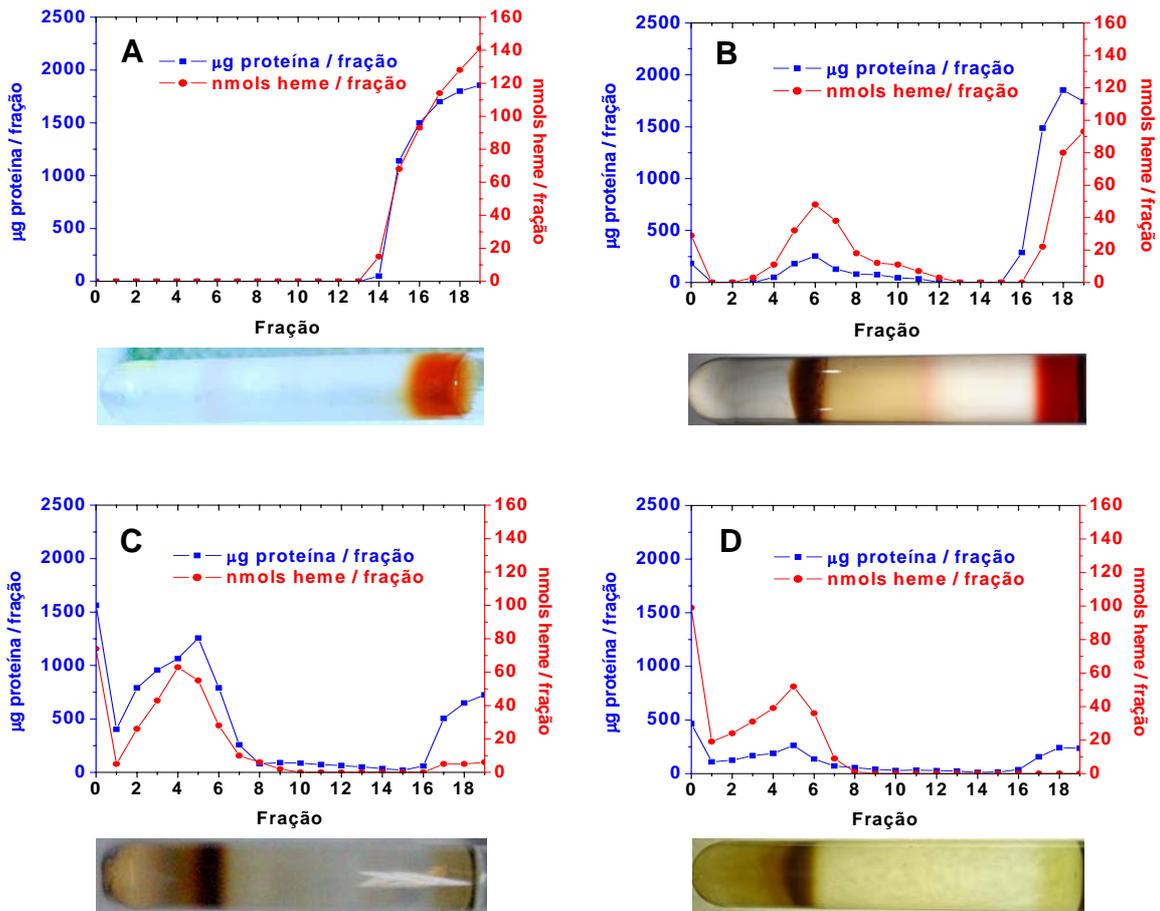


Figura 9: Dosagem de heme e proteína nas frações coletadas do gradiente de sacarose. Uma alíquota das frações foi diluída em NaOH 0,1M, e a quantificação de heme nestas amostras foi feita por leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 400 nm, utilizando uma curva-padrão de hemina em NaOH 0,1M como referência. As dosagens de proteína foram feitas utilizando o método descrito por Lowry. Figura A, B, C e D: concentração de heme e proteína em cada fração nos tempos de 12, 24, 36 e 44 hs após alimentação, respectivamente.

Procuramos em seguida estudar a estrutura e a formação desse agregado de heme por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, mosquitos foram alimentados com sangue e os intestinos dissecados 24 h após alimentação e processados para a microscopia eletrônica de transmissão, não sendo contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo de modo a preservar a eletrondensidade natural das amostras, decorrente da presença de ferro acumulado. A figura 10A mostra o epitélio intestinal (EP), microvilosidades (MV), matriz peritrófica (PM) e o bolo alimentar (BL), onde notamos a presença de estruturas muito eletrodensas, que seriam os agregados de heme. A figura 10B mostra essas estruturas eletrodensas em maior aumento, mostrando que o agregado apresenta um aspecto relativamente homogêneo, com dimensão média de 78 ± 15 nm. Na figura 10C podemos observar a presença da camada de quitina que separar os agregados de heme das células epiteliais. A figura 11 resume a distribuição da frequência de diâmetros dos agregados encontrados na figura 10B (n=53). A observação de cortes ultrafinos do intestino médio deixa claro que essas estruturas eletrodensas apresentam um aspecto diferente dos cristais de hemozoína encontrados no intestino de triatomíneos como o *Rhodnius prolixus* ou em *Schistosoma mansoni* (Oliveira, et al., 2005).

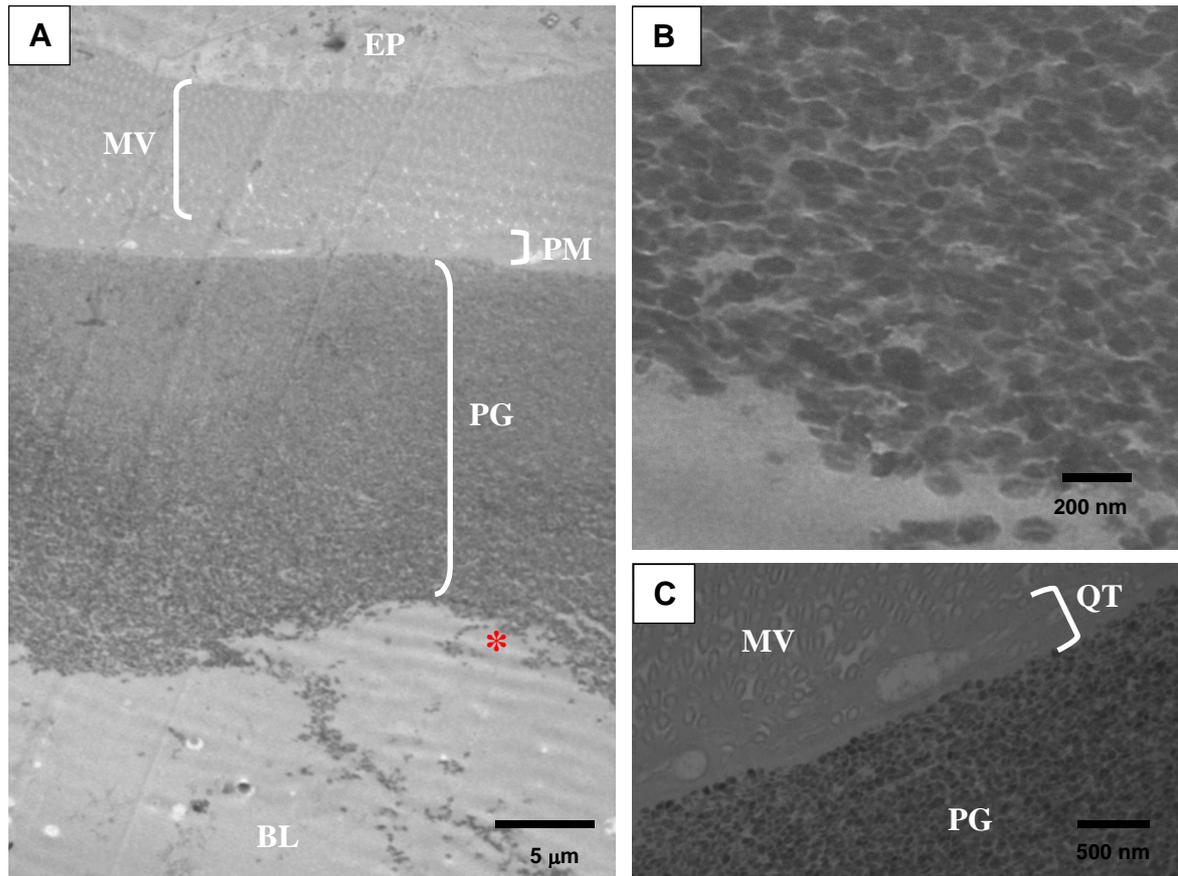


Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão do intestino médio de *Aedes aegypti* 24 h após alimentação com sangue. **A** - Corte transversal ultrafino do intestino sem contrastação. **B** - Detalhe da figura A, asterisco vermelho. **C** - Aspecto estrutural da matriz peritrófica. As siglas representam: EP – epitélio intestinal; PM – matriz peritrófica; PG – camada subperitrófica; BL – bolo alimentar; MV – microvilosidades; QT – Quitina. As setas indicam o agregado de heme.

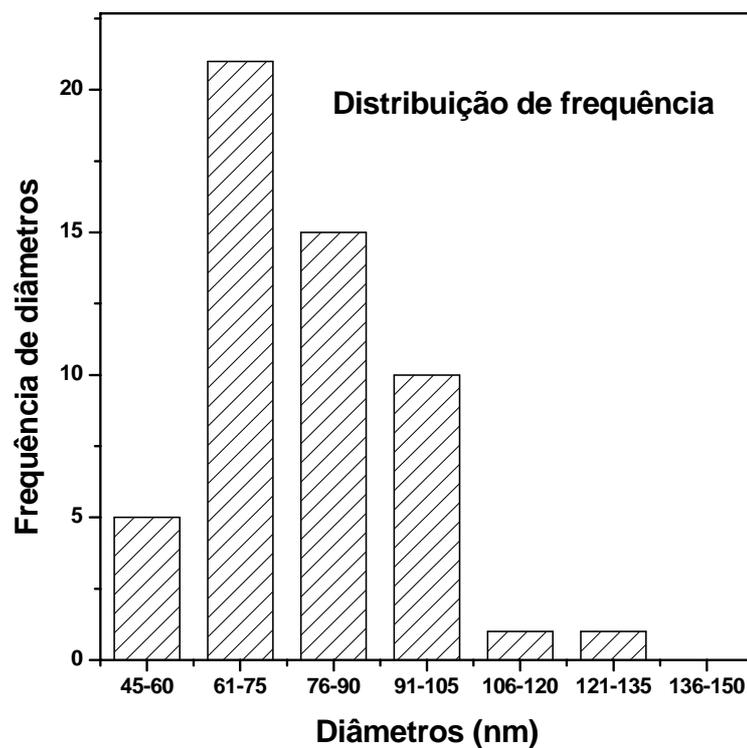


Figura 11: Medidas morfométricas dos agregados de heme no intestino médio de *Aedes aegypti* 24 h após alimentação com sangue. Os valores de diâmetro são relativos a área de um círculo. A frequência de diâmetros foi calculada a partir da figura 10B.

De forma a complementar, os dados obtidos com microscopia eletrônica de transmissão, o agregado na matriz peritrófica foi também estudado utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo. Na figura 12, são mostradas imagens com diversas ampliações de um intestino médio 24 h após a alimentação. A figura 12A é um corte transversal que mostra epitélio intestinal (EP), matriz peritrófica (PM) e conteúdo alimentar (BL) em baixo aumento. A figura 12B é um aumento da região compreendida como matriz peritrófica (PM), além dessa camada, podemos observar as microvilosidades (MV) e o bolo alimentar (BL). A figura 12C é uma imagem do detalhe da matriz peritrófica, onde é possível notar que a matriz peritrófica está tomada de pequenas cavidades medindo entre 70 a 90 nm, que podem ser mais bem observadas na figura 12D. Uma vez que os intestinos médios foram processados após o corte transversal, imaginamos que essas cavidades representam possivelmente a localização dos agregados de heme, que teriam sido extraídos durante o processamento de corte transversal do intestino durante as lavagens com tampões e etanol e/ou na etapa de ponto crítico, deixando assim a sua impressão na matriz peritrófica. Uma vez que essa abordagem impedia a visualização direta dos agregados, foi utilizada outra metodologia para a sua observação. Mosquitos alimentados com sangue foram dissecados 24h após alimentação tiveram seus epitélios parcialmente ou totalmente removidos de forma que a matriz peritrófica fosse minimamente perturbada. Posteriormente foram processados para a microscopia eletrônica de varredura mostrada na figura 13A onde pode-se observar intestino médio do mosquito com o epitélio intestinal rebatido expondo a matriz peritrófica (PM). A figura 13B é um aumento da região de matriz expondo uma região de fendas oriunda da manipulação e processamento da amostra. A figura 13 C mostra uma imagem com maior aumento, que revela a presença na matriz peritrófica de estruturas de dimensões entre 48 - 150 nm (indicadas pelas setas) incluídas dentro de uma trama fibrosa. A figura 14 resume a distribuição da frequência de diâmetros dos agregados

encontrados na figura 13C (n=73). A disposição destas estruturas sugere que correspondam aos agregados de heme da matriz peritrófica, possivelmente retidos em meio a uma rede de feixes de quitina, dispostos em camadas. A figura inserida em 13C mostra o detalhe da estrutura dos agregados. A figura 13D é uma imagem aumentada da figura 13C, reforçando a hipótese de que os agregados estão entre camadas de quitina. As setas indicam os alguns agregados. A imagem inserida na figura 13D mostra com maior riqueza de detalhes o agregado, com morfologia circular e tamanho de 116 nm, barra de escala relativa a 100 nm. A figura 13E é a região com asterisco verde aumentada 25000X, onde se observa a presença dos agregados junto a matriz peritrófica. Na figura inserida (Figura 13E) podemos observar que os agregados têm morfologia relativamente homogênea. A figura 13F é uma ampliação da área de asterisco vermelho no painel B, onde é possível identificar os agregados e a rede de quitina que os envolve.

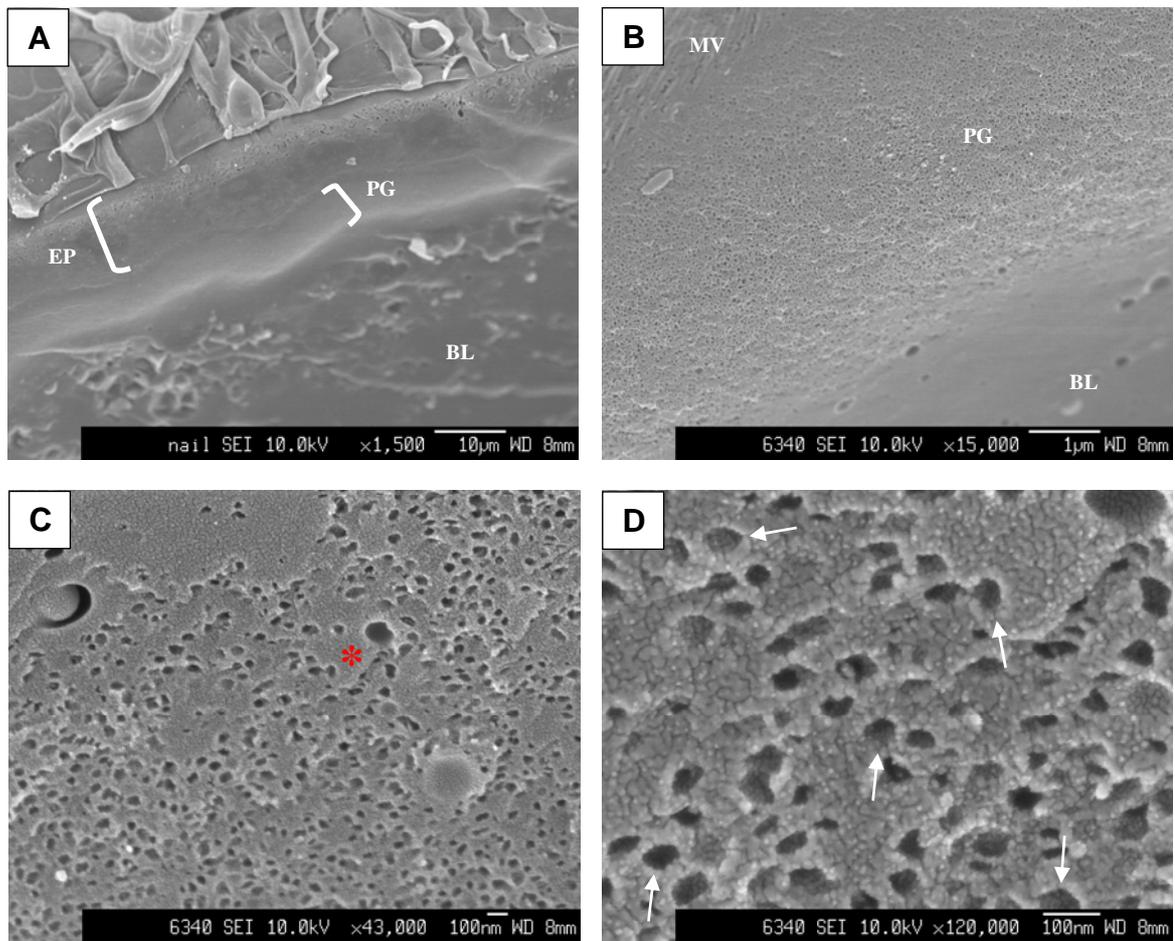


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do intestino médio de *Aedes aegypti* 24 h após alimentação com sangue. **A** - corte transversal do intestino médio (metalizado com ouro). **B** - detalhe da figura A, mostrando a microvilosidades, matriz peritrófica e bolo alimentar. **C** - aumento da região da matriz peritrófica da figura B. **D** - aumento da região com asterisco vermelho, as setas indicam a localização do agregado junto a matriz peritrófica. As siglas representam: EP – epitélio intestinal; PG – camada gel subperitrófica; BL – bolo alimentar.

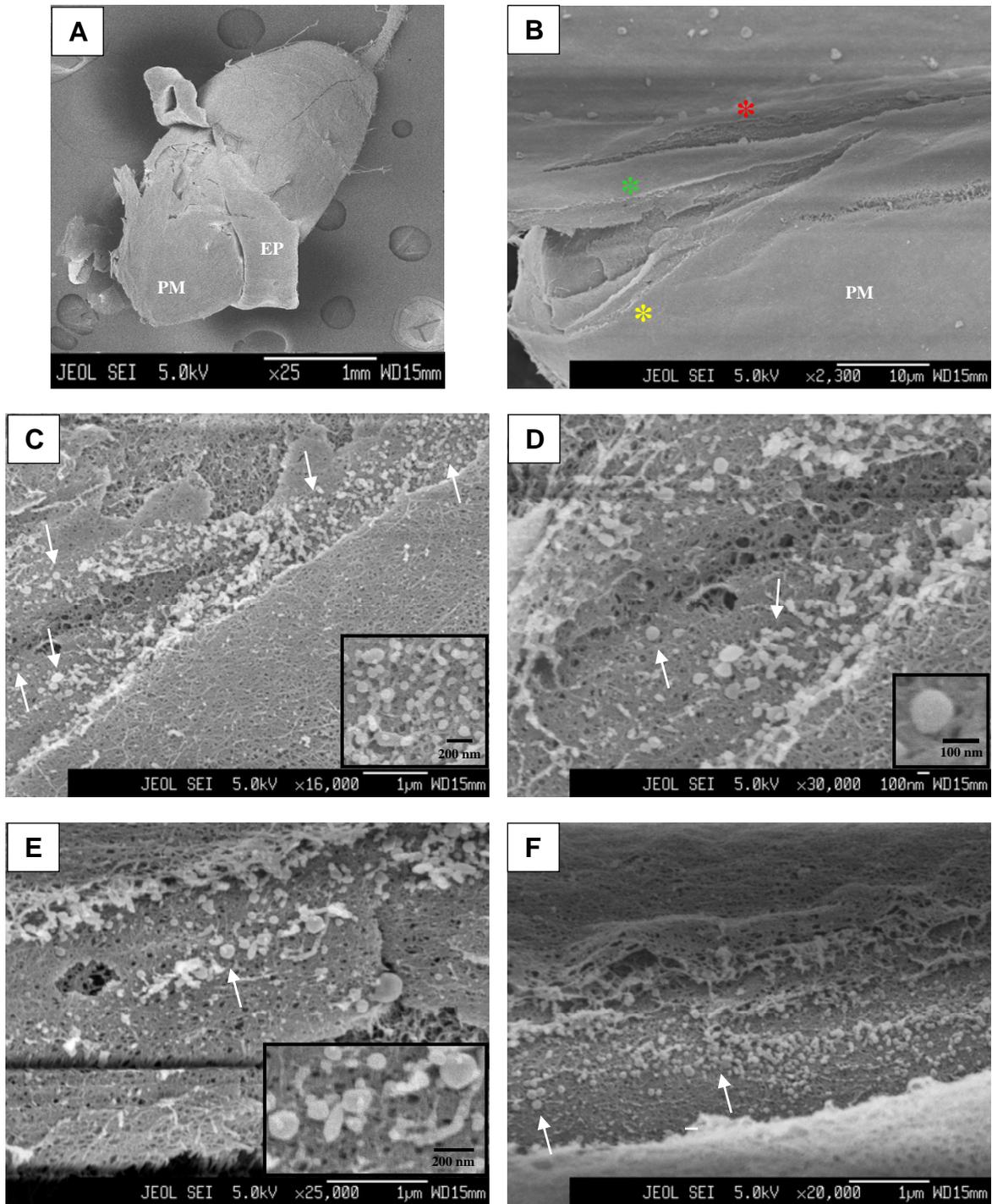


Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do intestino médio de *Aedes aegypti* 24 h após alimentação com sangue. A - intestino médio com o epitélio rebatido (metalizado com ouro). B - matriz peritrófica com fendas. C - aumento da região com asterisco amarelo. D - detalhe dos agregados de heme da figura C. E - aumento da região com asterisco verde. F - aumento da região com asterisco vermelho. As imagens dentro dos painéis C, D e E mostram com detalhe a morfologia dos agregados, as barras de escalas representam 200 nm (C, E) e 100 nm (D). As siglas representam: EP – epitélio intestinal; PM – matriz peritrófica. As setas indicam o agregado de heme.

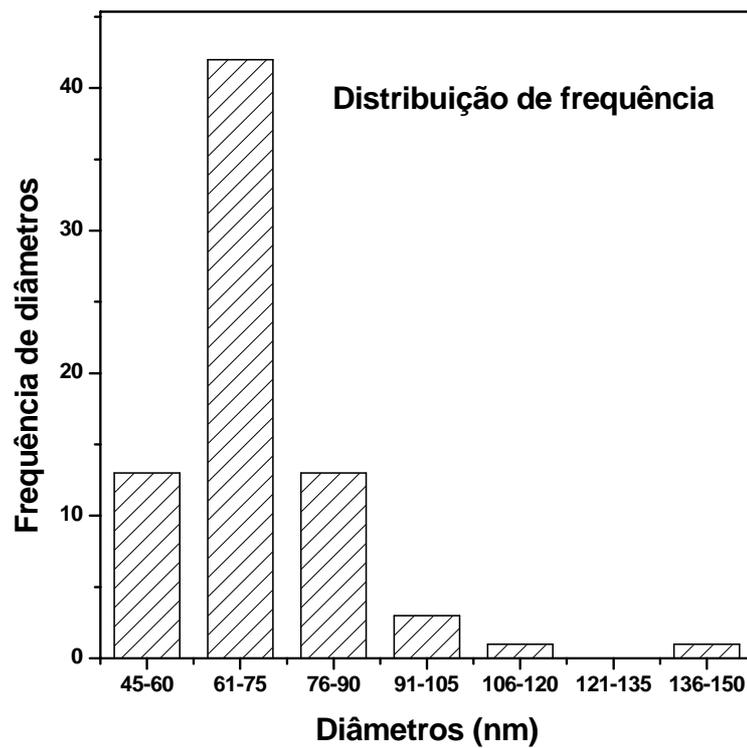


Figura 14: Morfometria dos agregados de heme no intestino médio de *Aedes aegypti* 24 h após alimentação com sangue. Os valores de diâmetro são relativos a área de um círculo. A frequência de diâmetros foi calculado a partir da figura 14C.

Com o intuito de confirmar a identificação das estruturas eletrodensas observadas nas figuras anteriores como sendo os agregados de heme, e que esses agregados podem ser isolados durante o processo de centrifugação no gradiente de sacarose, o precipitado (fração 0) foi observado utilizando um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (figuras 15 e 16). Pelas imagens, nota-se que tanto a morfologia como o tamanho dos agregados é muito semelhante, com forma de um polígono regular achatado, aproximando-se de um círculo em alguns casos (Figura 16E), e com tamanho variando entre 83 a 128 nm.

A utilização do gradiente de sacarose para separar componentes do conteúdo alimentar permitiu o isolamento de agregados de tamanhos e forma similares. A observação desses agregados provenientes do precipitado (fração 0) em um microscópio eletrônico de transmissão equipado com sistema de análise de elementos por microanálise permitiu a análise da composição atômica do material. A figura 17A mostra agregados isolados do conteúdo alimentar 24 h após alimentação sobre uma grade de cobre revestida com Formvar e carbono. A figura 17B é um aumento da região com asterisco vermelho, a seta indica o local onde a composição elementar foi determinada. A microanálise nesse local mostrou abundância relativa de ferro, cálcio, além de carbono, cobre e silício (Figura 17C). Uma vez que a análise da grade na ausência de amostra mostrou os últimos três picos, (Figura 17D), este resultado permite concluir que os agregados são ricos em ferro e cálcio. O mesmo resultado encontrado foi obtido com agregados isolados de insetos 36 e 44 hs após alimentação (Figura 17F e 17H).

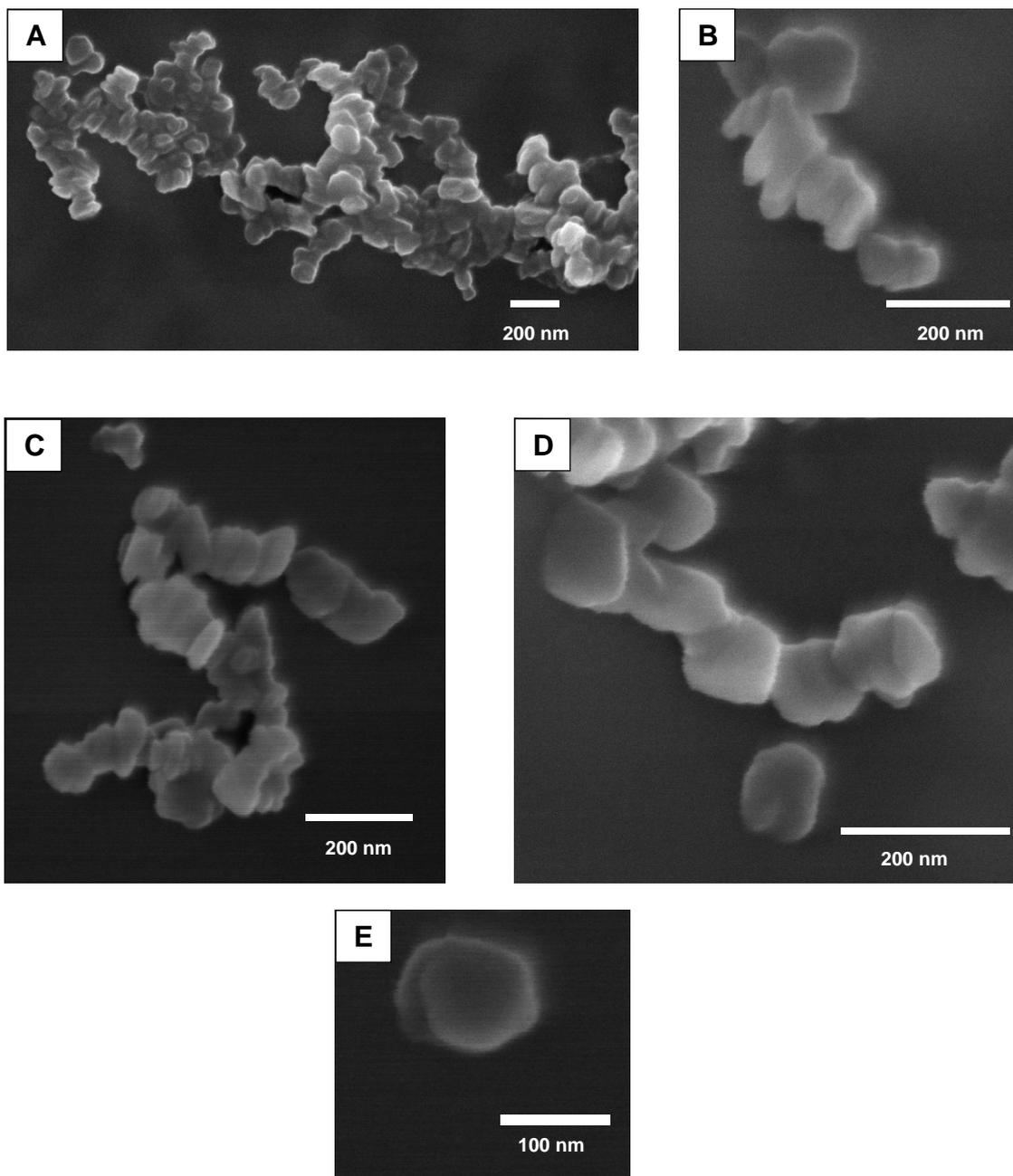


Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do precipitado (fração 0) do fracionamento do conteúdo alimentar do intestino de *Aedes aegypti* 24 h após alimentação com sangue. Os agregados foram isolados em gradiente descontínuo de sacarose e o precipitado lavado em tampão HEPES 10mM pH 7,4. A suspensão de agregados foi transferida para uma grade de cobre revestida com FORMVAR e metalizadas com cromo.

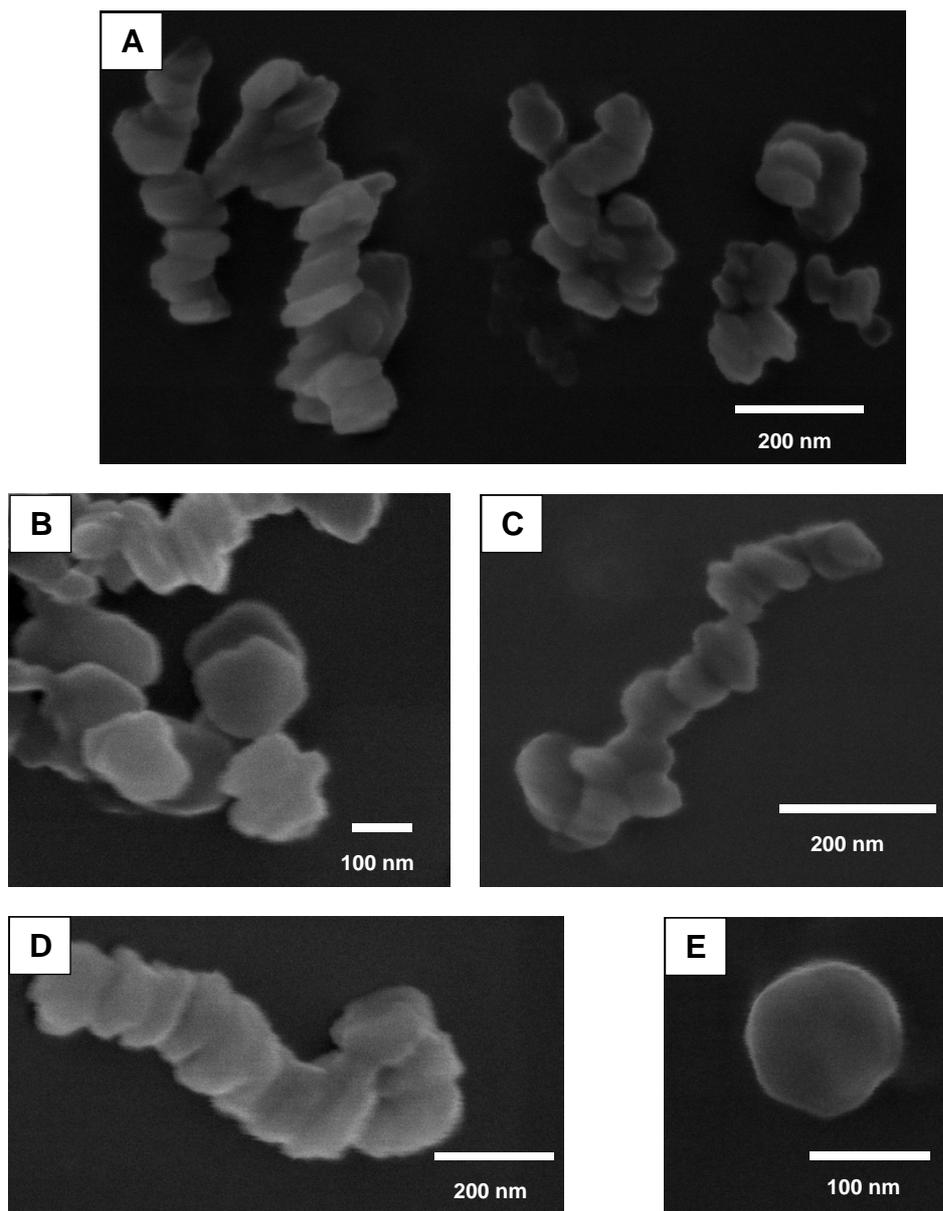


Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do precipitado (fração 0) do fracionamento do conteúdo alimentar do intestino de *Aedes aegypti* 44 h após alimentação com sangue. Os agregados foram isolados em gradiente descontínuo de sacarose e o precipitado lavado em tampão HEPES 10mM pH 7,4. A suspensão de agregados foi transferida para uma grade de cobre revestida com FORMVAR e metalizadas com cromo.

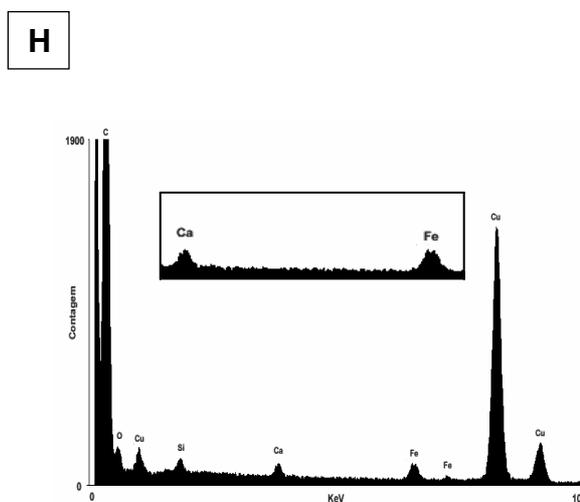
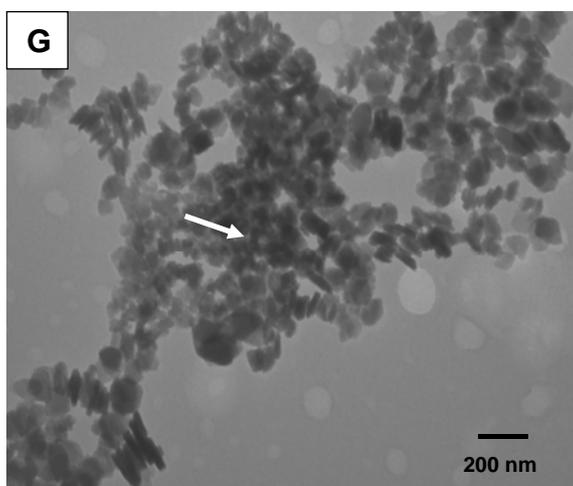
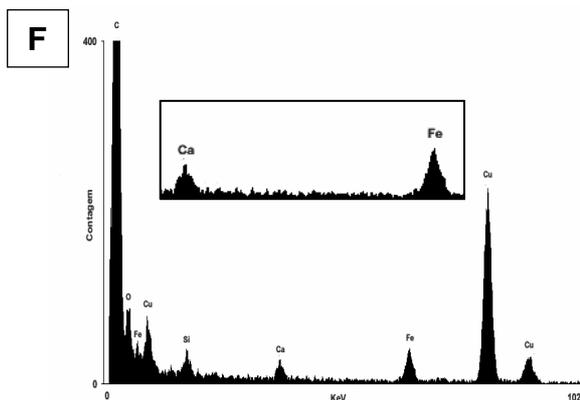
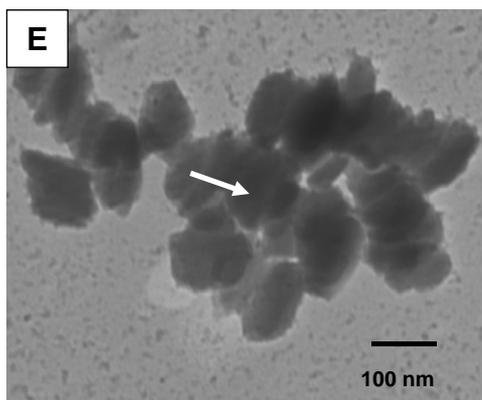
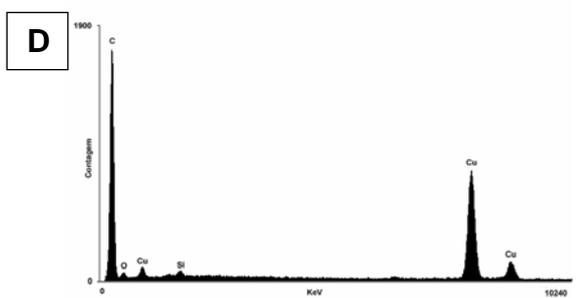
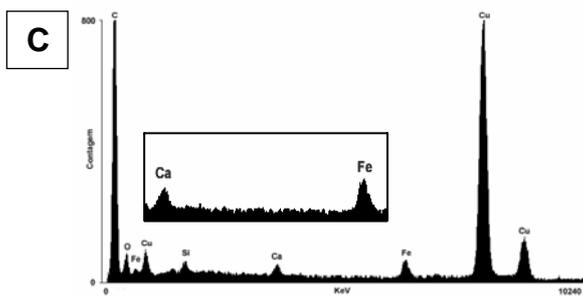
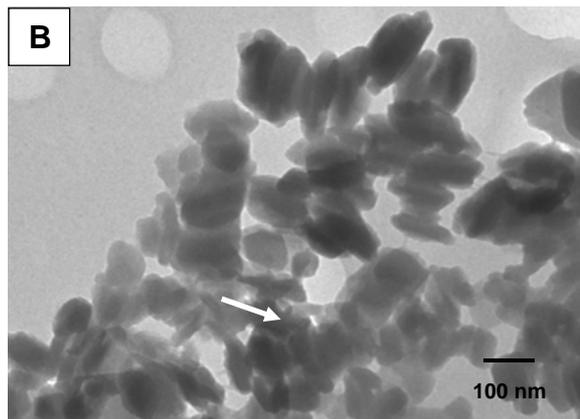
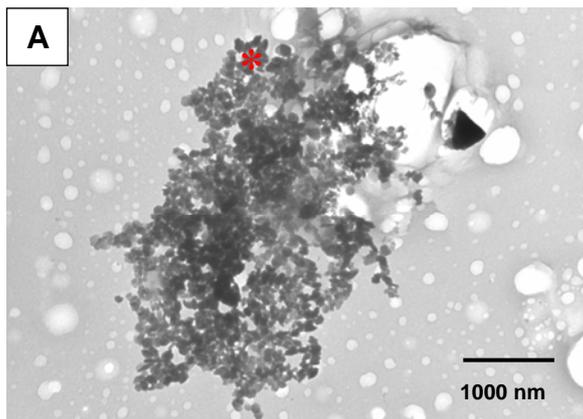


Figura 17: Microscopia eletrônica de transmissão e espectro de microanálise de raio-X do precipitado (fração 0) do fracionamento do conteúdo alimentar do intestino de *Aedes aegypti* 24, 36 e 44 hs após alimentação com sangue. Os agregados foram isolados em gradiente descontinuo de sacarose e o precipitado lavado em tampão HEPES 10 mM pH 7,4. A suspensão de agregados foi transferida para uma grade de cobre revestida com FORMVAR e carbono. **A** - Agregados de heme 24 h. **B** - Detalhe do local de aquisição de microanálise, a seta indica o local onde foi determinada a composição de elementos. **C** - Espectro de microanálise de raios-X do painel B. **D** - Espectro de microanálise de raios-X do FORMVAR. **E** - Agregados de heme 36 h. **F** - Espectro de microanálise de raios-X da painel E. **G** - Agregados de heme 44 h. **H** - Espectro de microanálise de raios-X da painel G.

Com o objetivo de esclarecer se a presença do cálcio é necessária para a estabilidade do agregado, uma amostra de agregados proveniente da fração 0 do fracionamento do conteúdo alimentar 44 h após alimentação foi incubada e agitada com EGTA 10 mM pH 7,4 e posteriormente foi lavada em HEPES. A figura 18A mostra a imagem desses agregados após o tratamento e a seta indica o local de onde foi obtido o espectro de microanálise (Figura 18B), onde se obteve apenas o sinal de ferro na amostra, revelando que o cálcio foi extraído pelo EGTA, sugerindo uma localização superficial e indicando que o cálcio não participa da estrutura do agregado. As figura 18C é imagem obtida com maior aumento da região apontada pelo asterisco vermelho e a figura 18D é uma imagem ainda mais ampliada, de forma a revelar detalhes da ultraestrutura dos agregados, mostrando a manutenção dos agregados após a retirada do cálcio.

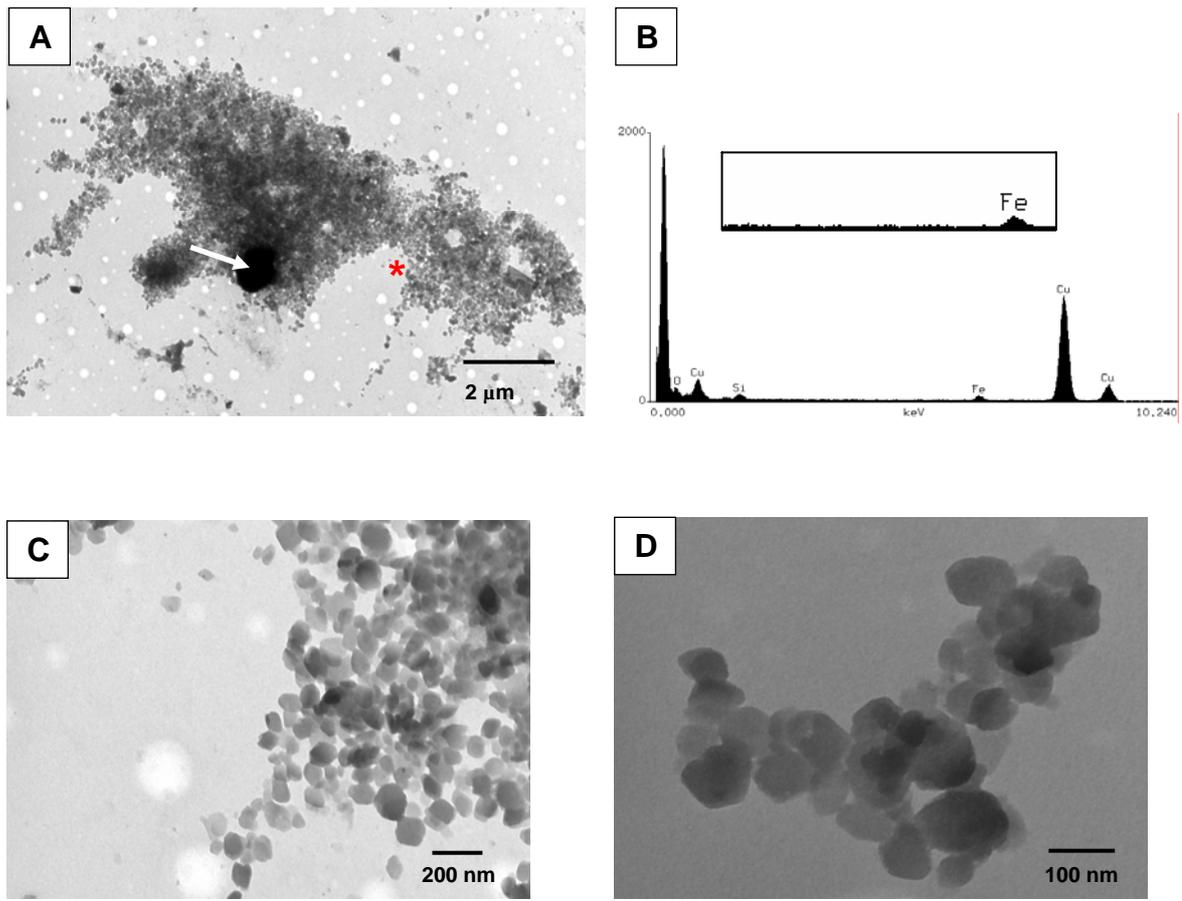


Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão e espectro de microanálise de raio-X do precipitado (fração 0) tratado com EGTA. Os agregados foram isolados em gradiente descontinuo de sacarose e o precipitado lavado em EGTA 100 mM pH 7,4, posteriormente lavado em tampão HEPES 10 mM pH 7,4. A suspensão de agregados foi transferida para uma grade de cobre revestida com FORMVAR e carbono. **A** - Agregados de heme, a seta indica o local onde foi determinada a composição de elementos. **B** - Espectro de microanálise de raios-X do painel A. **C** - Detalhe da figura A, local marcado pelo asterisco vermelho. **D** - aspecto ultraestrutural de agregados de heme lavados com EGTA.

O uso do gradiente de sacarose para separar componentes do conteúdo alimentar permitiu o isolamento uma banda marrom escura com material particulado na interface 40 - 80 % sacarose que apresenta heme e proteína na sua composição. Através do microscópio eletrônico de transmissão foi possível fazer uma breve caracterização e a composição elementar. Para isso, a fração 5 foi processada da mesma maneira que os agregados, exceto pela velocidade de centrifugação utilizada, para baixar todo o material presente na fração 5 foi utilizada uma ultracentrífuga a 21000 g por 15 min. A figura 19A é a fração 5 obtida do fracionamento de conteúdo alimentar 24 h após alimentação. É possível identificar agregados de mesma morfologia e tamanho em relação aos agregados da fração 0. Além disso, há a presença de material amorfo difuso, indicado pelo asterisco vermelho na imagem, sugerindo ser componentes da matriz peritrófica. A seta indica o local onde foi realizado a microanálise, o espectro mostra a presença de ferro e cálcio, além de picos de outros átomos tais como enxofre e cloro (Figura 19C). O sinal de enxofre é interpretado na literatura como marcador biológico de proteína na microanálise, sugerindo a presença de proteínas na fração 5. Para confirmar o resultado foram adquiridas imagens e espectro de microanálise da fração 5 obtida do fracionamento de conteúdo alimentar 44 h após alimentação. Na figura 19D observamos a presença de agregados bem estruturadas, mas de menor tamanho quando comparado com os agregados da fração 0, a seta vermelha indica esses agregados de tamanho reduzido. Há também a presença de material amorfo indicado pelo asterisco vermelho. A seta branca indica o local no qual foi feita a microanálise desta se obteve a mesma composição química: ferro, cálcio, enxofre e cloro (Figura 19E).

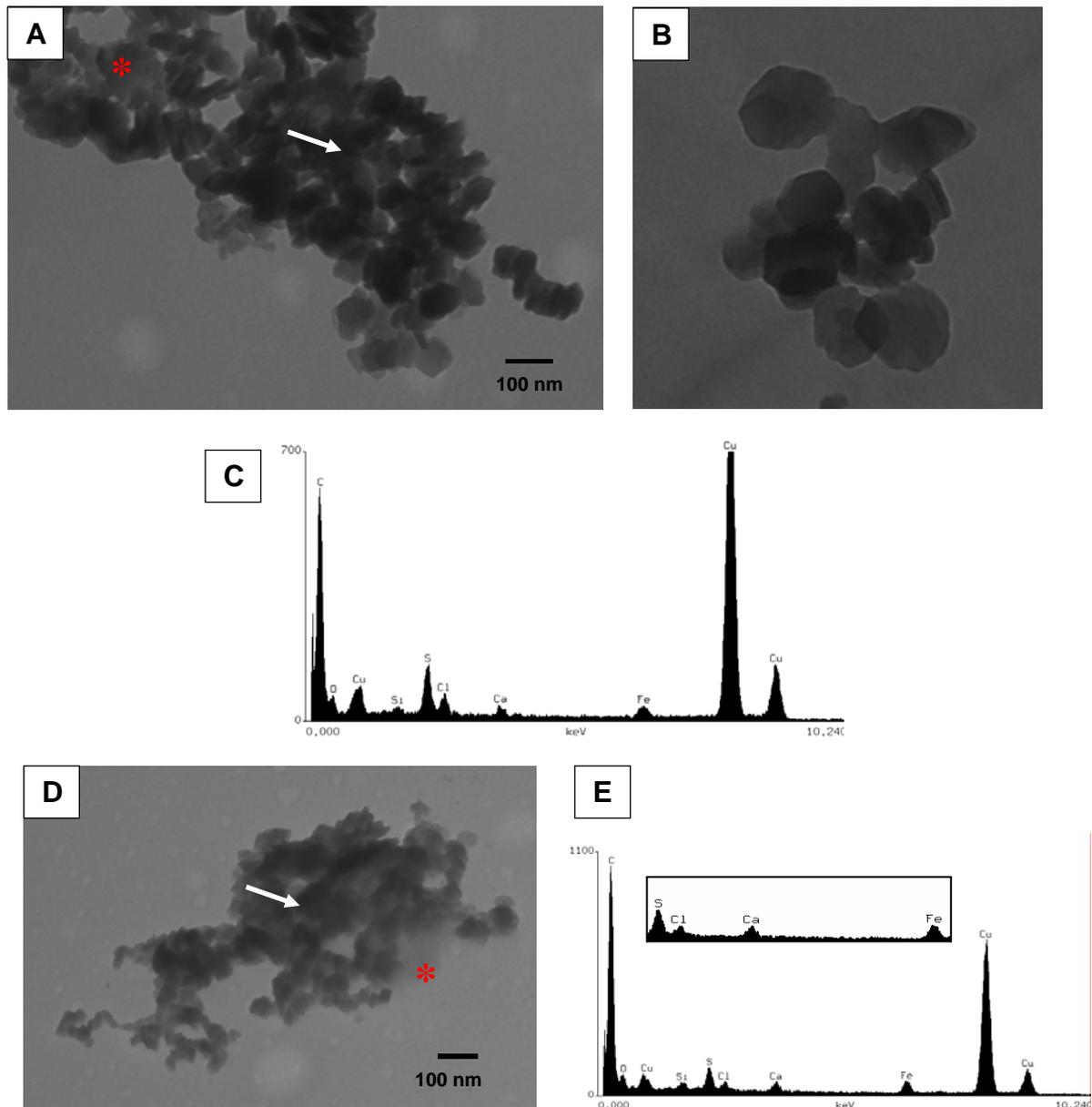


Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão e espectro de microanálise de raio-X da fração 5 do fracionamento do conteúdo alimentar do intestino de *Aedes aegypti* 24 e 44 hs após alimentação com sangue. A fração foi lavado em tampão HEPES 10mM pH 7,4 e posteriormente transferida para uma grade de cobre revestida com FORMVAR e carbono. **A - Agregados de heme da fração 5, 24 h após alimentação, a seta indica o local onde foi determinada a composição elementar. **B** - aspecto ultraestrutural de agregados de heme da fração 5. **C** - Espectro de microanálise de raios-X da painel A. **D** - Agregados de heme da fração 5, 44 h após alimentação a seta indica o local onde foi determinada a composição de elementos. **E** - Espectro de microanálise de raios-X da painel E.**

Devido a grande diversidade de organismos que possuem membrana/matriz peritrófica, e a grande diversidade estrutural destas há dificuldade na determinação da nomenclatura a ser utilizada. Em alguns casos a matriz peritrófica está intimamente associada as microvilosidades do intestino médio (matriz peritrófica do tipo 1), em outros casos não apresenta limites bem definidos, tendo aspecto de gel, sendo denominada gel peritrófico (Terra, 1996; Terra 2001; Tellam, 1996). Ambos os nomes são largamente usados na literatura.

Na figura 20 mostra como definição que essas duas regiões são distintas estruturalmente. A figura 20A observamos o intestino médio com epitélio rebatido (ER) expondo a matriz peritrófica (PM). A figura 20B é um aumento da região com asterisco vermelho expondo uma região de fissura oriunda da manipulação e processamento da amostra. Nota-se na imagem que há distinção estrutural e de composição entre as duas regiões de forma que sugerimos o uso do termo matriz peritrófica (PM) e gel subperitrófico (PG). A figura 20C mostra com mais detalhes a região com asterisco amarelo. Na matriz peritrófica (PM) observamos a presença de uma rede fibrosa compacta de quitina em camadas, mais externa, enquanto a camada gel subperitrófico (PG) tem aspecto esponjoso, que pode conter algumas ou raras fibras de quitina, essencial para a manutenção. Quando enzimas da biosíntese de quitina são silenciadas pelo método de RNAi há o desaparecimento da matriz peritrófica e também do camada subperitrófica (Kato, et al., 2006). A figura 20D é uma visão externa do conteúdo alimentar sem as células epiteliais em baixo aumento, nessa imagem fica visível a diferença estrutural entre as duas regiões, uma região compacta (PM) e outra com característica esponjosa (PG).

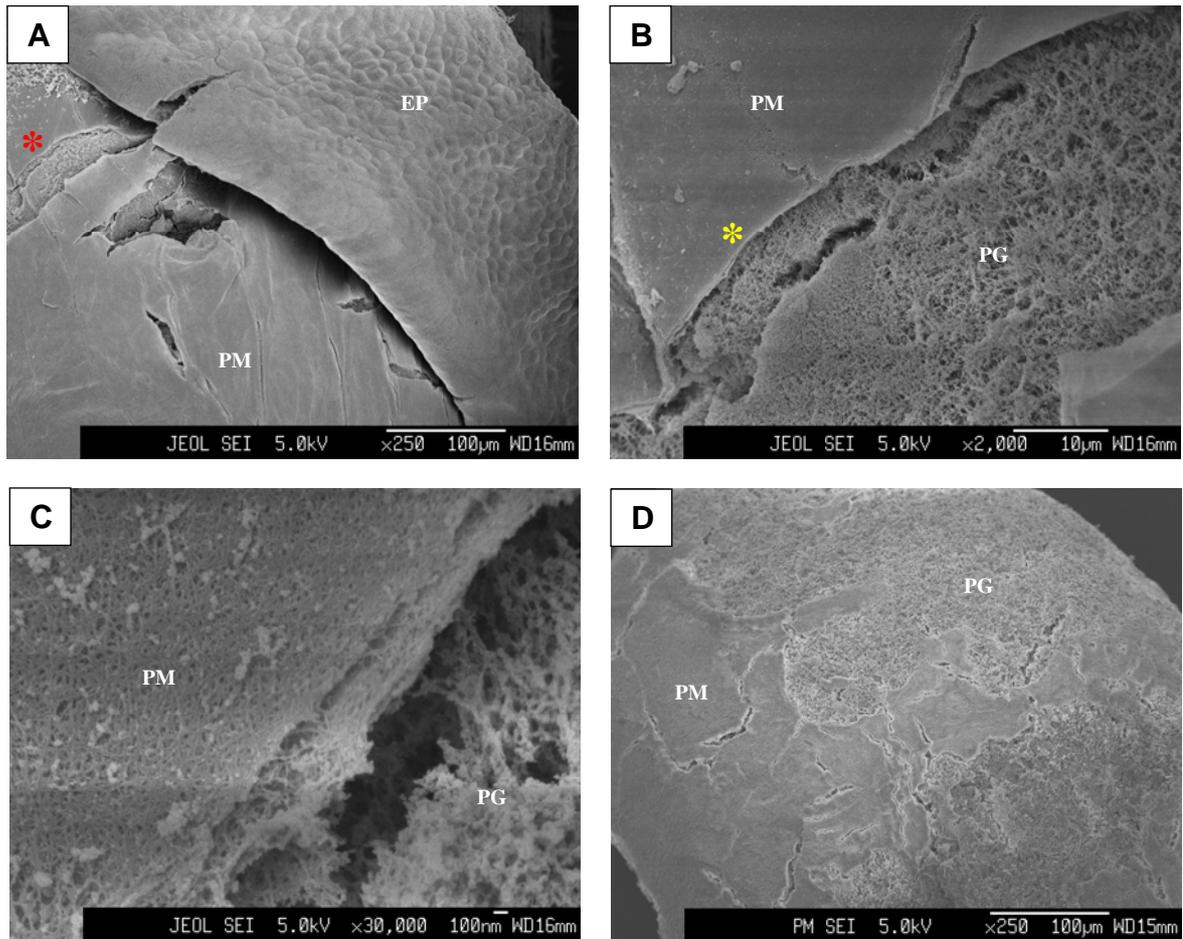


Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do conteúdo alimentar de *Aedes aegypti* 24 h após alimentação com sangue. A - intestino médio com o epitélio rebatido expondo a matriz peritrófica (metalizado com ouro). B - aumento da região com asterisco vermelho mostrando a matriz peritrófica e a camada suberitrófica. C - detalhe da região de borda da matriz peritrófica mostrando a rede de quitina. D - visão externa do bolo alimentar sem epitélio (metalizado com ouro). As siglas representam: EP – epitélio intestinal; PM – matriz peritrófica; PG – camada suberitrófica.

5. Discussão

Estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que a matriz peritrófica é capaz de ligar grandes quantidades de heme (Páscoa et al., 2002). Esta associação constituiria assim um mecanismo importante de detoxificação desta molécula, protegendo o epitélio do intestino médio. Entretanto, os mecanismos de ligação de heme à matriz peritrófica ainda permanecem desconhecido. Desta forma, o estudo da natureza desses agregados de heme e do seu processo de formação pode ajudar a compreender adaptação do mosquito a hematofagia.

O fracionamento do conteúdo alimentar de *Aedes aegypti* em gradiente de sacarose em diferentes horas após a alimentação permitiu estudar o destino do heme e a formação de agregados ao longo do curso da digestão. A hemoglobina diminui progressivamente gerando um aumento inicial mais acentuado da fração de heme inicialmente na interface do gradiente entre 40 – 80 % de sacarose (Figuras 7 e 9). Ao longo do curso da digestão, esse panorama muda gradualmente, ocorrendo um aumento da fração de agregado de heme mais pesado, sedimentada no fundo do tubo (fração 0). Esta modificação nos leva a propor a hipótese que existem dois estágios no processo de formação do agregado, dentro dos quais o heme encontra-se na forma particulada e pode ser isolado pelo gradiente. O primeiro estágio seria correspondente a fração que acumularia na interface entre 40 – 80 % de sacarose, onde a agregação de heme ocorreria auxiliada pela ação de componentes da camada subperitrófica. Já o segundo estágio seria a fração que compõe o precipitado (fração 0) obtido no fundo do tubo, material que seria considerado o produto final da agregação de heme.

Fêmeas adultas de *Aedes aegypti* com 24 h após a alimentação com sangue apresentam uma alteração na coloração do bolo alimentar junto a matriz peritrófica, esse material quando fracionado em gradiente descontínuo de sacarose, pode ser dissociado em heme pelo tratamento com uma base forte (Figura 8A), mas sendo também completamente solúvel também em tampão levemente alcalino, tampão bicarbonato de sódio 0,1 M + SDS 2,5 %, pH

9,1 (dado não mostrado), distinto da hemozoína que não é solúvel em tampões levemente alcalinos (Slater, et al., 1991). Esse resultado, somado ao espectro de FTIR (Figura 8B), nos permite afirmar que o material extraído do lúmen intestinal de fêmeas de *Aedes aegypti* é um agregado de heme, diferente do cristal de heme de triatomíneos (Oliveira, et al., 2007), por não apresentar os picos característicos da ligação ferro-carboxilato. Esse material apresenta alguma semelhança com o agregado do carrapato *Boophilus micropulus* (Lara, et al., 2003), mostrando dois picos de transmitância coincidentes e cinco distintos. Além da ausência em ambos do pico de 1698 cm^{-1} , pico característico da vibração de alongamento da ligação C=O do grupamento carboxílico da hemina, (Silverstein et al., 1994), sugerindo que essa ligação interage com outros átomos formando o agregado.

A presença de material eletrodenso na luz do intestino do mosquito já havia sido relatada anteriormente, sendo interpretada como a assinatura do agregado de heme. A observação por microscopia eletrônica dos agregados encontrados na fração 0, mostrou morfologia relativamente regular, na forma de um polígono regular achatado, aproximando-se de um círculo (Figura 16E). Não foram encontrados agregados com tamanho superior a 150 nm, apresentando o tamanho médio de $78 \pm 15\text{ nm}$ e de $70 \pm 13\text{ nm}$, para as imagens de transmissão e varredura, respectivamente. Isso pode ser interpretado como indicativo da existência de um processo organizado e controlado na formação do agregado. A análise atômica do agregado localizado na fração 0, mostrou a presença de cálcio aderido apenas na superfície, uma vez podia ser extraído por EGTA, indicando que a associação com cálcio ocorre após a formação do agregado dentro do intestino ou então durante o processo de isolamento, e sugerindo que esse íon não faz parte da estrutura básica do agregado. A análise elementar da fração 0 e 5 mostrou ainda sinal da presença de enxofre na fração 5 e ausência na fração 0, sugerindo a presença de proteínas em associação com componentes da matriz peritrófica (Figura 19). A interação do heme com essas proteínas seria importante na

promoção do agregado de heme conforme sugerido por Devenport e colaboradores, 2006. Está no momento em curso uma tentativa de identificar esses polipeptídios por espectrometria de massa.

Não existem estudos da matriz peritrófica do *Aedes aegypti* por proteômica. No entanto, em uma espécie relativamente próxima, o mosquito *Anopheles gambiae*, foram identificadas 209 proteínas na matriz peritrófica em insetos alimentados com látex. Destas, 12 são peritrofinas, proteínas da matriz peritrófica com domínio de ligação a quitina (Dinglasan, et al., 2009). Segundo Moskalyk e colaboradores (1996), foram identificadas na matriz peritrófica do *Aedes* e *Anopheles* pouco mais de 40 polipeptídios em ambas as espécies, um número muito menor do que o resultado obtido na comunicação mais recente do mesmo grupo (Dinglasan, et al., 2009). Duas das proteínas de *Aedes* foram descritas em detalhes até o momento, a *Aedes aegypti* Intestinal Mucin 1 (AeIMUC1) (Rayms-Keller et al., 2000) e a *Aedes aegypti* Adult Peritrophin 50 (Ae-Aper50) (Shao, et al., 2005). As duas proteínas, segundo os autores, são expressas especificamente no intestino médio e a sua transcrição é aumentada em resposta à alimentação dos adultos com sangue. Experimentos de localização por imunofluorescência e microscopia imunoeletrônica mostraram pela primeira vez de forma direta que a AeIMUC1 é de fato uma proteína de matriz peritrófica. Sendo uma proteína bifuncional, capaz de ligar quitina e heme *in vitro* (Devenport et al., 2006). A regularidade estrutural do agregado e a presença de proteínas na fração 5, onde estariam componentes possivelmente relacionados com a formação do agregado da matriz peritrófica, reforçam a idéia de que a formação do agregado é um processo fisiológico dirigido pelo organismo do inseto.

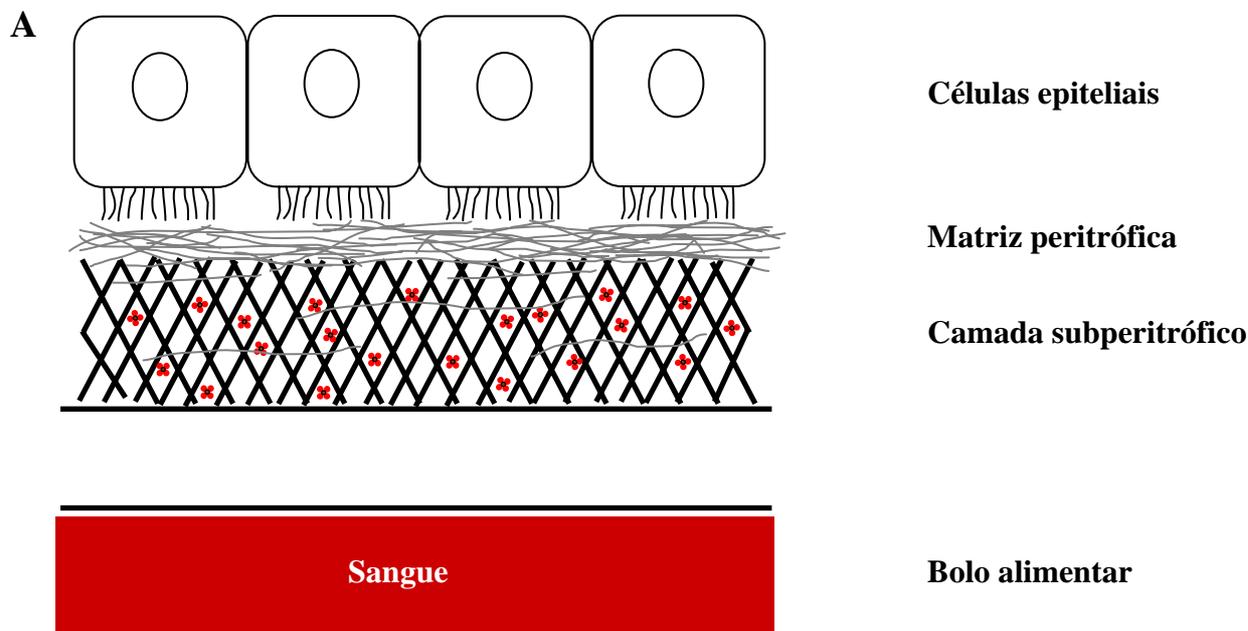
Como comentado anteriormente, há evidências de que quitina tem um importante papel estrutural na manutenção da matriz peritrófica do tipo 1 (Devenport & Jacobs-Lorena, 2004), onde seriam auto-organizados em fibras e intercaladas por proteínas (Dinglasan, et al.,

2009). Nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão do intestino médio observamos a presença dos agregados de heme não envolvidos pela rede de quitina (Figura 11C), imagens similares da literatura (Pascoa, et al., 2002). As imagens de varredura do intestino médio mostram a presença de duas áreas distintas na região, que acreditamos serem de composição diferente a quais denominamos matriz peritrófica (PM) e a camada subperitrófica (PG) (Figura 20C). Na matriz peritrófica observamos a presença de uma rede compacta e estreita em camadas compatível com o esperado para fibras de quitina, situada em sua porção mais próxima do epitélio (espaço ectoperitrófico), enquanto a camada subperitrófica (PG) se apresenta na forma de uma trama esponjosa, possivelmente protéica, com raras fibras de quitina que delimitaria os espaços criando essa trama algum grau de restrição a difusão de moléculas (Figuras 10C e 20C).

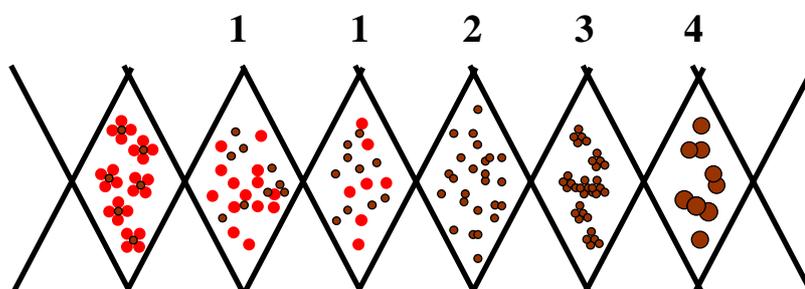
Nossa hipótese é que a digestão da hemoglobina poderia estar acontecendo dentro de nanocompartimentos formados por essa trama possivelmente protéica. A restrição da difusão de moléculas proporciona um aumento na eficiência da digestão e da chance do encontro das moléculas de heme liberadas após a degradação da hemoglobina, favorecendo a sua precipitação, proporcionando a formação do agregado (Figura 21). Isso explicaria o fato de que são encontrados agregados apenas neste local do tubo digestivo, e não sendo encontrados agregados na luz do tubo (Figuras 10A e 12B).

Assim, o conjunto dos resultados apresentados nesta dissertação introduzem a idéia de um mecanismo de agregação de heme ordenado e sincronizado com a degradação da hemoglobina, no qual a rede de quitina e proteínas da matriz peritrófica poderiam fazer parte, delimitando regiões no interior de um gel estruturado que funcionariam como nanoreatores, favorecendo a nucleação inicial e a agregação de heme, que, após formado, se desligaria das proteínas. Acreditamos que esses mecanismo permitiria ao mosquito em lidar com os efeitos

deletérios do heme sendo um importante aspecto da adaptação da fisiologia do inseto a hematofagia.



B Detalhe da camada subperitrófica



Legenda:

-  Hemoglobina
-  Globina
-  Heme
-  Heme precipitado
-  Heme agregado
-  Trama protéica
-  Quitina

Etapas da hipótese de agregação de heme:

- 1 – Degradação da hemoglobina
- 2 – Acúmulo de heme
- 3 – Precipitação de heme
- 4 – Agregação de heme

Figura 21: Modelo hipotético de formação de agregado de heme em *Aedes aegypti*. Painel A – Esquema do tubo digestivo alimentado com sangue. **Painel B** – Detalhe da trama protéica mostrando a hipótese de agregação de heme: 1 - digestão da hemoglobina nos nanocompartimentos formados pela trama protéica; 2 - o heme proveniente da degradação se acumula na trama; 3 - encontro das moléculas de heme e precipitação, 4 – formação do agregado de heme.

6. Referências Bibliográficas

- Adebi, Z.H; Brown, A.W.A. (1961) Peritrophic membranes as vehicle for DTT and DDE excretion in *Aedes aegypti* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 54, 539 – 542.
- Bernays, E.A.; Chamberlain, D.J. (1980) A study of tolerance of ingested tannin in *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.* 26, 415 – 420.
- Berner, R.; Rudin, W.; Hecker, H. (1983) Peritrophic membrane and protease activity in the midgut of malaria mosquito, *Anopheles stephensi* (Liston) (Insecta: Diptera) under normal and experimental conditions. *J. Ultrastruct. Res.* 83: 195 - 204.
- Billingsley, P.F.; Rudin, W. (1992) The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *J. Parasitology* 78, 430 - 440.
- Bogitsh, B.J., Davenport, G.R. (1991) The in vitro effects of various lysosomotropic agents on the gut of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Parasitol.* 77, 187 – 193.
- Casu, R.; Eisemann, C.; Riding, G.; East, I.; Donaldson, A.; Cadogan, L.; Tellam, R. (1997) Antibody-mediated inhibition of the growth of the larvae from insect causing cutaneous myiasis in a mammalian host. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 8939 - 8944.
- Chen, M.M., Shi, L., Sullivan, D.J.Jr. (2001) *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and beta-hematin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 1 - 8.
- Chiu, D.; Lubin, B. (1989) Oxidative hemoglobin denaturation and RBC destruction: the effect of heme on red cell membranes. *Seminars in Hematology* 26, 128 - 135.
- Chou, A.C; Fitch, C.D. (1981) Mechanism of hemolysis induced by ferroprotoporphirin IX. *J. Clin. Invest.* 68, 672 – 677.

- Clements, A.N. (1992) *The Biology of Mosquitoes*. Chapman & Hall, London.
- Cross, C. E.; Halliwell, B.; Allen, A. (1984) Antioxidant protection: a function of tracheobranchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1: 1328 - 1330.
- Devenport, M. & Jacobs-Lorena, M. (2004) The peritrophic Matrix of Hematophagous Insects. Em: *The Biology of Disease Vectors*, 2nd edition. Edited by Marquardt, W.C.; Colorado: University Press of Colorado, cap. 22, 297 - 309.
- Devenport, M.; Alvarenga, P.H.; Shao, L.; Fujioka, H.; Bianconi, M.L.; Oliveira, P.L. Jacobs-Lorena, M. (2006) Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AelMUCI as a heme-binding protein. *Biochemistry* 45, 9540 - 9549.
- Dinglasan, R.R.; Devenport, M.; Florens, L.; Johnson, J.R.; Mchugh, C.A.; Donnelly-Doman, D.J.; III, J.R.Y.; Jacobs-Lorena, M. (2009) The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 125 - 134.
- Egan, T. J. (2003) Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *Targets* 3, 115 – 124.
- Elvin, C. M.; Vuocolo, T.; Pearson, R. G.; East, I. J.; Riding, G. A.; Eisemann, C. H.; Tellam, R. L. (1996) Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina* – cDNA and deduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 273, 8925 - 8935.
- Ferreira, C.; Capella, A.N.; Stininik, R.; Terra, W.R. (1994) Digestive enzymes in midgut cells, endo and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 299 - 313.
- 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 chitonolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1723 – 1729.

- Freyvogel, T.A.; Jaquet, C. (1965) The prerequisites for the formation of a peritrophic membrane in Culicidae females. *Acta Trop.* 22, 148 – 154.
- Gong, D.; Turner, B.; Bhaskar, K. R.; Lamont, J. T. (1990) Lipid binding to gastric mucin: protective effect against oxygen radicals. *Am. J. Physiol.* 253, 682 - 686.
- Graça-Souza, A.V.; Maya-Monteiro, C.; Paiva-Silva, G.O.; Braz, G.R.C.; Paes, M.C.; Sorgine, M.H.F.; Oliveira, M.F.; Oliveira, P.L. (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insec. Biochem. Mol. Biol.* 36, 322 - 335.
- Halliwell, B. & Gutteridge J. M. C. (2004) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Forth edition, Clarendon Press – Oxford, United Kingdom.
- Hiraishi, H.; Terano, A.; Ota, S.; Mutoh, H.; Sugimoto, T.; Razandi, M.; Ivey, K. J. (1991) Oxygen Metabolites stimulate mucous glycoprotein secretion from cultured rat gastric mucous cells. *Am. J. Physiol.* 261, 662 – 668.
- Huang, T.J.; McCoubrey, Jr. W.K.; Maines, M.D. (2001) Heme oxygenase-2 interaction with metalloporphyrins: function of heme regulatory motifs. *Antioxidants & Redox Signaling* 3, 685- 696.
- Huber, M.; Cabib, E.; Miller, L.H. (1991) Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 2807 – 2810.
- Jacobs-Lorena, M. e Oo, M.M. (1996) The peritrophic matrix of insects, In: *The Biology of Disease Vectors*, 1st edition. Edited by Beaty, B.J. and Marquardt, W.C.; Colorado: University Press of Colorado, pp. 318-332.

- Kato, H.; Mueller, C. R.; Fuchs, J. F.; Wessely, V.; Lan, Q.; Christensen, B. M. (2006) Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 1 - 9.
- Kramer, K.J.; Koga, D. (1986) Insect chitin. Physiological state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem.* 16, 851 – 877.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685.
- Lara, F.A., Lins, U., Bechara, G.H., Oliveira, P.L. (2005) Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Exp. Biol.* 208, 3093 – 3101.
- Lara, F.A., Lins, U., Paiva-Silva, G., Almeida, I.C., Braga, C.M., Miguens, F.C., Oliveira, P.L., Dansa-Petretski, M. (2003) A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *J. Exp. Biol.* 206, 1707 - 1715.
- Lathrop, J.T.; Timko, M.P. (1993) Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science*, 259, 522 - 525.
- Lee, H.C.; Hon, T.; Lan, C.; Zhang, L. (2003) Structural environment dictates the biological significance of heme-responsive motifs and the role of Hsp90 in the activation of the Heme Activator Protein Hap1. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5857 - 5866.
- Lehane, M.J. (1991) *Em: Biology of Blood-Sucking Insects*, Harper Collins Academic, United Kingdom.
- Lehane, M.J. (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Ann. Rev. Entomol.* 4, 525 -550.

- Lehane, M.J., Billingsley, P.F. (1996) *Em: Biology of the Insect Midgut*. London – Chapman & Hall.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J., Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275.
- 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 – 343.
- McCoubrey Jr.; Huang, T.J.; Maines, M.D. (1997) Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J. Biol. Chem.* 272, 12568 - 12574.
- Meshnick, S.R.; Chang, K.P.; Cerami, A. (1977) Hemolysis of the bloodstream forms of *T. brucei*. *Biochem. Pharmacol.* 26, 1923-1928
- Milgrom, L.R. (1997) *Em: The colours of life*, Oxford University Press, New York.
- Molina-Cruz, A., Gupta, L., Richardson, J., Bennett, K., Black, W., Barillas-Mury, C. (2005) Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 72, 631 – 637.
- 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.
- 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.; Amedo, P.; 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, S.J.; 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, C.B.; Orvis, J.; Perteau, M.; Quesneville, H.; Reidenbach, K.R.; Rogers, Y.H.; 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, J.; Salzberg, S.L.; Paulsen, I.T.; Dimopoulos, G.; Collins, F.H.; Birren, B.; Fraser-Liggett, C.M.; Severson, D.W. (2007) Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Scienceexpress*, 1 - 7.

- 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.
- Noriega, F.G.; Wells, M.A. (1999) A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J.Insect Physiol.* 45, 613 - 620.
- Oliveira, M.F., d'Avila, J.C., Torres, C.R., Oliveira, P.L., Tempone, A.J., Rumjanek, F.D., Braga, C.M., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., Oliveira, M.A., de Souza, W., Ferreira, S.T. (2000) Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 217 - 221.
- Oliveira, M.F.; Gandara, A.C.P.; Braga, C.M.S.; Silva, J.S.; 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 Toxicol. Pharmacol.* 146, 168 -174.
- Oliveira, M.F.; Kycia, S.W.; Gomez, A.; Kosar, A.J.; Bohle, D.S.; Hempelmann, E.; Menezes, D.; Vannier-Santos, 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.; Silva, J.R.; Dansa-Petretski, M.; Souza, W.; Lins, U.; Braga, C.M.S.; Masuda, H.; Oliveira, P.L. (1999) Haem detoxification by an insect. *Nature* 400, 517.
- Orjih, A.U.; Banyal, H.S.; Chevli, R.; Fitch, C.D. (1981) Hemin lyses malaria parasites. *Science* 214, 667 – 669.
- Pagola, S., Stephens, P.W., Bohle, D.S., Kosar. A.D., Madsen, S.K. (2000) The structure of malaria pigment β -haematin. *Nature* 404, 307 - 310.
- Paiva-Silva, G.O.; Cruz-Oliveira, C.; Nakayasu, E.S.; Maya-Monteiro, C.M.; Dunkov, B.C.; Masuda, H.; Almeida, I.C.; Oliveira, P.L. (2006) A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 13, 8030 - 8035.
- Páscoa, 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.
- Pennington, J.E; Wells, M.A. (2005) The adult midgut: structure and function, In: *The Biology of Disease Vectors*, 2nd edition. Edited by Marquardt, W.C.; Colorado: University Press of Colorado, pp. 289 - 295.
- Pereira, L.O.R. A degradação de heme em *Aedes aegypti* e seus papéis fisiológicos no intestino médio. Orientadora: Gabriela de Oliveira Paiva e Silva. Rio de Janeiro, 2008. 155f. Tese. (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- Pereira, L.O.R.; Oliveira, P.L; Almeida, I.G.; Paiva-Silva, G.O. (2007) Biglutaminyl-biliverdin IX alpha as a heme degradation product in the dengue fever insect-vector *Aedes aegypti*. *Biochemistry*, 46, 6822 - 6829.
- Peters, W. (1992) Peritrophic Membranes, Em: *Zoophysiology* 30: 1-238.

- Rayms-Keller, A.; McGraw, M.; Oray, C.; Carlson, J.O.; Beaty, B.J. (2000) Molecular cloning and characterization of a metal responsive *Aedes aegypti* intestinal mucin cDNA. *Insect Mol. Biol.* 9, 419 - 426.
- Richards, A.G. & Richards, P.A. (1977) The peritrophic membranes of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 22, 219 - 240.
- Ridley, R.G. (1996) Haemozoin formation in malaria parasites: is there a haem polymerase? *Trends Microbiol.* 4, 253 – 254.
- Romoser, W.S. (1996) The vector alimentary system, In: *The Biology of Disease Vectors*, 1st edition. Edited by Beaty, B.J. and Marquardt, W.C.; Colorado: University Press of Colorado, pp. 298 - 317.
- Sammons, D.K.; Adams, L.D.; Nishizawa, E.E. (1981) Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2, 135 - 141.
- Sarauer, B.L.; Gillott, C.; Hegedus, D. (2003) Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Mol. Biol.* 12, 333 - 343.
- Shahabuddin, M. & Costero, A. (2001) Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 231 - 240.
- Shahabuddin, M.; Kaidom, T.; Aikawa, M.; Kaslow, D.C. (1995) *Plasmodium gallinaceum*: mosquito peritrophic matrix and the parasite-vector compatibility. *Exp. Parasitol.* 81, 386 - 393.
- 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.

- Shao, L.; Devenport, M.; Fujijoka, 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.
- Shao, L.; Devenport, M.; Jacobs-Lorena, M. (2001) The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 119 – 125.
- Shen, Z.; Dimopoulos, G.; Kafatos, F. C.; Jacobs-Lorena, M. (1999 a) A cell surface mucin specifically expressed in the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5610 - 5615.
- Shen, Z.; Jacobs-Lorena, M. (1999) Evolution and chitin-binding proteins in invertebrates. *J. Mol. Evol.* 48, 341 - 347.
- Shi, X.; Chamankhah, M.; Visal-Shah, S.; Hemmingsen, S.M.; Erlandson, M.; Braun, L.; Alting-Mees, M.; Khachatourians, G.G.; O’Grady, M.; Hegedus, D.D. (2004) Modeling the structure of the Type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1101 - 1115.
- Silverstein, R.M.; Bassier, G.C.; Morrill, T.C. (1994) Espectrometria no infravermelho. Em *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 1 edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, cap. 3, 85 – 130.
- Slater, A.F.G.; Swiggard, W.J.; Orton, B.R.; Flitter, W.D.; Goldberg, D.E.; Cerami, A.; Henderson, G.B. (1991) An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 525 - 329.
- Tellam, R. L (1996) The peritrophic matrix, In: *Biology of Insect Midgut*, 1st edition. Edited by Lehane, M.J. and Billingsley, P.F; London: Chapman & Hall, pp. 86-114.

- Tellam, R.L; Wiffels, G.; Willadsen, P. (1999) Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29, 86 - 101.
- Terra, R.; Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 1 - 62.
- Terra, W.R. (1996) Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Ciência e Cultura* 48, 317 - 324.
- Terra, W.R. (2001) The origins and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 47, 47- 61.
- Terra, W.R.; Ferreira, C.; Garcia, E.S. (1988) Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.* 18, 423 – 434.
- Villalon, J.M.; Gosh, 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.
- Wang, P.; Granados, R. R. (1997) Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin. *J. Biol. Chem.* 272, 16663 - 16669.
- Wang, P.; Li, G.; Granados, R.R. (2004) Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 215 - 227.
- Wigglesworth, V. B. (1930) The formation of peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. *Q. J. Microsc. Sci.* 73, 593-616.
- Wright, D. T.; Fischer, B. M.; Li, C.; Rochele, L. G.; Akley, N. J.; Adler, K. B. (1996) Oxidant stress stimulates mucin secretion and PLC in airway epithelium via nitric oxide – dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* 15, 854 – 861.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Nome: Tiago Opala Vieira

Nascimento: 22/12/1980

Naturalidade: Porto Alegre

Formação Acadêmica

Mestrado em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, 2007 – 2009.

Bacharel em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2001 – 2006.

Comunicação em Congressos

13 comunicações em congressos nacionais.

1 comunicação em congresso internacional.

Publicações

1. Vieira, T. O., Said, A., Aboutabl, E., Azzam, M., Creczynski-Pasa, T. B. Antioxidant activity of methanolic extract of *Bombax ceiba*. Redox Report, v.14, p.41 - 46, 2009.

2. Creczynski-Pasa, Tânia B., Millone, M. Antonieta Daza, Munford, M. L., de Lima, V. R., Vieira, T. O., Benitez, G. A., Pasa, A. A., Salvarezza, R. C., Vela, M. E. Self-assembled dithiothreitol on Au surfaces for biological applications: phospholipid bilayer formation. PCCP. Physical Chemistry Chemical Physics, v.11, p.1077 - 1084, 2009.

3. Konzen, M., De Marco, D., Cordova, C. A. S., Vieira, T. O., Antônio, R. V., Creczynski-Pasa, T. B. Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.14, p.8307 - 8313, 2006.

4. Rosso, R., Vieira, T. O., Leal, P. C., Nunes, R. J., Yunes, R. A., Creczynski-Pasa, T. B. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.14, p.6409 - 6413, 2006.

5. Munford, M. L., Lima, V. R., Vieira, T. O., Heinzelmann, G., Creczynski-Pasa, T. B., PASA, A. A. AFM in-situ characterization of supported phospholipid layers formed by vesicle fusion. Microscopy & Microanalysis, v.11, p.90 - 93, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)