

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA SUPERIOR CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS -
MBT

PROTEÍNAS E INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA MATRIZ PERITRÓFICA DE
***Anopheles darlingi* ROOT, 1926, PRINCIPAL VETOR DA MALÁRIA NA**
AMAZÔNIA, BRASIL

REJANE DE CASTRO SIMÕES

Manaus

2010

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA SUPERIOR CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS -
MBT**

**PROTEÍNAS E INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA MATRIZ PERITRÓFICA DE
Anopheles darlingi ROOT, 1926, PRINCIPAL VETOR DA MALÁRIA NA
AMAZÔNIA, BRASIL**

REJANE DE CASTRO SIMÕES

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis López-Lozano

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia de Recursos
Naturais da Universidade do Estado
do Amazonas, como parte dos
requisitos para obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia e
Recursos Naturais.**

Manaus

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

C672

Simões, Rejane de Castro

Proteínas e Indução Experimental da Matriz Peritrófica de
Anopheles

darlingi root, 1926, Principal Vetor da Malária na Amazônia, Brasil /

Rejane de Castro Simões. --- Manaus : [s.n.], 2010.

xii, 88 f. : il. color.

Dissertação (mestrado)-- UEA, Manaus, 2010

Orientador : Wanderli Pedro Tadei

Co-orientador: Jorge Luiz López-Lozano

Área de concentração : Biotecnologia e Recursos Naturais

TERMO DE APROVAÇÃO

REJANE DE CASTRO SIMÕES

**PROTEÍNAS E INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA MATRIZ PERITRÓFICA DE
Anopheles darlingi ROOT, 1926, PRINCIPAL VETOR DA MALÁRIA NA
AMAZÔNIA, BRASIL**

**Dissertação aprovada pelo
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia de Recursos Naturais
da Universidade do Estado do
Amazonas, pela Comissão Julgadora
abaixo identificada.**

Manaus,.....de.....de 2010.

Presidente: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Membro: Prof^a. Dr^a. Beatriz Ronchi Telles
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Membro: Prof. Dr. Jansen Fernandes Medeiros
Universidade do Estado do Amazonas

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu sabedoria, proteção, saúde, autoconfiança e principalmente muita força para vencer mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Luíz Aldo (*in memoriam*) e Francisca, e meus irmãos Luzinaldo, Carino, Erotildes e Fabiana que apesar de todas as dificuldades sempre estiveram ao meu lado e se esforçaram para que eu pudesse continuar minha jornada.

Ao meu filho amado Willian pela compreensão e apoio.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, pela possibilidade de pesquisa.

Agradeço ao meu orientador Doutor Wanderli Pedro Tadei, pela oportunidade que me concedeu, que acreditou no meu potencial, pela orientação, ensinamentos, companheirismo, paciência, estímulo e apoio nos momentos difíceis e nos momentos de alegria, e por todo o aprendizado durante minha caminhada científica. estando sempre disponível a qualquer dia e hora.

Ao meu co-orientador Doutor Jorge Luis López- Lozano, por sua disponibilidade, ensinamento e espírito crítico, fundamentais durante o processo de elaboração desta dissertação.

Ao Doutor Marcelo Jacobs-Lorena pelo incentivo e apoio neste trabalho.

Ao Doutor Oswaldo Marinotti pela articulação com o LNBIO e incentivo durante a criação e elaboração desta dissertação.

À Dra. Iléa Brandão pelo companheirismo, amizade e presença constante.

À Dra. Joselita por compartilhar os momentos de questionamento e incentivo.

À Dra. Eleílza Littaif pelo apoio, amizade e suas argumentações científicas e sugestões que contribuíram pelo meu crescimento pessoal e profissional.

À Rosemary Pinto pelo apoio, incentivo

À Dra Márcia Rubia pela amizade e valiosas conversas.

A toda turma de mestrado pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas Carlos Praia; Bosco e Gervilane pela identificação dos mosquitos.

Aos colegas Bastos, Antônio (Katita), Elias, Raimundo Nonato pela coleta de campo.

As técnicas Adelina e Zilá pelo apoio com o material usado no insetário.

Ao Juracy pela valiosa ajuda no cálculo e preparo de reagentes.

Ao Sr. Henrique Blaiser, pela companhia nas idas ao comércio para a aquisição dos mais variados materiais para o insetário, pelas palavras de incentivo em momentos difíceis.

Um agradecimento especial ao Gláubio Fernandes, Muana e Edineusa pela imensa ajuda na manutenção dos mosquitos, pelas palavras de incentivo em momentos difíceis, pela amizade, sempre estarei muito grata.

Aos colegas do Laboratório de Malária e Dengue, Waléria, Erika, Augustto Aleksey, Eunice, Lorena, Ana Paula, Rafaela, Rodrigo, Letícia e Ricardo.

A Dra. Adriana Paes Franco por ter me recebido em seu laboratório no Laboratório de Espectrometria de Massa, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) - Laboratório Nacional em Biociências (LNbio), Campinas, e ter colaborado para o desenvolvimento deste trabalho.

À Thaís, Bianca, Isabelle, “amigos do, MAS/LNbio”, agradeço pelo bom convívio, amizade e prestatividade.

À minha família religiosa, freqüentadores da “Casa da Fraternidade”, sempre terei para vocês muito carinho. Agradeço o apoio, incentivo e amizade.

Aos meus amigos Welton Oda, Mariana Mesquita e Gordo, Nívia do Carmo, Grace Lourdes e Elcio, Joelma Oliveira e Sandro, Andréa Cantanede e Hadámo, Bruno Adam, Gilmara Noronha.

Agradeço a todos que colaboraram direto ou indiretamente para a conquista de mais esta vitória em minha vida!

OBRIGADA!!!!!!!!!!

*"Deixe suas esperanças, e não seus ferimentos,
moldarem seu futuro."*

Robert H. Schuller

*"Sei que o meu trabalho é uma gota no oceano,
mas sem ele, o oceano seria menor"*

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

Foram analisadas as proteínas e estabelecida a metodologia de indução experimental da matriz peritrófica (MP) de *Anopheles darlingi*, em adultos - **Tipo I** e larvas - **Tipo II**. No processo de padronização para os adultos verificou-se que o tempo de 10 horas, após a alimentação artificial com a solução de látex, foi suficiente para a completa formação da MP. Este procedimento assegurou o êxito na extração das MP, de forma íntegra, para constituírem a amostragem de análise. Para as larvas - MP **Tipo II**, constatou-se que o período de uma hora foi o tempo ideal para a formação da MP, com a alimentação de carvão ativado. Após a dissecação e manutenção, estas foram submetidas à extração e quantificação das proteínas, por meio da espectrometria de massa. Os resultados possibilitaram identificar oito proteínas para a MP de *Anopheles darlingi*. A análise de similaridade, por meio do banco de dados do NCBI, mostrou que as proteínas AdP1, AdP3, AdP4, AdP6, AdP7 e AdP8 foram identificadas como proteínas anotadas em *Anopheles gambiae*; a proteína AdP2 em *Anopheles farauti*; e a proteína AdP5 em *Anopheles albimanus*. Por analogia com a ontologia das proteínas do genoma de anofelinos já descritos, os dados sugerem que as proteínas identificadas de *Anopheles darlingi* apresentam função similar. As proteínas AdP3 e AdP5 participam da resposta imune do vetor, durante o processo invasivo do *Plasmodium*.

ABSTRACT

Proteins were analyzed and established the methodology of experimental induction of the peritrophic matrix (PM) of *Anopheles darlingi* in adults and larvae-Type R-Type II. In the standardization process for adults - MP Type I, it was found that the time from 10 hours after feeding, with the latex solution was sufficient for complete formation of the MP. This procedure ensured the successful extraction of the MP in order to form the full sample analysis. For larvae-MP Type II, it was found that the period of one hour was the perfect time for the formation of MP, with the power of activated charcoal. After the dissection of MP, were subjected to extraction and quantification of proteins. The proteins of the MP were analyzed by mass spectrometry. The results show the identification of proteins to eight MP of *Anopheles darlingi*. Similarity comparative analysis through the NCBI data base showed that ADP1, AdP3, AdP4, AdP6, AdP7, AdP8 proteins were identified in *Anopheles gambiae*, AdP2 protein in *Anopheles farauti*; AdP5 protein in *Anopheles albimanus* genomes, respectively. By analogy with ontology of proteins from of *Anopheles* genomes already described, suggest that the proteins identified in *Anopheles darlingi* exhibit similar function. AdP3 and AdP5 participate in the immune response during *Plasmodium* invasion vector of the parasite.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
EPIÍGRAFE	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	xv
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Considerações gerais sobre <i>Anopheles darlingi</i>	18
1.2 Ciclo do parasita no hospedeiro invertebrado	22
1.3 Trato digestivo dos insetos.....	24
1.4 Aspectos gerais da matriz peritrófica	27
1.5 Estudos de proteínas	29
1.5.1 Estudos de proteínas em <i>Anopheles</i>	33
2. OBJETIVOS	37
2.1 Gerais.....	37
2.2 Específicos.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 reas de Coleta	38
3.2 Coleta e manutenção de <i>Anopheles darlingi</i>	39
3.3 Matriz peritrófica Tipo I	42
3.4 Matriz peritrófica Tipo II	45
3.5 Extração de proteínas	46
3.6 Quantificação de proteínas totais (Bradford).....	47
3.7 Espectrometria de Massa.....	49
3.7.1 Digesto do Extrato Protéico com Tripsina	49
3.7.2 Extração de Peptídeos.....	49
3.8 MALDI Q TOF/MS	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Indução da Matriz Peritrófica em Adultos.....	52
4.2 Indução da Matriz Peritrófica em Larvas	55
4.3 Quantificação de proteínas totais (Bradford).....	56

4.4 Análise das proteínas identificadas na MP Tipo I	56
5. DISCUSSÃO	60
5.1 Indução da Matriz Peritrófica em Adultos.....	61
5.2 Indução da Matriz Peritrófica em Larvas	62
5.3 Análise das proteínas identificadas na MP Tipo I	63
6. CONCLUSÃO.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Concentrações / volumes dos reagentes usados no mix de quantificação das proteínas de matriz peritrófica oriundas de larvas e adultos de *Anopheles*

darlingi.....48

Tabela 02. Caracterização de proteínas de matriz peritrófica por Espectrometria de massas.....59

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1. Padronização do tempo de formação e dissecação da MP54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Ciclo de vida do *Plasmodium* no mosquito.....23
- Figura 02.** Diagrama do intestino de inseto.....25
- Figura 03.** Esquema generalizado da circulação endoectoperitrófica das enzimas digestivas no mesênteron.....26
- Figura 04.** Modelo esquemático da estrutura e composição da matriz peritrófica27
- Figura 05.** Modelo proposto para a participação AgPer1 e de AgChit (uma quitinase específica do intestino) na formação e manutenção da MP35
- Figura 06.** Mapa de Manaus demonstrando a área de coleta - Zona Leste38
- Figura 07.** Estágios de desenvolvimento dos anofelinos no insetário. Em A - Copos com desovas para eclosão. Em B - Cubas de manutenção das larvas. Em C - Gaiola de emergência das pupas e manutenção dos adultos40
- Figura 08.** Sistema de alimentação artificial com campânula de vidros em série. Em A: alimentação em sequência mostrando a ligação com o circular de água ligado ao banho-maria. Em B: anofelinos ingurgitados após a alimentação artificial44
- Figura 09.** Fêmeas alimentadas com látex, mostrando a distensão do abdômen...53
- Figura 10.** Fotos do intestino de *Anopheles darlingi* com matriz peritrófica após alimentação com solução de látex. Em A: matriz incompleta formada no período de 8 horas. Em B: matriz completa formada no período de 10 horas54
- Figura 11.** Larva alimentada de 4^o estágio com carvão ativo no intestino exposto. Em A: início da alimentação, onde o carvão está apenas na parte anterior. Em B: a

matriz está completa, mas sofreu uma divisão no processo de dissecação.
Observação com aumento de 100X ao estereomicroscópio55

Figura 12. Estrutura 3D da proteína de Actina 5 C de *Anopheles gambiae*65

Figura 13. Estrutura 3D da proteína Fator de Elongação 1 alpha de *Anopheles farauti*67

Figura 14. Estrutura 3D da proteína AGAP004610 de *Anopheles gambiae*69

Figura 15. Estrutura 3D da proteína de AGAP002575 de *Anopheles gambiae*70

Figura 16. Estrutura em 3D da proteína Histona H2A de *A. gambiae*71

Figura 17. Estrutura em 3D da proteína Histona H2B de *A. gambiae*72

Figura 18. Estrutura em 3D da proteína Calreticulina de *Anopheles albimanus*73

Figura 19. Estrutura em 3D da proteína AGAP002084 de *Anopheles gambiae*75

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

2-D – Eletroforese bidimensional

AgCP – Promotor da carboxipeptidase de *Anopheles gambiae*

Ae-Aper50 – Proteína da Matriz Peritrofica de *Aedes aegypti*, Peritrofina 50

AgPer1- Gene da Proteína da Matriz Peritrofica de *Anopheles gambiae*

APL1C - *Anopheles Plasmodium*-responsive Leucine-rich repeat protein 1

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA albumina de soro bovino

cDNA – DNA complementar

CDPK4 – Proteína da família Cyclin-Dependent Kinase

CP - Carboxipeptidase

FVS – Fundação de Vigilância em Saúde

EM- Espectrômetro de Massa

ESI- Electrospray ionization

GTPase – Enzimas hidrolases que se ligam e hidrolizam o GTP

KDa – Kilodalton

LRIM1 - Leucine-Rich-Immune Molecule 1

MALDI- *matrix-assisted laser desorption ionization* (ionização dessorção a laser assistida por matriz)

mg – Miligrama

ml – Mililitro

MM – Marcador de massa molecular

mM – Milimolar

MP – Matriz Peritrófica

MS - Ministério da Saúde

M/Z- Razão massa/carga

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

NOS - Óxido Nítrico Sintetase

OMS - Organização Mundial da Saúde

PMF- *Peptide Mass Fingerprint*

RNA_m- Ácido ribonucléico mensageiro

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde

TEP 1 - Thioester-containing protein 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre *Anopheles darlingi*

Dentre as espécies de insetos, há uma diversidade quanto à habilidade das espécies em utilizarem diferentes materiais como alimento, e esta característica foram primordial para serem intensificados os estudos sobre suas interações na área da agricultura, estocagem de alimentos, saúde humana, entre outros (Lehane, 1996).

Considerando a saúde humana, a proliferação de insetos vetores aumenta as doenças transmitidas, gerando impactos econômicos e de saúde pública. Ao longo do tempo, os mosquitos têm ocupado uma posição de importância no que se refere às doenças de transmissão vetorial. (Harwood & James, 1979; Consoli & Oliveira, 1998; Forattini, 2002).

Os mosquitos pertencem à família Culicidae, ordem Diptera e são associados ao homem e aos animais, devido ao comportamento hematofágico das fêmeas, na fase adulta. O ciclo biológico desses insetos compreende os estágios de ovo, larva (quatro estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1998). Há numerosas espécies desta ordem que desempenham papel importante como vetores de doenças ao homem, como a malária, as filarioses; os vírus da dengue, da febre amarela e das encefalites (Forattini, 1965; 2002).

As principais espécies de mosquitos de importância médica estão distribuídas entre os gêneros *Anopheles*, *Aedes*, e *Culex*. Via geral, os patógenos são introduzidos no hospedeiro vertebrado por meio da saliva, a qual é inoculada durante a atividade de repasto sanguíneo (Marcondes, 2001).

A hematofagia está presente em diferentes classes e espécies de animais, sendo a maioria em invertebrados, incluindo sanguessugas e insetos (Marcondes,

2001). A maioria dos mosquitos possui hábito hematófago, entretanto, apenas as fêmeas se alimentam de sangue. Este, por sua vez, é metabolizado provendo substratos para a síntese de proteínas destinadas à maturação dos ovos. Parte do sangue ingerido pelas fêmeas pode ser também utilizada como fonte de energia. Na floresta, porém, machos e fêmeas se alimentam de néctar de flores, sucos de frutas e outras fontes alimentares ricas em carboidratos, encontradas na natureza (James, 1994; Forattini, 2002; Angêlla *et al.*, 2007).

A transmissão da malária envolve a tríade epidemiológica: vetor, parasito e homem. Os mosquitos que transmitem a malária pertencem à ordem Diptera, Subordem Nematocera, Classe Insecta, família Culicidae, subfamília Anophelinae e gênero *Anopheles*. Este gênero é constituído por seis subgêneros: *Cellia*, *Stethomyia*, *Lophopodomyia*, *Anopheles*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus*. As espécies de importância médica nas Américas estão incluídas nos três subgêneros *Nyssorhynchus*, *Anopheles* e *Kerteszia* (Forattini, 1996; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). À exceção do subgênero *Cellia*, todos os demais são encontrados na região neotropical. A espécie *Anopheles (Cellia) gambiae* Giles, 1902, foi importado do Velho Mundo para o Brasil, nas décadas de 1920 e 1930, se instalou no Nordeste brasileiro, encontrando condições ideais para seu desenvolvimento, sendo erradicado com intensa campanha (Deane, 1988).

No Brasil são registradas 57 espécies de *Anopheles*, pertencendo a cinco subgêneros *Anopheles* Meigen, 1818; *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902; *Stethomyia* Theobald, 1902; *Kerteszia* Theobald, 1905; *Lophopodomyia* Antunes, 1937. As espécies de anofelinos reportadas, até o momento, como vetores de malária no país pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (Deane, 1986; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Esses mosquitos são popularmente conhecidos na região amazônica por “carapanã”, “mosquito-estaca”, “mosquito-prego” e “suvela”, pelo fato peculiar de pousarem de forma oblíqua à pele das pessoas. No sul e sudeste do país predomina a denominação “pernilongo”, e o termo “muriçoca” é utilizado predominantemente no estado do Rio de Janeiro e no nordeste brasileiro (Tadei *et al.*, 1998).

A distribuição dos anofelinos no mundo é muito ampla, sendo que, em cada continente, são registradas espécies vetoradas da malária humana. Na África destaca-se o *Anopheles (Cellia) gambiae* Giles, 1902, na Índia o *Anopheles (C) stephensi* Liston, 1901, no continente asiático o *Anopheles (C) dirus* Peyton & Harrison, 1979, na América Central o *Anopheles (N) albimanus* Wiedemann, 1821 e na América do Sul, englobando toda a região amazônica, destaca-se o *Anopheles (N) darlingi* Root, 1926 (Ishino *et al.*, 2004; WHO, 2008).

No Brasil, os mosquitos do subgênero *Nyssorhyncus* são considerados os mais importantes vetores do parasito da malária, sendo representados por *Anopheles (N) darlingi*, *Anopheles (N) aquasalis* Curry, 1932, *Anopheles (N) albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 (incluindo *Anopheles albitarsis sensu strictu*; *Anopheles marajoara* Galvão e Amaral 1942); *Anopheles deaneorum* Rosa-Freitas 1989; *Anopheles (N) nuneztovari* Gabaldon, 1940, *Anopheles (N) triannulatus* Neiva e Pinto, 1922 (*latu sensu*); *Anopheles oswaldoi* Periasú 1922, entre outros (Tadei, 1980; Consoli & Oliveira, 1998). Existindo outros anofelinos considerados vetores casuais, isto é, na ausência de seus hospedeiros preferenciais ou em épocas de alta densidade anofélica, alimentam-se no homem, podendo infectar as pessoas ao sugar o sangue com gametócitos de plasmódios (Tadei *et al.*, 1993; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Tadei & Thatcher, 2000).

O *A. darlingi* é considerado o principal vetor da malária no Brasil. Esta espécie não é encontrada nas áreas secas do interior do nordeste e no estado do Rio Grande do Sul. Restringe-se à região amazônica, onde atualmente ocorre cerca de 99,7% dos casos da doença (Deane, 1986; SVS/MS, 2009).

A colonização desta espécie em laboratório é de suma importância para se estudar características biológicas e comportamentais visando, entre outros, seu controle. No entanto, é sabido que algumas espécies de anofelinos neotropicais possuem certas limitações para a colonização em laboratório, especialmente *A. darlingi*. Uma destas limitações refere-se à necessidade que a espécie possui de grandes espaços para realizar o vôo nupcial, o que inviabiliza a manutenção dos mosquitos nas gaiolas-padrão (Tadei *et al.*, 1984; Lima, 2009).

Segundo Tadei *et al.* (1993), vários fatores biológicos contribuem para que o *A. darlingi* seja o principal vetor dessa doença no ambiente amazônico. Dentre estes estão: a capacidade de adaptação neste ambiente; o hábito de se alimentar, tanto na condição de endofagia, como de exofagia; e a acentuada antropofilia, com atividade cíclica contínua durante toda a noite, com um pico de atividade no entardecer e outro no amanhecer (Tadei & Thatcher, 2000).

Além desses, há ainda as alterações no meio ambiente, tais como, o desmatamento da floresta para as atividades agrícolas, a introdução de habitações precárias nas áreas de novos assentamentos expondo o homem ao vetor, a transformação das áreas desmatadas em pastagens, bem como os garimpos de ouro e de outros minerais, são atividades que tornam o meio ambiente favorável à proliferação das populações de mosquitos, aumentando a densidade dos vetores da malária (Deane, 1988; Tadei *et al.*, 1988; 1998; Marques *et al.*, 1994; Souza-Santos, 2002).

Uma característica importante do *A. darlingi* é sua peculiar capacidade de ser infectado por diferentes espécies de plasmódios, sendo esta constatada por meio de estudos entomológicos, dissecação e análise das glândulas salivares e do trato digestivo desses mosquitos, que registraram a infecção pelas três espécies de *Plasmodium* que causam a malária humana no Brasil: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* (Deane, 1986; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 1989; Tadei & Dutary-Thatcher, 2000).

Considerando o comportamento das espécies de mosquitos, um aspecto importante trata-se do padrão da atividade na hematofagia e sua relação de controle quanto ao relógio biológico, que por vez está sobre controle genético – ciclo circadiano (Clements, 1999; Dunlap, 1999). Desta forma, a análise do comportamento de vetores de doenças torna-se relevante para o entendimento da dinâmica de transmissão. (Klowden, 1996). Meireles-Filho (2008) realizou importante estudo comparativo do relógio circadiano de *Drosophila melanogaster* com vetores da leishmaniose visceral - *Lutzomyia longipalpis* e da Dengue – *Aedes aegypti*, demonstrando a especificidade da Cronobiologia de cada espécie, fundamentada em bases moleculares do relógio biológico.

Os estudos com *Anopheles gambiae* também mostraram que o comportamento de alimentação do mosquito está sob o controle do ciclo circadiano. Longos e curtos pulsos de luz podem induzir a inibição da alimentação sanguínea, por meio do ciclo circadiano, e de um mecanismo desconhecido que envolve um sistema quimio-sensorial (Dimopoulos *et al.*, 2008; Rund *et al.*, 2011).

A relação entre o comportamento das espécies de anofelinos, padrão da atividade de picar e o ritmo circadiano foi registrado por Tadei & Correia (1982) e Tadei *et al.* (1983), em estudos das espécies de *Anopheles* na Br-174 (Manaus /

Boa Vista) e na Hidrelétrica de Tucuruí (PA), respectivamente. Os autores verificaram que o padrão comportamental está sob a influência de fatores intrínsecos e de extrínsecos aos organismos, este último produto de fatores ambientais que, dependendo da intensidade dos mesmos, podem até interromper a atividade, interferindo no ciclo circadiano (entre outros, altas temperaturas, baixa umidade e precipitações).

1.2 Ciclo do Parasito no Hospedeiro Invertebrado (Inseto)

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do anofelino ingere as formas sanguíneas do parasito, mas somente os gametócitos serão capazes de evoluir no inseto, dando origem ao ciclo sexuado ou esporogônico (Figura 1). No intestino médio do mosquito fatores ambientais (temperatura inferior a 30°C, aumento do pH por baixa pressão de CO₂) específicos para cada espécie de *Plasmodium* estimulam o processo de gametogênese poucos minutos após a ingestão de sangue (Siden, 1998).

O gametócito masculino, por um processo denominado exflagelação, dá origem a oito microgametas e o gametócito feminino transforma-se em macrogameta. Uma proteína quinase cálcio-dependente (CDPK4) é ativada nos gametócitos machos e regula a exflagelação e a geração dos gametas móveis (Shahabuddin, 1998). Em 20-30 minutos, um microgameta fecundará um macrogameta, formando o ovo ou zigoto. Dentro de 24 horas, após a fecundação, o zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto (Veronesi, 1983).

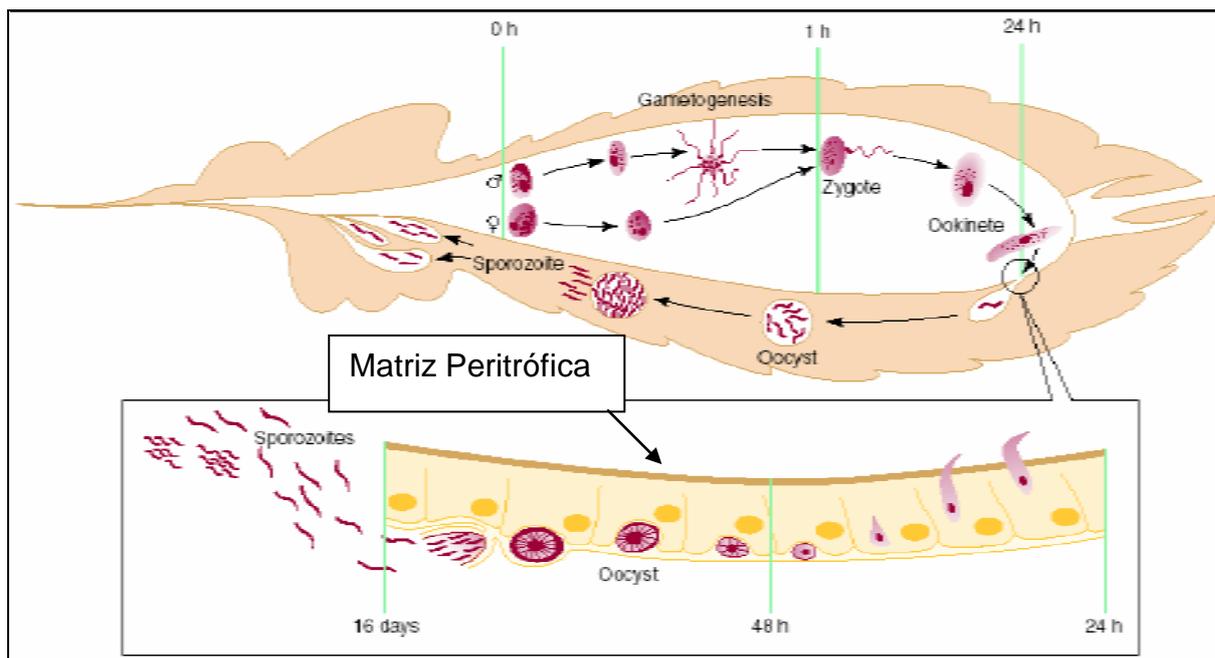


Figura 1 – Ciclo de vida do *Plasmodium* no mosquito (Ghosh *et al.* 2003).

Os oocinetos necessitam atravessar o epitélio intestinal e interagir com a lâmina basal. Nesse processo, eles precisam atravessar uma importante barreira que se forma no mesêntero, a matriz peritrófica (MP), que é uma estrutura fina e acelular que envolve o bolo sanguíneo (Jacobs-Lorena & Oo, 1996; Lehane, 1997). Para atravessar a MP os oocinetos sintetizam uma quitinase, que é essencial para esse processo (Shahabuddin, 1998; Sinden *et al.*, 2004). Um único oocineta pode invadir várias células, as quais se tornam apoptóticas e são extruídas do epitélio por um mecanismo de restituição de actina, variável entre as diferentes interações entre mosquitos/parasitos (Barrilas-Mury & Kumar, 2005).

Ao atingir a parede do intestino médio, onde se encista na camada epitelial do órgão, os oocinetos passam a se chamar oocisto. Inicia-se então o processo de divisão esporogônica e, após um período de 10 a 16 dias, ocorre à ruptura da parede do oocisto sendo liberados os esporozoítos formados durante a esporogonia.

Estes serão disseminados por todo o corpo do inseto por meio da hemolinfa (Meis *et al.*, 1992).

Na hemolinfa, os esporozoítos seguem em direção às glândulas salivares, infectando os lóbulos lateral-distal e mediano. Em seguida, eles permanecem no ducto salivar para serem injetados no hospedeiro vertebrado, juntamente com a saliva, durante o repasto sanguíneo infectante (Pimenta *et al.*, 1994). Existem poucos estudos descrevendo os mecanismos utilizados pelo esporozoíto para atingir a glândula salivar do mosquito (Rodrigues *et al.*, 2007).

1.3 Trato Digestivo dos Insetos

O trato digestivo dos insetos é constituído de três regiões principais: estomodeu (intestino anterior), mesênteron (intestino médio) e proctodeu, e o fluxo do alimento entre as mesmas é controlado por esfíncteres (Figura 2). Pelo fato de que os insetos, na maioria das vezes, se alimentam de sólidos, eles possuem o trato digestivo amplo, reto e curto. A primeira região (estomodeu) está relacionada com a ingestão, o armazenamento, a trituração e o transporte do alimento para região mediana-mesênteron. O mesênteron está dividido em duas regiões: ventrículo e ceco gástrico. O ventrículo representa o mesênteron propriamente dito. Ele é revestido com células epiteliais e, em algumas delas são produzidas e secretadas as enzimas digestivas (glicosidases, tripsinas, quimiotripsinas, carboxipeptidases, aminopeptidases e serino-proteases) e outras absorvem os produtos da digestão (Jacobs-Lorena, 1998). Quase toda a assimilação de substâncias aproveitadas pelo inseto dá-se no mesênteron, uma vez que as paredes dessa região não são revestidas de quitina (Terra, 1990).

Em seguida, todo o material que restou no lúmen do trato digestivo, juntamente com a urina procedente dos túbulos de Malpighi, é carregado para a região posterior, o proctodeu, na qual ocorre a absorção de sais, de água e de outras moléculas importantes, antes da eliminação das fezes pelo ânus. Um revestimento cuticular é observado tanto no proctodeu quanto no estomodeu, enquanto que o mesênteron é desprovido deste revestimento (Gullan & Cranston, 2007).

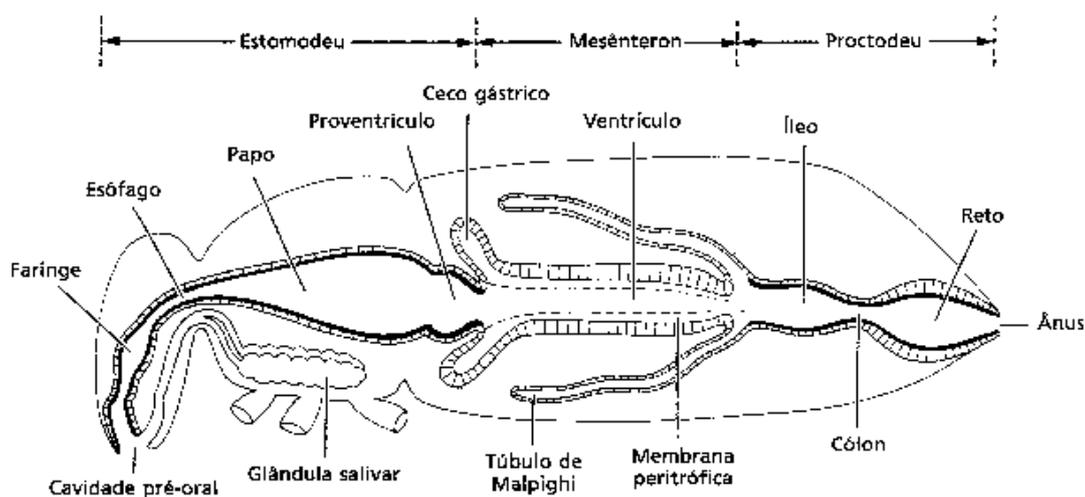


Figura 2: Diagrama do intestino de inseto (Gullan & Cranston, 2007).

Pelo fato das células epiteliais, cuja função é produzir e secretar enzimas digestivas, estarem no mesênteron, é nessa região do intestino que ocorre a maior parte da digestão e também da absorção dos produtos resultantes da degradação dos alimentos (Gullan & Cranston, 2007).

Outro aspecto importante que ocorre no mesênteron, quando da alimentação dos insetos, é a formação da MP. Esta estrutura é perfurada por poros que permitem o livre fluxo de moléculas pequenas, mas restringem o acesso de moléculas

grandes, bactérias e partículas alimentares, impedindo assim o contato do bolo alimentar com as células do mesênteron (Gullan & Cranston, 2007).

Considerando os estudos existentes atualmente sobre o papel da MP, é possível verificar que ela forma uma barreira permeável e auxilia no processo de todas as fases de digestão, além de proporcionar proteção mecânica para as células do mesênteron, que é considerada sua função principal (Moskalyk *et al.*, 1996; Lehane, 1997; Terra, 2001; Gullan & Cranston, 2007; Dinglasan *et al.*, 2009).

Há uma dinâmica muito intensa de moléculas de alimento parcialmente digeridas e enzimas digestivas que circulam pelo mesênteron no espaço endoperitrófico e ectoperitrófico, sendo o primeiro em direção posterior e o último em direção anterior (Figura 3). Em todo o processo de circulação, verifica-se que a movimentação endo e ectoperitrófica é realizada no sentido de mover moléculas de alimento para locais de digestão final e absorção, e também para conservar as enzimas digestivas que são retiradas do bolo alimentar, antes que o mesmo passe para a região de eliminação dos excrementos (Lehane, 1997; Terra, 2001; Gullan & Cranston, 2007).

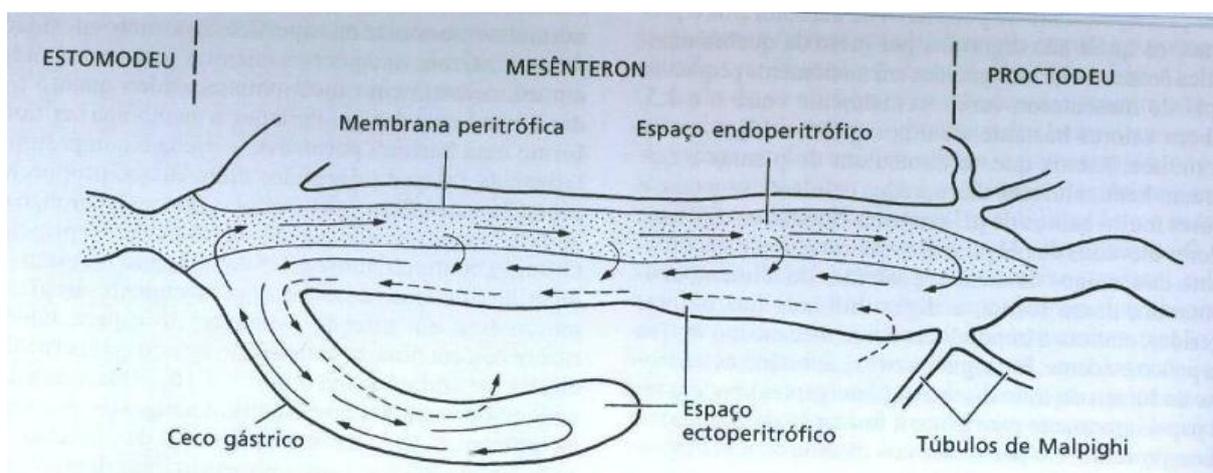


Figura 3: Esquema generalizado da circulação endoectoperitrófica das enzimas digestivas no mesênteron. (Segundo Terra & Ferreira, 1991; Gullan & Cranston, 2007).

1.4 Aspectos gerais da Matriz Peritrófica

O intestino médio dos mosquitos é a única porção do trato digestivo que não é revestida por uma cutícula protetora. Para a proteção, as células epiteliais do intestino médio produzem uma camada de células extracelular denominada de matriz peritrófica (MP) (Peters, 1992).

A MP é uma membrana semipermeável, constituída por uma mistura de quitina, proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos, que recobre todo o epitélio (Figura 4) (Lehane, 1997). Sua formação é estimulada por meio da ingestão de alimentos, quando ocorre a distensão e aumento do lúmen intestinal dos mosquitos (Richards & Richards, 1977).

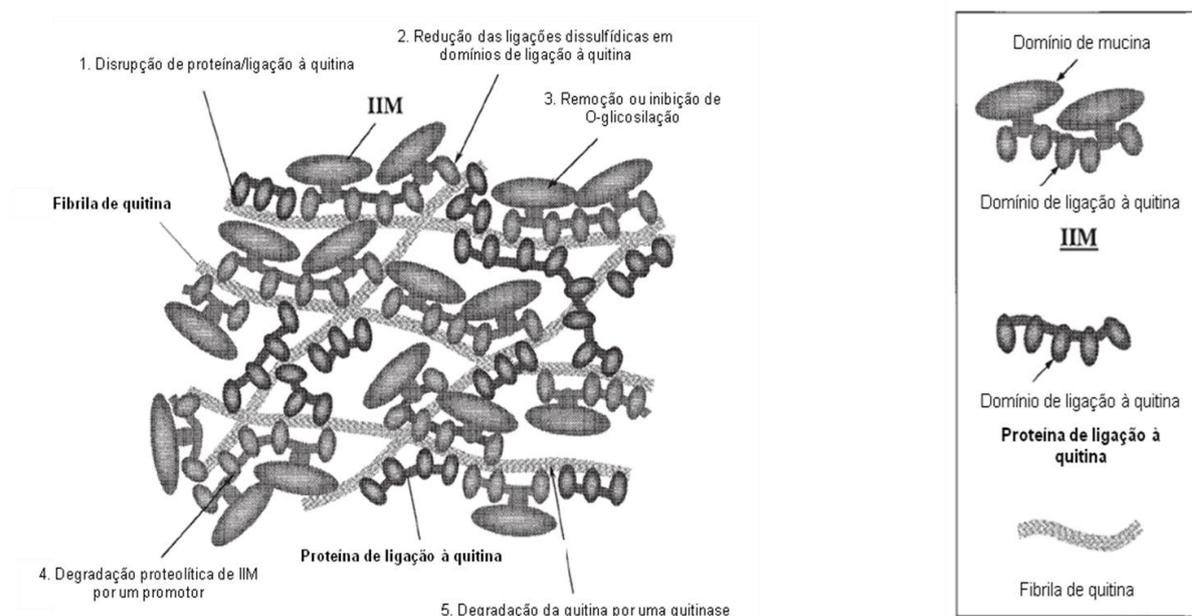


Figura 4 – Modelo esquemático da estrutura e composição da matriz peritrófica (Wang & Granados, 2001).

Na maioria dos insetos, as proteínas são os principais componentes da MP (Lehane, 1997; Wang e Granados, 2001), correspondendo de 22% a 55% da massa

total em mosquitos adultos (Moskalyk *et al.*, 1996, Wang & Granados, 2001). Por meio de eletroforese unidimensional (1- D) observa-se usualmente a presença de 12 proteínas, sendo a maioria glicosilada (Peters, 1992; Lehane, 1997).

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

Outro componente da MP são os proteoglicanos, macromoléculas formadas de proteínas e glicosaminoglicanos ligados covalentemente. Os proteoglicanos têm sido encontrados na maioria das MPs (Eisemann e Binnington, 1994; Terra, 1996; Lehane, 1997) e estão, possivelmente, envolvidas nas propriedades de resistência e permeabilidade (Tellam, 1996; 1999).

Segundo Lehane (1997), Wang e Granados (2001), Abraham e Jacobs-Lorena (2004), são três as principais funções atribuídas à MP: prevenir ou reduzir a invasão de patógenos, que ultrapassam a armadura cibarial; modular a digestão do sangue após o repasto; proteger as células epiteliais de danos mecânicos e químicos. De acordo com Tellam (1996) a MP é análoga ao muco gastrointestinal dos mamíferos e muitas das funções desempenhadas são semelhantes.

A armadura cibarial ou cibário é uma estrutura quitinizada presente no intestino anterior dos mosquitos, que funciona como um filtro, sendo um obstáculo físico, impedindo a entrada de microrganismos e parasitos para a via digestiva (McGreevy *et al.*, 1978).

Funcionalmente, existem dois tipos de MP, denominadas de “MP **Tipo I**” e “MP **Tipo II**”. A MP **Tipo I** é uma estrutura espessa (entre 2 a 20 μm) que reveste o mesênteron e é sintetizada por todas as células do epitélio do intestino médio em anofelinos adultos, frequentemente induzida pela distensão do intestino causada pela ingestão de alimento. A MP **Tipo II** é uma estrutura fina ($<1 \mu\text{m}$) que reveste toda a extensão do trato digestivo e é continuamente sintetizada por um pequeno órgão altamente especializado, a cárdia. Em anofelinos, a MP **Tipo II** ocorre somente em larvas (Tellam *et al.*, 1999; Hegedus *et al.*, 2009) .

1.5 Estudos de Proteínas

A expressão funcional do genoma reflete o proteoma, no seu estado atual de funcionamento do sistema, em condições fisiológicas específicas. O estudo do proteoma ainda é desafiador, pois a expressão gênica de uma célula é dinâmica e, depende do estado de desenvolvimento, da presença de inibidores ou ativadores e das condições do meio ambiente. (Rocha *et al.*, 2005).

Uma forma de conhecer as funções das proteínas é compará-las às funções conhecidas, seja na própria espécie, ou em outras espécies, uma vez que a maior parte das proteínas é conservada entre os organismos, mesmo aquelas que se encontram filogeneticamente distantes (Pimenta, 2003).

O estudo proteômico envolve a integração da biologia e da biotecnologia, e de certo número de tecnologias, que permeiam os campos da biologia celular e molecular, da bioquímica, da fisiologia, da morfologia, da estatística e da bioinformática, entre outros. Os primeiros passos desses estudos são a separação de misturas complexas de proteínas e sua identificação (MacDonald & Doman, 2004).

Os estudos do proteoma têm-se desenvolvido principalmente por eletroforese bidimensional (2-D) e espectrometria de massa. A primeira tem sido amplamente utilizada. Trata-se de uma técnica eficaz de separação de proteínas e utilizada para análise simultânea de produtos dos genes, com a capacidade original para identificar proteínas isoladas (*spots*) provenientes de misturas complexas de amostras biológicas (Monti *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2008).

Mesmo com novos métodos de separação molecular de proteínas, não era possível identificar os *spots* evidenciados nos géis, que só foi possível com a fusão do seqüenciamento de proteínas pelo método de degradação de Edman, desenvolvido em 1949 (Edman, 1949), associado à digestão enzimática das proteínas em membranas de nitrocelulose em 1987 por Aebersold *et al.*, (1987). A identificação de proteínas somente tornou-se eficiente com o advento da espectrometria de massa (Andersen & Mann, 2000) e o aumento dos bancos de dados genômicos, por seqüenciamento do DNA de vários organismos (Broder & Venter, 2000).

A espectrometria de massa é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra. Atualmente, é considerada uma das mais importantes ferramentas disponíveis no meio científico, fornecendo informação sobre a composição elementar de amostras; a estrutura molecular; a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras (Andersen & Mann, 2000).

Segundo Wagner *et al.* (2002), foi J. J. Thompson em 1912, que demonstrou que era possível separar moléculas na fase gasosa, por diferenças de massa e carga, sendo este, o princípio de funcionamento dos espectrômetros de massa. Há

vários tipos de espectrômetros de massa, mas todos eles requerem a gaseificação e ionização da amostra, aceleração da molécula carregada por um campo elétrico, dispersão dos íons de acordo com a razão massa/carga (razão m/z) e a detecção dos íons e registro do sinal.

A espectrometria de massa (EM) é uma técnica largamente utilizada pelos químicos na análise de moléculas pequenas ou de tamanho médio. O método é tão sensível que hoje é usado rotineiramente na análise de substâncias em baixa concentração, como no caso de *doping*, controle de alimentos, contaminação ambiental, entre muitas outras áreas de aplicação. A aplicação da EM na análise de macromoléculas só começou a ter sucesso na década de 70, quando se conseguiu levar macromoléculas à forma de gás ionizado. O grande avanço nessa área ocorreu com o desenvolvimento da técnica de ionização por *spray* eletrostático (ESI - *Electrospray ionization*), por Fenn, e da técnica de dessorção suave por laser (SLD - *Soft laser desorption*), por Tanaka. Com esses desenvolvimentos, a EM passou a ser largamente usada no estudo de macromoléculas biológicas, principalmente no estudo de proteínas (Colnago *et al.*, 2002).

Neste aspecto, a espectrometria de massa é a tecnologia que viabilizou a proteômica, permitindo a análise de um grande número de proteínas ao mesmo tempo. Além disso, os recursos da bioinformática foram fundamentais para armazenar e administrar os dados experimentais obtidos das análises proteômicas, sendo apoiada pelos bancos de dados e softwares específicos para proteínas, espécie e tecido específicos (Teixeira *et al.*, 2007).

O espectrômetro do tipo MALDI-ToF utiliza MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization ou ionização induzida a laser e assistida por matriz) como fonte de íons e está acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo, ToF (*Time of*

Flight). Este equipamento identifica o tempo de vôo de uma série de peptídeos obtidos pela digestão enzimática com sítio de digestão específico, e de acordo com esse tempo é determinada a massa/carga de cada peptídeo. É obtida então a chamada impressão digital de peptídeos (PMF – *Peptide Mass Fingerprint*). A enzima mais utilizada neste tipo de análise é a tripsina, que faz clivagem específica C-terminal adjacente a resíduos de lisina e arginina se estes não forem precedidos por prolina (Shevchenko *et al.*, 1996; Cagney *et al.*, 2003). Utilizando o espectrômetro do tipo MALDI-ToF-ToF é possível determinar a sequência de aminoácidos de um peptídeo (Aebersold & Goodlet, 2001; Köpke, 2003).

A utilização do PMF para identificação proteica exige que o genoma do organismo que está sendo estudado esteja armazenado em um banco de dados. Os dados das proteínas digeridas são confrontados com o banco de dados do genoma utilizando programas que usam algoritmos sofisticados, como exemplo “Bayesian” do programa ProFound, “MOWSE modificado” e “Número de matches” no MSFit e “MOWSE baseado em probabilidade” no Mascot. A identificação da proteína depende então da comparação entre as massas obtidas experimentalmente e aquelas obtidas teoricamente (Mann *et al.*, 2001).

Quando não existe o sequenciamento do genoma do organismo de interesse não é possível utilizar a técnica do PMF, tendo em vista que a substituição de apenas um aminoácido leva a uma modificação significativa na massa do peptídeo, impossibilitando sua correta identificação. Uma das ferramentas mais utilizadas neste caso é o MALDI-ToF-ToF. Baseada no seqüenciamento de um peptídeo específico clivado com tripsina, é feita uma busca em sequências disponíveis em banco de dados utilizando o modo MS/MS de alguns dos programas para

identificação de proteínas como ProFound, MSFit, Mascot (Aebersold & Goodlet, 2001).

A análise proteômica, pela sua alta resolução e sensibilidade, tem grande potencial para a identificação de proteínas, principalmente fluídos biológicos, tipicamente limitados em quantidade e concentração de proteínas. Por isso, as abordagens proteômicas vêm sendo utilizadas com sucesso na identificação de proteínas de diferentes parasitos (Guillou *et al.*, 2007; Bennuru *et al.*, 2009). Além disso, estudos imunoproteômicos, utilizando técnicas proteômicas associadas à análises imunológicas, têm auxiliado na identificação de proteínas antigênicas, com potencial imunodiagnóstico e/ou vacinal contra diferentes parasitos (Sotillo *et al.*, 2008).

1.6 Estudos de Proteínas em *Anopheles*

A partir das informações advindas dos estudos proteômicos, pode-se analisar qualquer fenômeno que implique modificações no conteúdo protéico de uma célula ou tecido. Neste sentido, o mosquito do gênero *Anopheles*, vetor da malária, tem sido alvo de estudos com abordagem proteômica. Atualmente existem estudos abordando a proteômica de fluidos da hemolinfa de *A. gambiae* (Paskewitz & Shi, 2005), o vetor da malária no continente africano, e de tecidos como a cutícula de larvas e de pupas, com a função de identificar e mapear as seqüências das proteínas da cutícula. (He *et al.*, 2007).

Dinglasan *et al.* (2009), utilizaram ferramentas proteômica para analisar as proteínas presentes na MP de *A. gambiae* e mostraram que 209 diferentes proteínas, entre 10KDa a 200 KDa, podem ser visualizadas na Matriz Peritrófica dessa espécie de mosquito.

Pereira (2007) caracterizou a análise do perfil protéico do intestino médio de machos e fêmeas de *A. darlingi*, em diferentes condições alimentares, e mostrou que a expressão está diretamente relacionada às fêmeas alimentadas com sangue por apresentarem maior número de *spots* protéicos. As fêmeas e machos alimentados unicamente com glicose apresentaram um perfil protéico menor e similar.

Existe um crescente interesse no entendimento dos aspectos relacionados à interação parasito-vetor, sobretudo naqueles relacionados à expressão protéica da matriz peritrófica do epitélio intestinal das fêmeas do vetor, após alimentação. Diferenças entre a biologia da matriz peritrófica de diferentes vetores pode também ser base de algumas das diferenças constatadas na infectividade do parasito (Vlachou *et al.*, 2005)

Shen e Jacobs-Lorena (1998) clonaram o gene da proteína 1 da matriz peritrófica de *A. gambiae*, AgPer1, mostraram que a proteína apresenta dois domínios de ligação à quitina conectada por uma seqüência curta ligadora, que contribuem para a formação de uma estrutura tridimensional, quitina-AgPer1 (figura 5). Shao *et al.* (2005), identificaram a partir de uma biblioteca de cDNA, uma nova proteína da matriz peritrófica de *A. aegypti*, denominada peritrofina 50 (Ae-Aper50), que apresenta cinco domínios de ligação à quitina. O gene desta proteína é expresso exclusivamente no intestino de fêmeas e sua expressão é fortemente induzida após a alimentação sanguínea.

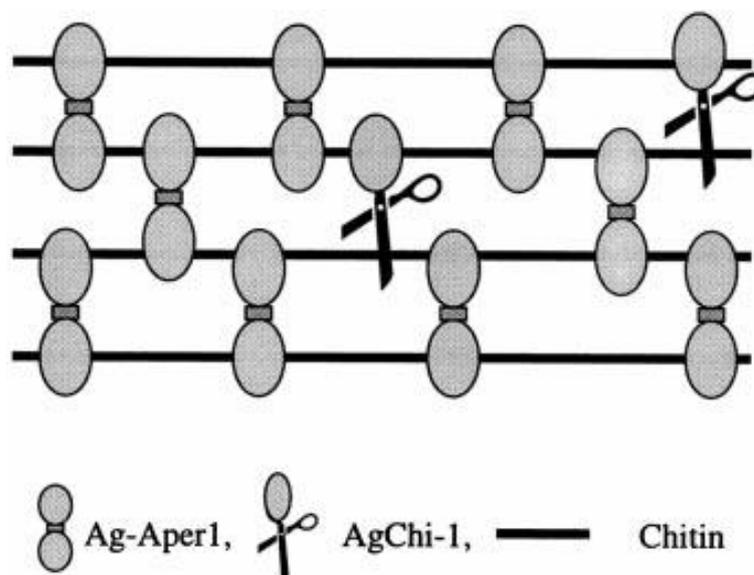


Figura 5 - Modelo proposto para a participação AgPer1 e de AgChit (uma quitinase específica do intestino) na formação e manutenção da MP.

Fonte: Shen & Jacobs-Lorena, 1998.

Os dois domínios de ligação à quitina da proteína AgPer1 ligam as cadeias poliméricas de quitina para formar uma rede tridimensional, enquanto que a AgChit1 se liga à quitina hidrolisando-a, resultando na ruptura local e formação de descontinuidades na rede. (Shen & Jacobs-Lorena, 1998).

Em anofelinos, as proteínas da matriz peritrófica são produzidas pelas células epiteliais que produzem e secretam enzimas digestivas, e armazenando em vesículas que, logo após a alimentação sanguínea, são ativadas para a formação da matriz peritrófica (Devenport *et al.*, 2004). Por outro lado, em *A. aegypti* as proteínas são armazenadas na forma de RNAm e quando o mosquito se alimenta de sangue a tradução é disparada (Perrone e Spielman, 1988; Billingsley e Rudin, 1992). Ainda, estudos anteriores demonstravam que a secreção da proteína da matriz peritrófica de *A. aegypti*, Ae-APer50, é mais intensa 4h após a alimentação sanguínea (Shao *et*

al., 2005); já em *A. gambiae* a expressão da proteína AgPer14 ocorre antes da alimentação sanguínea (Devenport *et al.*, 2004; 2005).

Os dados aqui apresentados ressaltam a importância da MP no processo de alimentação dos mosquitos e de todas as etapas do processo de infecção pelos plasmódios. Desta feita, os estudos voltados para entender os dois processos se justificam pela sua importância no controle vetorial. Conhecer as etapas desses processos, no que tange aos aspectos fisiológicos, significa desvendar novas ferramentas para combater a malária, com uma especificidade única para *A. darlingi*, principal vetor da malária no Brasil e na região amazônica.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar as proteínas e padronizar a indução da Matriz Peritrófica em larvas e adultos de *Anopheles darlingi*.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Padronizar o processo de indução experimental da Matriz Peritrófica em larvas e adultos;
- ✓ Identificar proteínas da Matriz Peritrófica em adultos por meio da espectrometria de massa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Áreas de Coleta

Os espécimes de *A. darlingi* utilizados neste trabalho, para análise da indução experimental da MP dos **Tipos I e II** foram coletados na região peri-urbana de Manaus, na Zona Leste da cidade. Nesta área, o *A. darlingi* ocorre em abundância, em diferentes localidades, conforme dados obtidos pelo INPA e pela Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas - FVS, nas atividades de monitoramento entomológico da área. A figura 6 mostra os pontos de coletas de anofelinos na área, para monitorar a densidade *A. darlingi*, informação necessária na implementação das ações de controle vetorial da malária, nesta área da cidade.



Figura 6. Mapa de Manaus demonstrando a área de coleta - Zona Leste

3.2 Coleta e Manutenção de Anofelinos

Os espécimes a serem usados no experimento foram obtidos com a aplicação de duas modalidades de coleta: **capturas de adultos e coletas de larvas**. A captura de adultos foi realizada entre 18h00 e 22h00 horas e das larvas no período da manhã, aproximadamente entre 8h30 e 11h00 horas. Estas atividades foram desenvolvidas no período entre julho de 2009 a outubro de 2010.

As localidades que predominaram as coletas de larvas foram em criadouros situados na Estrada do Puraquequara, na localidade Portela. (03°03'16.4"S, 59°53'44.0"W), mas também foram realizadas capturas de adultos na localidade desta Estrada Ramal 9 (03°03'09.1"S, 59°52'12.6"W). Outros pontos de coleta estavam situados no ramal do Brasileirinho, nos quais predominaram as capturas de adultos, foram as localidades do Raifram (03°02'09.5"S, 59°52'15.5"W) e do Cristo Vive (03°01'33.1"S, 59°51'07.7"W).

Considerando os **adultos**, após as coletas, as fêmeas foram transportadas para o Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), para se realizar o repasto sanguíneo, utilizando uma galinha (*Gallus gallus*) (Linnaeus,1758). Após o repasto, as fêmeas foram isoladas para postura individual em copos plásticos descartáveis de 100 mL (tipo sorvete), contendo algodão úmido no fundo recoberto com papel de filtro. Durante as desovas, as fêmeas depositavam os ovos sobre o papel de filtro. Em seguida, os ovos foram transportados para copos da mesma dimensão e forrados com papel de filtro nas laterais, para aguardar a eclosão dos mesmos. Em seguida, as larvas de primeiro e segundo estádios foram transportadas para cubas de manutenção. Nestas, as larvas foram mantidas até atingirem o estágio de pupa, quando foram

separadas em copos para aguardar a emergência do adulto. Após a emergência, os alados foram mantidos em gaiolas de poliestireno e recebiam alimentação de solução saturada de açúcar, embebida em algodão, que era trocada a cada dois dias. Esta alimentação, à base de açúcar, era então retirada das gaiolas 12 horas antes do experimento de indução da Matriz Peritrófica do **Tipo 1**. As figuras 7 mostram a sequência dos estágios de desenvolvimento dos anofelinos, mantidos no insetário. Em 7A constam os copos de 100 mL para obtenção das desovas e eclosão; em 7B as cubas de manutenção das larvas para o desenvolvimento até a fase de adulto. A figura 7C mostra a gaiola onde as pupas permaneciam em um recipiente conectado ao fundo da mesma, do qual emergiam os alados. Em seguida, estes automaticamente migravam para a parte superior da gaiola.

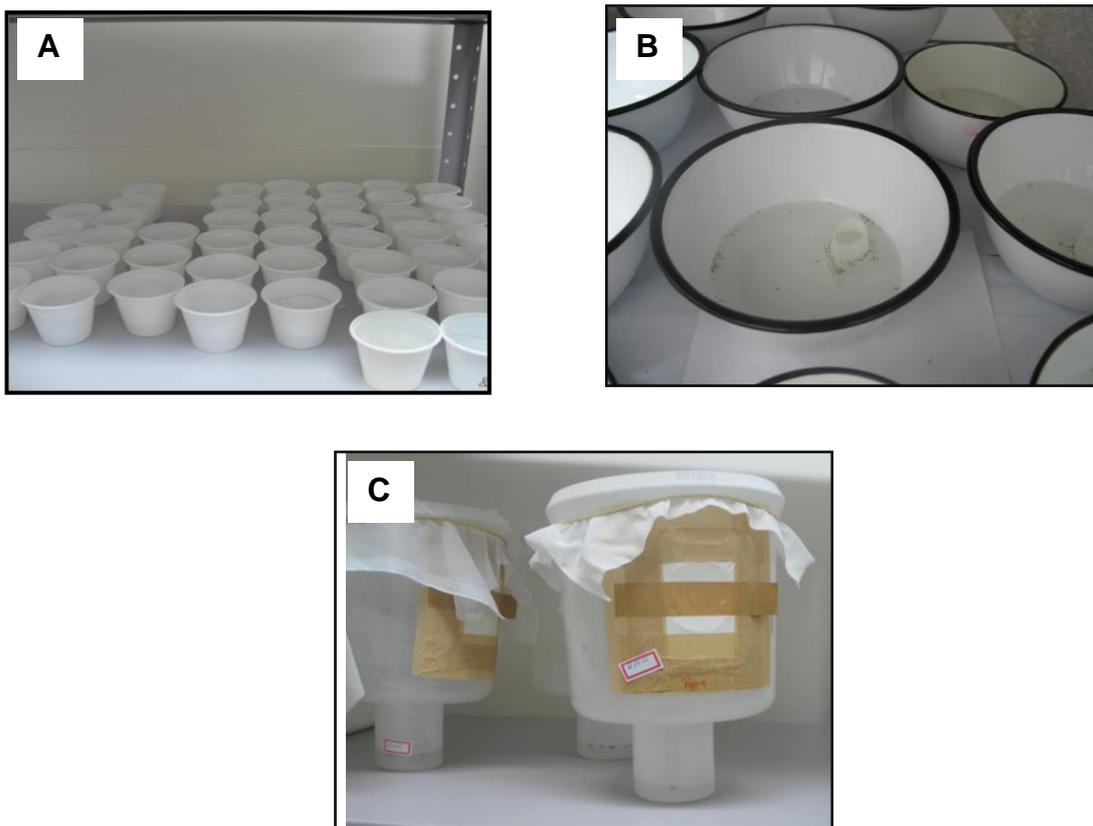


Figura 7. Estágios de desenvolvimento dos anofelinos no insetário. A - Copos com desovas para eclosão. B - Cubas de manutenção das larvas. C - Gaiola de emergência das pupas e manutenção dos adultos.

As larvas procedentes das desovas obtidas em laboratório foram mantidas com a ração de peixes de aquário, da marca Goldfish Colour e Tetramin, na proporção de 1:2. Esta mistura era intensamente triturada em um gral, praticamente até não se observar mais grãos, e utilizada para as larvas de 1º e 2º estádios. Uma mistura um pouco menos triturada (observa-se a dimensão maior dos grãos) era oferecida para as larvas de 3º e 4º estádios. A alimentação era colocada nas cubas duas vezes ao dia, no período da manhã e no final da tarde. Objetivando manter a superfície das águas das cubas de manutenção cristalinas e transparentes, os resíduos acumulados no fundo das mesmas eram retirados diariamente. Também, quando se observava primórdios da formação de película sobre as águas das cubas, estas eram retiradas imediatamente com auxílio de uma toalha de papel, colocadas em contato com a superfície da água.

Os mosquitos foram criados em um insetário com temperatura constante de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa entre 80% e 90%.

A identificação dos adultos e das larvas no laboratório foi realizada com o auxílio das chaves dicotômicas propostas por Gorham *et al.* (1967), Faran (1980), Faran & Linthicum (1981) e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

A outra **modalidade de coleta** consistiu na captura de espécimes da forma imatura, coletando-se **larvas diretamente nos criadouros**. As larvas foram coletadas com auxílio de uma concha entomológica, capturadas com um conta-gotas e armazenadas em baldes com água e um pouco de vegetação do próprio criadouro. Em seguida à coleta, os recipientes com as larvas foram transportada para o laboratório e realizada a triagem para a manutenção em cubas no insetário, separadas por fase de crescimento, para receberem a alimentação apropriada conforme o estádio. Durante as coletas das larvas nos diferentes pontos dos

criadouros, as capturas eram realizadas até se observar a redução do número de larvas de terceiro e quarto estádios em cada local. As larvas foram mantidas no insetário do laboratório até a formação de pupas, quando eram separadas em copos para aguardar a emergência dos alados.

Em seguida, após a identificação taxonômica, os espécimes eram mantidos em gaiolas, conforme o procedimento acima mencionado. Também estes exemplares de *A. darlingi*, obtidos desta modalidade de coleta de imaturos diretamente de criadouros da natureza, foram utilizados para o experimento da indução da MP do **Tipo I**.

Na indução da MP do **Tipo II**, foram utilizadas larvas obtidas de desovas dos adultos capturados na natureza. Este procedimento foi empregado, pois havia facilidades quando à identificação dos alados capturados. Isto possibilitou acompanhar espécimes de *A. darlingi*, quando à captura e montagem das desovas, para poder acompanhar a evolução dos estádios larvais, até a montagem dos experimentos para a obtenção da MP **Tipo II**.

3.3 Matriz Peritrófica Tipo I - Adultos

Conforme descrito anteriormente, 12 horas antes da indução da MP **Tipo I**, mosquitos adultos de três e quatro dias de idade foram privados de água açucarada a 10% e, em seguida, alimentados para indução da MP. No alimentador, ao invés destes mosquitos encontrarem uma alimentação à base de sangue, era oferecido o látex (16% v/v) em suspensão aquosa de 150 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, pH 7,0 com 1mM ATP, por meio de um alimentador artificial, aquecido por circulação de água a 37°C.

Nesta etapa do trabalho, para a padronização da dissecação, foram alimentadas 100 fêmeas com suspensão aquosa de látex e dissecadas 20 fêmeas no período de 6, 8, 10, 12 e 14 horas. Estes períodos foram determinados com o objetivo de obter a matriz completamente formada.

O látex da Sigma - Polystyrene Latex Beads (Ref. Nº LB-5) é composto de esferas de poliestireno de 0,46 µm. De acordo com a ficha técnica, o látex foi descoberto em 1947 e constituído de partículas de látex uniformes. Esta característica é necessária para estes experimentos, cujo objetivo é provocar a sensação de estômago alimentado, desencadeando assim a formação da matriz peritrófica. Desde então, têm sido utilizadas em um espectro amplo de aplicações, incluindo microscopia eletrônica, calibração de contadores de células, como mediador por anticorpos diagnósticos de aglutinação, experimentos de fagocitose, e muitos outros. A constituição física compreende micropartículas de poliestireno, de carga negativa e estabilizada como partículas coloidais. As micropartículas são produzidas por polimerização de estireno, em condições que induzem à coalescência espontânea. O número de partículas por mililitro (N) pode ser calculado pela equação - $(6 \times 10^{10}) S X X PL 1,828 \times 1,011$.

Os alimentadores ficavam com a suspensão aquosa de látex por uma hora. A Figura 8 mostra o processo de alimentação artificial. Como membrana nos alimentadores, inicialmente utilizou-se pele de aves (pinto de um dia) da cor branca, adquiridos em casas comerciais de produtos agropecuários. Como se observou rejeição dos anofelinos para se alimentarem, a membrana foi mudada, colocando-se parafilm. Porém, antes de montar o alimentador, a parte externa da membrana – o parafilm era colocado em contato com os pés de um técnico, que usava sapatos fechado e a meia de dois dias. Este procedimento de friccionar a membrana na pele

dos pés ativou o contato das fêmeas para se alimentarem da solução de látex. Em seguida, os mosquitos que se alimentavam eram separados em copos parafinados, onde permaneciam por diferentes períodos, até serem dissecados para verificação da MP induzida. As fêmeas que inicialmente não aceitavam o alimento a base de látex, eram recolocadas no dia seguinte, juntamente com outras novas, para mais uma sessão de alimentação.

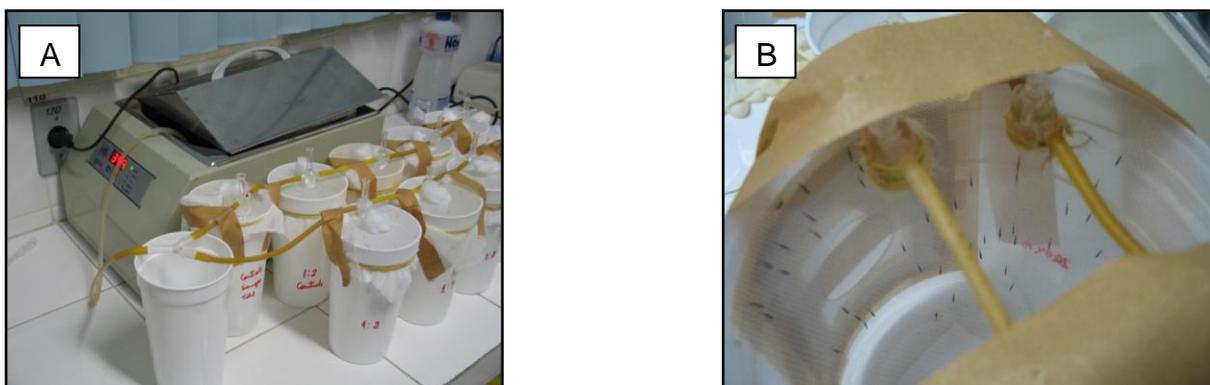


Figura 8. Sistema de alimentação artificial com campânula de vidros em série. A: alimentação em sequência mostrando a ligação com o circular de água ligado ao banho-maria. B: anofelinos ingurgitados após a alimentação artificial.

Durante o processo de indução da MP foi constatado um possível efeito do ciclo circadiano do mosquito no processo. Observou-se que as fêmeas eram mais ativas e aceitavam melhor o alimento artificial, quando as gaiolas permaneciam próximas das janelas e os mosquitos recebiam os raios solares, por aproximadamente 10 a 15 minutos, no início da manhã.

As fêmeas foram dissecadas considerando quatro períodos após a alimentação, com intervalo de duas horas entre cada um, correspondendo, seqüencialmente, a seis, oito, dez e doze horas após a indução da MP pela alimentação. Na dissecação das fêmeas seguiu-se a metodologia utilizada pelo Laboratório *Johns Hopkins Malaria Research Institute*, descrita pelo Dr. Marcelo

Jacobs-Lorena. As fêmeas eram imobilizadas em freezer a 4°C por 3 minutos. Em seguida, suas pernas e asas eram arrancadas e uma lavagem do espécime era feita para a remoção de possíveis resíduos de tegumento.

Em seguida, os espécimes foram inseridas em lâminas de vidro escavadas, contendo solução de dissecação 1:1 de etanol a 50% e solução salina a 50%, e colocadas sobre gelo. Com o auxílio de microestiletas, sob estereomicroscópio (aumento de 100x), os intestinos dos mosquitos foram incisados em forma de T, na região do exoesqueleto ventral do tórax, criando duas pontas e, em seguida, as pontas foram separadas lateralmente para expor o intestino médio anterior. Quando o exoesqueleto do abdômen era aberto para expor o intestino, a MP era localizada, sendo posteriormente destacada do intestino e transferida com auxílio de micropipeta automática para uma segunda lâmina, onde era lavada com etanol a 50%, para eliminação de resíduos. Após esta etapa, as MPs eram transferidas cuidadosamente para microtubos tipo *ependorf*, contendo 400 µL de metanol e estocadas em freezer a - 80°C até o processamento e análise protéica.

3.4 Matriz Peritrófica Tipo II - Larvas

Na indução da MP **Tipo II**, foram usadas larvas provenientes das desovas de fêmeas adultas coletadas no campo. Na indução da MP, as larvas eram privadas de alimento de peixes de aquário por cerca de 12 horas. Após esse período, carvão ativado era oferecido como alimento. Uma pequena quantidade de carvão ativado - uma ponta de microespátula (cerca de 10 mg), era pulverizada nas cubas de manutenção das larvas e, após aproximadamente uma hora, as larvas foram dissecadas.

A metodologia de dissecação da larvas foi a descrita por Edwards e Jacobs-Lorena (2000), com algumas modificações. As larvas foram colocadas sobre o gelo em uma placa de Petri para serem imobilizadas. Feito isso, elas foram transferidas para lâminas escavadas contendo uma gota de solução de dissecação (50% etanol; 50% solução salina) e, com o auxílio de microestiletas, sob estereomicroscópio com aumento de 100X, o trato intestinal foi seccionado e exposto. Em seguida, a MP foi cuidadosamente separada do intestino e transferida, usando micropipeta automática, para uma segunda lâmina, onde elas eram lavadas com etanol a 50%, para eliminação de resíduos. Posteriormente, elas foram transferidas cuidadosamente para tubos tipo *ependorf*, contendo 400 µL de metanol e estocadas em freezer - 80°C, até o processamento e a análise protéica.

3.5 Extração de Proteínas

Na extração de proteínas da MP de *A. darlingi*, utilizou-se a metodologia descrita em Dinglasan *et al.* (2009), com algumas adaptações. Os microtubos contendo a MP de larvas e de adultos foram retirados do freezer, centrifugados a 13.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 500 µL de água ultrapura nos tubos, que foram posteriormente armazenados em geladeira a 4°C por 24 horas para o processo de reidratação das matrizes.

Após esse período, os microtubos foram novamente centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, o *pellet* foi macerado, usando pistilo de plástico específico para tubos *ependorf*, por 5 minutos. Logo foram adicionados 250 µL de tampão de extração Tris 50 mM, pH 8,5 -Triton X-100 0,5%, até a homogeneização completa das amostras.

Os microtubos foram colocados em freezer a -80°C por 10 minutos, em seguida misturados em vórtex e inseridos em banho de ultra-som por 30 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novos tubos. Em seguida, eles foram novamente colocados em freezer e os procedimentos anteriores repetidos por 3 vezes.

Ao final desse processo, foram adicionados 100 μL de acetonitrila nos tubos, que foram posteriormente inseridos em banho de ultra-som por 40 segundos. Em seguida, foram adicionados 150 μL de tampão de extração nos tubos. Estes foram posteriormente centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para microtubos de diálise (“Cut off” 1 KDa, e colocados em geladeira a 4°C por 72 horas. Após esse período, as amostras foram secadas em um sistema a vácuo e armazenadas a 4°C .

A quantificação de proteínas e a espectrometria de massa, foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa (MAS) do Laboratório Nacional em Biociências (LNBio) em Campinas.

3.6 Quantificação de Proteínas Totais (Bradford)

A quantificação de proteínas totais foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massa do Laboratório Nacional Biociências (LNBIO), baseada no método Bradford (1976), com modificações usando o *kit BCA protein assay* (Pierce) e diluições seriadas de albumina sérica bovina (BSA), conforme as recomendações do fabricante.

O método Bradford é uma técnica baseada na interação do corante “Coomassie brilliant blue” (BG-250) com as macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Ela é bastante

usada para a determinação de proteínas totais em diversos meios: plasma ou soro sanguíneo, liquor, saliva, produtos alimentícios, suspensões de células, dentre outros (Zaia *et al.*, 1998).

A primeira etapa para a quantificação de proteínas foi a reidratação das amostras, adicionando 25 µL de bicarbonato de amônia nos tubos. Em seguida, uma mistura usando BSA, água ultrapura, proteína extraída e reativo de Bradford (volumes descritos na Tabela 1) era inserida em cada poço de uma placa tipo ELISA (96 wells). Após a preparação da placa, ela foi envolta em papel alumínio e incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, ela foi inserida em um espectrofotômetro modelo UV/VIS *spectrometer Lambda (Perkin Elmer)*, onde foi feita a leitura a 595 nm.

Tabela 1. Concentrações/volumes dos reagentes usados no mix de quantificação das proteínas de matriz peritrófica oriundas de larvas e adultos de *Anopheles darlingi*.

BSA (2ug/uL)	H₂O (uL)	Proteínas (ug)	Reativo Bradford (1:50)
1 uL	24	2	200 uL
2 uL	23	4	200 uL
3 uL	22	6	200 uL
4 uL	21	8	200 uL
5 uL	20	10	200 uL
6 uL	19	12	200 uL
0 (Branco)	25	0	200 uL

3.7 Espectrometria de Massa

3.7.1 Digestão do Extrato Protéico com Tripsina

A digestão das proteínas do extrato aquoso foi feita com base na metodologia do Laboratório de Espectrometria de Massa/LNbio, com algumas modificações. As amostras foram reidratadas com 25 µL de bicarbonato de amônia (50 mM), pH 8,0. Em seguida foram secos em sistema de concentração a vácuo *ependorf* por 40 minutos. A redução e alquilação das pontes de sulfeto foram realizadas da seguinte forma: incubação com 5µL de Ditioneitol (DTT), em banho-maria por 25 minutos a 56°C. Seguido de adição 14,7 µL da Iodoacetamida (IAA) em bicarbonato de amônia 50%, incubado por 30 minutos em ambiente protegido da luz. Adicionou-se 6 µL de DTT e incubou novamente em ambiente protegido da luz por 15 minutos. Adicionou 1,3 µL de CaCl₂ (Cloreto de cálcio, 1 mM), as amostras foram colocadas em gelo e adicionado 1 µL de solução de Tripsina, marca PROMEGA, pH 8 e incubados por 16 horas a 37 °C, para a digestão protéica completa. Os peptídeos formados foram centrifugados por 15 minutos a 13000 rpm e foi adicionado 18 µL de ácido fórmico (1%).

3.7.2 Extração de Peptídeos

A amostra foi passada na coluna OASIS HLB 30 mg 1cc, acidificada com ácido fórmico (1%), condicionada em 1 mL de acetonitrila (ACN) + ácido fórmico (0,1%). Para equilibrar utilizou-se 1 mL de água ultrapura + ácido fórmico (0,1%).

Posteriormente verificou-se e ajustou-se o pH para 3, com ácido fórmico. As amostras foram então inseridas na coluna, lavadas com 1 mL de diclorometano (CH₂Cl₂/100%) + ácido fórmico (0,1%). Feito isso, elas foram lavadas novamente

com 1 mL de água + ácido fórmico (0,1%) para a retirada do diclorometano, eluídas com um gradiente de 1 mL de acetonitrila 50% (ACN, 50% + ácido fórmico, 0,1%), depois com um gradiente de 1 mL de acetonitrila 80% (ACN, 80% + ácido fórmico, 0,1%). Finalmente, os extratos de peptídeos concentrados foram secados em um sistema a vácuo e estocados em freezer a -20°C, até o início das análises.

3.8 Maldi Q TOF/MS

Para a obtenção das massas moleculares dos peptídeos foi utilizado um espectrômetro de massas com fonte de ionização tipo Maldi (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) e Nanoelectrospray (ESI). Uma alíquota de 3 µL de peptídeos resultantes foi separado em coluna de fase reversa C18 (100 µm x 100 mm) (nonoAcquityUPLC, Waters) RP-HPLC utilizando um sistema de cromatografia *nano Acquity Ultra Performance LC (Waters)-electrospray tandem mass spectrometry* acoplado ao espectrômetro de massa *Q-Tof Ultima API* (MicroMass/Waters), com uma taxa de fluxo de 600 nL/min. O gradiente usado foi de acetonitrila (0,80%) em ácido fórmico (0,1%) por 45 minutos. O instrumento foi operado no modo “*top three*”, no qual um espectro de massa é adquirido por MS/MS dos três picos mais intensos detectados. O espectro dos fragmentos resultantes foram pesquisados usando o programa Mascot (MassLynx 4.1) contra a base de dados do NCBI (NR database) restrito a *Anopheles* sp., com carbamidometilação como modificação fixada e oxidação de metionina como modificação variável, com um fragmento de tolerância padrão de 0,1 Da. Nenhum peptídeo ou proteína de interesse foi confirmado por exame manual do espectro.

4. RESULTADOS

Os dados obtidos neste trabalho permitiram traçar os procedimentos necessários para a indução *in vitro* da Matriz Peritrófica em alados – **Tipo I** e em larvas – **Tipo II**. Estes procedimentos constituem-se em etapas altamente específicas, que mostram características morfológicas de cada tipo de MP.

Dentre estes procedimentos, ressalta-se a observação de que os alados tornam-se mais ativos durante a alimentação artificial, quando anteriormente passam por um período junto à janela do insetário para receberem os raios solares, logo no início da manhã. Isto se faz necessário uma vez que a solução oferecida consiste num produto sem valor nutricional, sem sabor algum – a solução de látex mencionada na metodologia.

Nas etapas seguintes, foi determinado o tempo necessário para a formação da MP, após a alimentação. Este tempo foi fundamental para permitir dissecar a MP e tornar possíveis a lavagem e o transporte da MP para os tubos de congelamento. As MPs consistem de uma estrutura altamente tênue e se este tempo de formação não for mantido, a membrana se desfaz completamente durante o manuseio, inviabilizando totalmente o armazenamento das amostras.

Considerando a MP **Tipo II**, os procedimentos foram relativamente mais simples, pois as larvas aceitaram de forma mais rápida a alimentação artificial a base de carvão. Neste caso, a dificuldade maior foi em determinar o período necessário de alimentação e de repouso até a dissecação dos espécimes. Este período de repouso foi fundamental para assegurar o êxito na extração, lavagem e transporte para os tubos de armazenamento das MPs obtidas.

4.1 Indução da Matriz Peritrófica em Adultos

O procedimento para a indução da MP em adultos – **Tipo I**, foi por meio da alimentação artificial, utilizando-se a suspensão aquosa de látex, substituindo a alimentação sanguínea. A ingestão intensa pelo mosquito da solução com o látex provoca a formação de um volume na parte interna do intestino médio do mosquito, o que induz à formação da MP conforme figura 9, abaixo.



Figura 9. Fêmeas alimentadas com látex, mostrando a distensão do abdômen.

Foram observadas muitas dificuldades para a obtenção *in vitro* da matriz peritrófica nos alados, sendo utilizados cerca de 5.000 exemplares de *A. darlingi* no total dos experimentos. O número elevado de exemplares resultou das dificuldades em se determinar os tempos necessários de cada etapa – idade após a emergência, assim como do período após a retirada da alimentação a base de solução açucarada 10%, período no alimentador artificial com a solução aquosa de látex, período entre a finalização da alimentação artificial e a dissecação, gráfico 1. Nesta última, foi fundamental estabelecer procedimentos específicos durante a dissecação, lavagem e o transporte da matriz, que é muito tênue, para o microtubo de congelamento.

Outro parâmetro fundamental foi à alta mortalidade dos alados que ocorre após a ingestão da solução de látex. Observou-se que cerca de 40% a 50% dos mosquitos morrem após a alimentação e o tempo de repouso até a dissecação. A redução ocorre após a dissecação, observando que muitas das MP estavam muito

tênuas não suportando o processo de dissecação, se desfazendo durante o mesmo. Outro fator de redução é o número de fêmeas que se alimentaram mais não formaram a MP ou a formavam de forma incompleta e se desfaziam durante o manuseio, provavelmente em consequência da pressão muito forte exercida pelo látex. O percentual de perda nesta etapa estima-se em torno de 30%. Ou seja, como resultado no final do processo, são cerca de 5 matrizes que se obtêm em média por recipiente de alimentação, que se inicia com cerca de 30 exemplares.

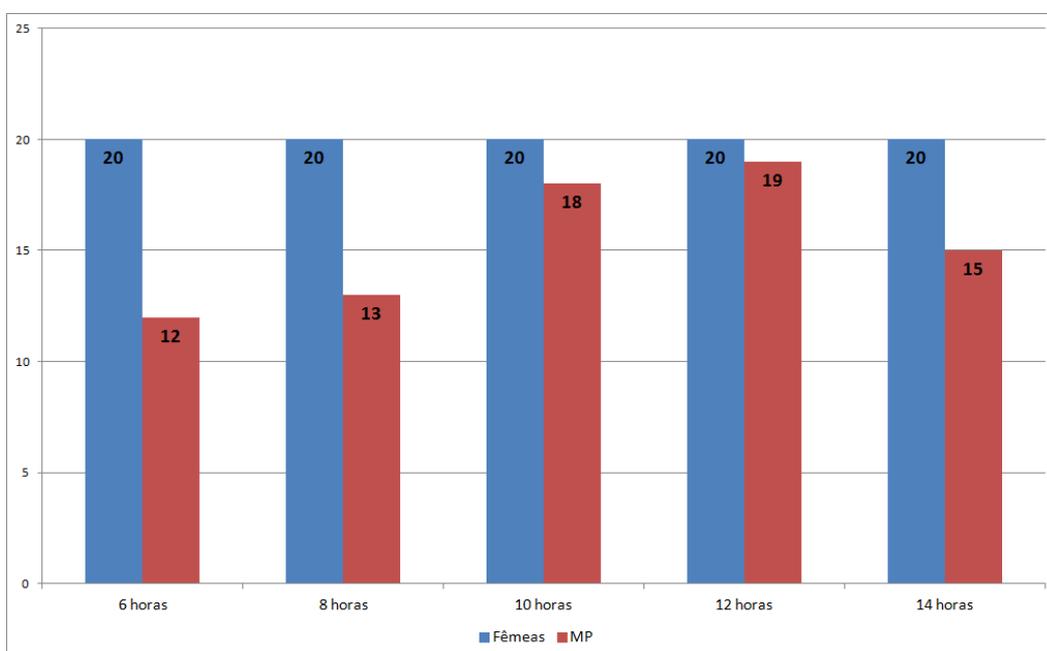


Gráfico 1. Padronização do tempo de formação e dissecação da MP.

Considerando o período após alimentação, os resultados mostraram que de seis a oito horas a matriz estava ainda incompleta, excessivamente fina, mole, frágil e com bolo alimentar pouco compactado. No período de 10 e de 12 horas, a matriz estava perfeitamente formada, com rigidez máxima e conteúdo alimentar bem compactado. A Figura 10 mostra a MP com oito e com dez horas em seguida à alimentação. Após essas análises, o período de 10 horas foi tomado como o “período padrão” para dissecar a Matriz Peritrófica de *A. darlingi*.

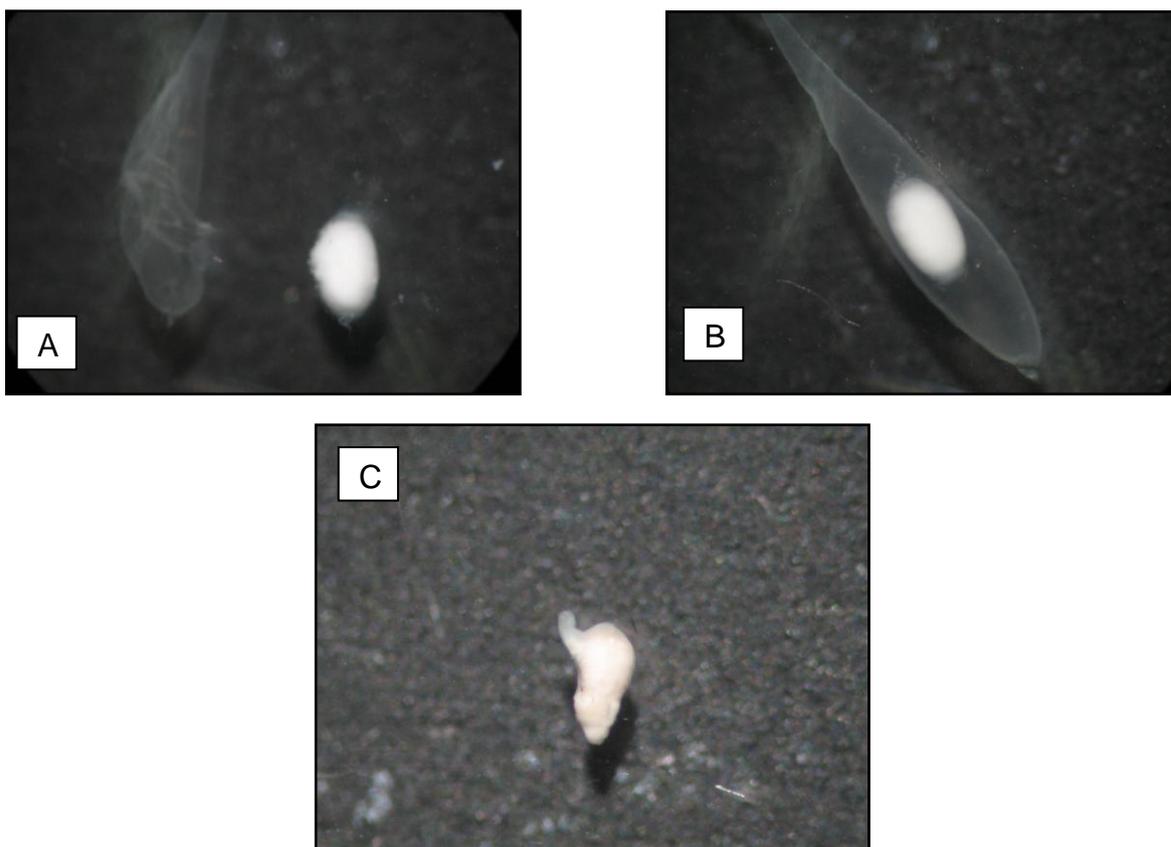


Figura 10. Fotos do intestino de *Anopheles darlingi* com matriz peritrófica após alimentação com solução de látex. A: matriz incompleta formada no período de 8 horas. B: matriz completa formada no período de 10 horas. C: matriz envolvendo o bolo alimentar formado pelo látex.

No processo todo do preparo das MP neste trabalho, aproximadamente 100 procedimentos de alimentação foram realizados. Como resultado foi possível observar que, em média, conseguiu-se em cada ciclo de alimentação, cerca de 10-20 MP íntegras. Porém, registrou-se até 22 MP íntegras em um único lote de 50 indivíduos.

No cômputo geral de todos os procedimentos realizados neste trabalho, foram obtidas cerca de quase 800 MP do **Tipo I**. Dentre estas, separou-se cerca de 450 MP que se mostravam mais bem formadas e selecionamos 300 que estavam íntegras e foram para análise de identificação das proteínas, por meio da espectrometria de massa.

4.2 Indução da Matriz Peritrófica em Larvas

A Matriz Peritrófica foi induzida também nas formas imaturas (larvas). Neste estágio, a matriz foi induzida empregando-se carvão ativado em pó como alimento. A figura 11 mostra as MP de larvas formadas após a alimentação com o Carvão ativado, sendo uma (A) com a alimentação incompleta, pois ainda havia alimento da ração comum no intestino. O carvão ativo ocupa apenas algum espaço. Em B a matriz já está completamente formada, perfazendo uma hora após a alimentação.

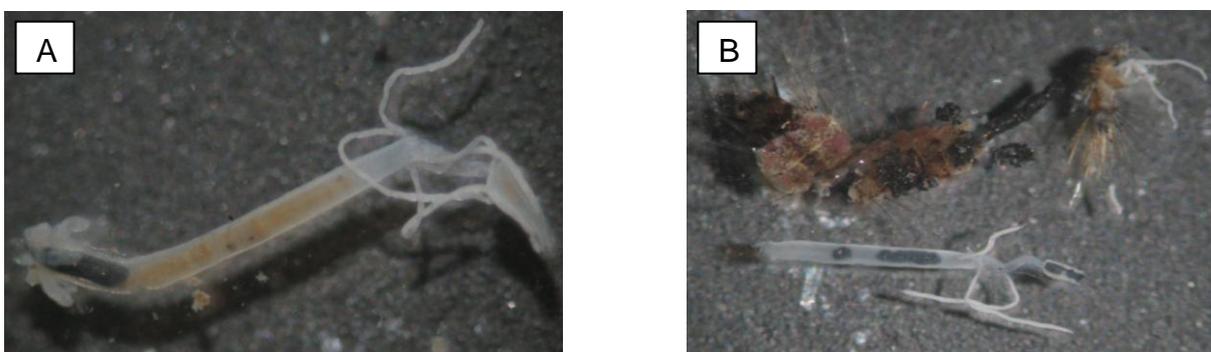


Figura 11. Larva alimentada de 4^o estágio com carvão ativo com intestino exposto. A: início da alimentação, onde o carvão está apenas na parte anterior. B: a matriz está completa, mas sofreu uma divisão no processo de dissecação. Observação com aumento de 100X ao estereomicroscópio.

As formas imaturas foram criadas e mantidas até o 3^o estágio em cubas de manutenção. Após atingirem esse estágio, elas eram transferidas para outras cubas tendo sua alimentação a base de ração de peixes suspensa por 6 horas. Após este período, carvão ativado em pó era oferecido como alimento em cada cuba e colocado com auxílio de uma espátula (cerca de 10 mg), com uma aplicação. Foi observado que a permanência das larvas nestas cubas por 30 minutos foi insuficiente para haver a indução da matriz. O período melhor para haver a formação da matriz foi de uma hora após oferecer o carvão ativado para as larvas nas cubas de manutenção. Assim, adotou-se o período de uma hora como padrão para se

obter a MP **Tipo II** de *A. darlingi* e estarem completamente formadas para a dissecação, lavagem e transporte para armazenamento e congelação. Com este período padrão, as larvas que foram dissecadas apresentavam a MP de larvas bem formada, bem compactada, com máxima rigidez, o que proporciona a obtenção de material íntegro para análise posterior.

Aproximadamente 600 larvas foram dissecadas. Entretanto, o fato da MP de larvas – **Tipo II** ser mais delicada do que a MP de adultos - **Tipo I**, obteve-se pouco material íntegro. Do total de procedimentos realizados – cerca de 50 alimentações, somente 186 MP de formas imaturas estavam intactas e aptas para as análises.

Em decorrência desta característica frágil da MP de larvas, não foi possível neste período do trabalho obter a quantidade suficiente de amostras para a análise com a espectrometria de massa. Este experimento terá continuidade posteriormente, quando será possível ampliar o tempo para consolidar uma amostra maior. Nesta fase do trabalho apenas foi possível analisar todos os passos necessários para a indução e descrever todas as etapas padronizadas para efetivar a amostra total para análise. No mínimo 300 MPs para cada sessão de análise.

4.3 Quantificação de Proteínas Totais (Bradford)

A quantificação foi realizada em matrizes oriundas de larvas e de adultos, usando o método Bradford modificado. Dos extratos protéicos contendo 186 MP de larvas e 300 MP de adultos foram retirados 2 µg de cada um para análise e quantificação. No entanto, não foi possível obter resultados porque não houve a reação de coloração, decorrente da baixa concentração de proteínas, o que inviabilizou a leitura e quantificação pelo aparelho. Estes dados são indicativos de que há necessidade de aumentar o número de MP nas análises.

Essa metodologia não é eficaz porque as proteínas são insolúveis e o método colorimétrico não detecta sua quantidade.

4.4 Análise das proteínas identificadas na MP Tipo I

À medida que as MPs de *A. darlingi* foram obtidas, eram imediatamente dissecadas e armazenadas em freezer - 80° C, até o momento da extração de proteínas. Após esta extração, que foi realizada no Laboratório de Toxicologia Molecular do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Buhnheim” do Instituto de Medicina Tropical do Amazonas.

Após esta etapa, o material foi novamente armazenado em freezer - 80° C, até o momento que foi reidratado para se proceder a digestão triptica, realizada no LNBio – Laboratório de Espectrometria de massa.

Posteriormente à digestão triptica, as mostras foram analisadas por meio da espectrometria de massa, comparando-se as massas obtidas pela digestão triptica do extrato protéico com as massas dos peptídeos teóricos obtidos a partir do banco de dados do genoma de *Anopheles* sp, a validação foram nos sites www.ncbi.nlm.nih.gov / www.uniprot.gov e todos os resultados de identificação obtidos no programa Mascot – www.matrixscience.com.

A análise da espectrometria de massa identificou oito proteínas que estão relacionadas na Tabela 2, com as respectivas funções e que tinham similaridade com as proteínas de espécies de *Anopheles* previamente anotadas no banco de dados do NCBI. As identificações resultaram em proteínas que estão caracterizadas em diferentes espécies de anofelinos. As proteínas AdP1, AdP3, AdP4, AdP6 e AdP7 e AdP8 foram identificadas como proteínas anotadas em *A. gambiae*, a proteína AdP2 em *Anopheles farauti* e a proteína AdP5 em *Anopheles albimanus*.

Tabela 02. Caracterização de proteínas da matriz peritrófica por Espectrometria de massas.

Proteína	Massa Molecular (kDa)	Identificação por MALDI-TOF (Número de acesso NCBI)*	Espécie	Cobertura (%)**	Função Predita***
AdP1	42.194	P84185	<i>A. gambiae</i>	85	Estrutura de citoesqueleto, mobilidade celular, movimento de cromossomos e contração muscular.
AdP2	22.765	Q1KTS6	<i>A. farauti</i>	48	Atividade no fator de alongação do processo de tradução, GTPase e ligação GTP.
AdP3	27.619	Q7QCD5	<i>A. gambiae</i>	47	Proteína kinase tipo receptor com repetições ricas em leucina, proteína de ligação.
AdP4	12.029	P90675	<i>A. gambiae</i>	39	Histona 2A, ligação de DNA.
AdP5	46.779	Q3HNB2	<i>A. albimanus</i>	36	Chaperona do tipo calreticulina, enovelamento de proteínas, ligação de íons de cálcio
AdP6	55.991	Q7Q7N8	<i>A. gambiae</i>	30	Proteína de ligação, ligação GTP, nucleosídeo-trifosfatase.
AdP7	13.765	Q27442	<i>A. gambiae</i>	29	Histona H2B, Componente do core do nucleossoma, regulação transcricional, reparo e replicação do DNA, estabilidade cromossômica.
AdP8	-	Q380S9	<i>A. gambiae</i>	33	Proteína com atividade acetiltransferase

*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>;

**Porcentagem de cobertura de matchs nas sequências de proteínas;

***Predição com base nos dados de Ontologia gênica (GO) e domínios conservados descritos no UNIPROT para cada proteína.

Todas as proteínas identificadas por analogia com a ontologia das proteínas derivadas do genoma de anofelinos sugerem ter função conhecida.

A proteína AdP1 foi identificada como Actina 5C. A actina é um dos componentes principais das células epiteliais do intestino.

As proteínas AdP2 e AdP6 são GTPases. As GTPases são enzimas hidrolases que se ligam e hidrolisam GTP.

A proteína AdP3 é uma proteína kinase do tipo receptor com repetições ricas em leucina, intimamente associadas com respostas imunes contra os parasitos da malária.

As proteínas AdP4 e AdP7 são histonas, sendo a primeira do tipo H2A e a segunda H2B.

A proteína AdP5 é uma chaperona do tipo calreticulina. Ela reside no lúmen do Retículo Endoplasmático e está envolvida no controle de qualidade e na nova síntese de glicoproteínas, assim como na homeostase do Cálcio (Ca^{2+}).

A proteína AdP8 é uma proteína com atividade acetiltransferase. Ela está envolvida nas vias de remodelação da biossíntese glicerofosfolípeos que catalizam a incorporação de um grupo acetil.

5. DISCUSSÃO

Os trabalhos realizados para análise da Matriz Peritrófica evidenciam o importante papel desta estrutura na proteção do trato digestivo nos insetos em geral. Considerando o gênero *Anopheles*, os dados da literatura também evidenciam este aspecto. Trabalhos relevantes foram realizados por Peters (1992); Lehane (1997); Tellam (1999); Terra (1990); Moskyk *et al.*(1996); Shen & Jacobs-Lorena(1998); Shao *et al.*(2001). A formação da MP torna-se um evento especialmente relevante, porque além da proteção do epitélio de revestimento do intestino médio, temos que considerar que todo o processo está sincronizado também com a infecção pelo *Plasmodium*. Há um sincronismo entre a formação da MP e o tempo de maturação dos gametas, sendo que no masculino ocorre a importante etapa da exoflagelação, quando adquirir mobilidade, há a formação do zigoto, originando o oocineto que invade o epitélio do intestino, migrando para a parte externa, ficando entre o epitélio e a membrana.

Portanto, no processo evolutivo, além da formação da MP com vistas à proteção do epitélio, também houve uma adaptação do parasito para assegurar a reprodução. Tudo ocorre no espaço de 24 horas, pois o parasito, em consequência de mudanças na estrutura da MP, não consegue ultrapassar esta matriz em função das transformações que ocorrem. O parasito secreta uma quitinase para ultrapassar a MP. No entanto, para elucidar o processo como um todo, há necessidade ampliar os estudos sobre a estrutura e composição molecular da MP.

5.1 Indução da matriz peritrófica em adultos

A matriz peritrófica é citada desde 1762 por Lyonet e, em outros insetos, foi estudada por Balbiani desde 1890. Trata-se de uma estrutura que foi observada desde os primeiros estudos com os insetos. Revisões sobre a MP foram realizadas por Richards & Richards (1977), Peters (1992), Jacobs-Lorena & Oo (1996). Levando-se em conta o aspecto estrutural e o papel de proteção do epitélio do intestino médio, são revisões realizadas por Tellam (1996), Lehane (1997) e Tellam *et al.* (1999).

De acordo com Moskalyk *et al.* (1996) a análise molecular e caracterização da MP que contenha sangue é dificultada por causa da presença de proteínas sanguíneas que não podem ser separadas fisicamente da matriz. Entretanto, um estudo desenvolvido por Peters (1992) evidenciou que somente a distensão abdominal, e não a presença de sangue é capaz de induzir a formação da MP. Nesse sentido, uma técnica de indução de matriz utilizando alimentos livres de proteínas, tais como o látex, foi desenvolvida para solucionar o problema acima descrito, sendo a técnica mais amplamente usada na análise proteômica da MP de mosquitos vetores de doenças. Neste estudo, foi analisada a indução e formação da MP, para verificar as possíveis proteínas presentes em adultos e larvas de *A. darlingi*. Como as fêmeas de anofelinos têm preferência por sangue, houve uma série de dificuldades para se conseguir a alimentação de adultos, unicamente com a solução de látex.

Em conseqüência, foi necessário utilizar um número elevado de espécimes de *A. darlingi*, o que demandou uma atividade muito intensa de manutenção no insetário e no processo de alimentação artificial. Após todos estes procedimentos ficou padronizado que as fêmeas a serem utilizadas nos alimentadores

necessitam ter pelo menos de 3 a 5 dias. Após a alimentação, padronizou-se o período de 10 horas para a dissecação da MP. Com este procedimento, as MPs estão formadas e com as paredes rígidas, o que diminui a perda de indivíduos que não a formaram.

A MP induzida por látex é mais fina e mais frágil do que a MP estimulada por uma alimentação à base de sangue. Isto foi uma das causas que contribuiu para a redução do número de MP integra obtida no final do processo de dissecação. Este fato explica a redução elevada do número de MP que não estavam íntegras no momento da seleção para análise – redução de cerca de 800 para 300 íntegras para análise.

Torna-se importante ressaltar nesta discussão, o procedimento interessante observado quanto à importância dos raios solares, no início da manhã, para tornar os mosquitos mais ativos. A partir do momento que esta etapa foi incluída na rotina de alimentação artificial, observou-se aumento no número de fêmeas alimentadas e, conseqüentemente, no número de MPs formadas e íntegras após a dissecação.

5.2 Indução da Matriz peritrófica em larvas

As análises realizadas neste trabalho em relação à MP **Tipo II** possibilitaram padronizar a forma de indução para *A. darlingi*. A alimentação experimental, a base de carvão ativo, necessita do período de uma hora para consolidar a formação MP. Também, é necessário que as larvas sejam privadas de alimentação por um período de seis horas.

5.3 Análise das proteínas identificadas na MP Tipo I

Análises baseadas em gel 2-D revelaram a presença de duas proteínas principais oriundas da MP **Tipo I** de simuliídeos (Ramos *et al.*, 1994), 20 proteínas em *A. aegypti* e 40 em *A. gambiae* (Moskalyk *et al.*, 1996). Um estudo proteômico da MP **Tipo I** de *A. gambiae*, usando espectrometria de massa, realizado por Dinglasan *et al.* (2009), identificou 209 proteínas, das quais 123 tinham sinais de peptídeos preditos. Destas, 17 tinham domínios transmembrana e estavam mais associadas com as proteínas da superfície do intestino médio do que propriamente proteínas intercaladas com as fibrilas de quitina da MP. Segundo esses autores, a presença de proteínas de transmembrana seria decorrente de contaminação na hora do processamento das amostras, pois no momento da dissecação é difícil separar totalmente a MP do tecido intestinal adjacente. Esse fato também foi observado nas análises aqui realizadas. Das 8 proteínas encontradas, somente 2 parecem realmente estar associadas com a MP de *A. darlingi* (AdP2 e AdP5). As outras 6 estão mais relacionadas com as células do epitélio intestinal adjacente à matriz.

A proteína AdP1, por similaridade das proteínas presentes no banco de dados do NCBI, foi identificada como Actina 5C. A actina é um dos componentes principais das células epiteliais do intestino médio. É fator importante na estrutura do citoesqueleto e na contração muscular. De acordo com a base de dados do NCBI essa proteína apresenta 376 resíduos de aminoácidos (Figura 11), tem massa molecular de 42.194 kDa e está envolvida em vários tipos de mobilidade celular e são totalmente expressas em todas as células eucarióticas. Estão envolvidas em várias funções celulares, tais como estrutura do citoesqueleto, mobilidade celular, movimento de cromossomos e contração muscular. Em *A.*

gambiae, já foram descritos pelo menos 5 genes diferentes de actina (Salazar et.al., 1994).

```

      10           20           30           40           50           60
MCDEEVAALV VDNQSGMCKA GFAGDDAPRA VFPSIVGRPR HQGVMVGMGQ KDSYVGDEAQ

      70           80           90           100          110          120
SKRGILTLKY PIEHGIVTNW DDMEKIWHHT FYNELRVAPE EHPVLLTEAP LNPKANREKM

      130          140          150          160          170          180
TQIMFETFNT PAMYVAIQAV LSLYASGRRT GIVLDSGDGV SHTVPIYEGY ALPHAILRLD

      190          200          210          220          230          240
LAGRDLTDYL MKILTERGYS FTTTAEREIV RDIKEKLCYV ALDFEQEMAT AASSSSLEKS

      250          260          270          280          290          300
YELPDGQVIT IGNERFRCPE ALFQPSFLGM EACGIHETTY NSIMKCDVDI RKDLYANTVL

      310          320          330          340          350          360
SGGTTMYPGI ADRMQKEITA LAPSTMKIKI IAPPERKYSV WIGGSILASL STFQQMWISK

      370
QEYDESGPSI VHRKCF
```

Sequência de resíduos de aminoácidos sugere similaridade com a proteína “Actina 5C” de *Anopheles gambiae*, destacadas em vermelho e azul, corresponde a sequência de peptídeos detectados na proteína AdP1 da matriz peritrófica de *Anopheles darlingi*.

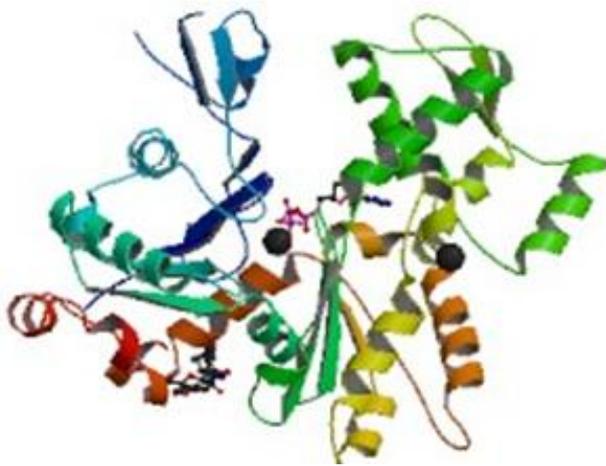


Figura. 12 - Estrutura 3D da proteína de Actina 5 C de *Anopheles gambiae*.

Esta proteína é ativada durante a invasão do *Plasmodium*, contribuindo para a morte do parasito, esse processo ainda é desconhecido. Participa da reestruturação das células epiteliais do intestino médio do mosquito (Vlachou *et al.*, 2005). Porém oocinetos de *Plasmodium bergeri* são capazes de atravessar uma estrutura rica de actina, invadindo células da membrana plasmática basolateral (Vlachou *et al.*, 2004).

As proteínas AdP2 e AdP6 são GTPases. As GTPases são enzimas hidrolases que se ligam e hidrolisam GTP. A presença destas proteínas nas amostras pode estar correlacionada com a translocação de proteínas para dentro e para fora da matriz peritrófica.

A proteína AdP2 tem homologia com a EF-1 α (fator de alongação-1 alfa). Essa proteína apresenta 208 resíduos de aminoácidos, peso molecular de 22.765 kDA, sendo um importante fator de alongação do processo de tradução, ligação de GTP e atividade GTPase (Figura 12). As proteínas GTPases pequenas, assim chamadas devido ao seu baixo massa molecular (20-35 kDA) estão

evolutivamente conservadas e encontradas entre vários reinos de organismos (Coleman *et al.*, 2004).

A interação do fator de alongação-1 alfa e actina em eucariotos ligam dois diferentes processos celulares: expressão do gene e organização do citoesqueleto (Gross & kinzy, 2005).

```
      10          20          30          40          50          60
EFEAGISKNG QTREHALLAF TLGVKQLIVG VNKMDSTEPP YNEARRFEEIK KEVSSYIKKI

      70          80          90          100         110         120
GYNPAAVAFV PISGWHGDNM LEPSTKMPWF KGWAIERKEG KADGKCLIEA LDAILPPTRP

     130         140         150         160         170         180
TDKPLRLPLQ DVYKIGGIGT VPVGRVETGV LKPGTVVVFA PVNLTTEVKS VEMHHEALQE

     190         200
AVPGDNVGFN VKNVSVKELR RGYVAGDS
```

Sequência de resíduos de aminoácidos sugere similaridade com a proteína EF-1 α de *Anopheles farauti*. Destacadas com vermelho corresponde a sequência de peptídeos detectados na proteína AdP2 da matriz peritrófica de *Anopheles darlingi*.

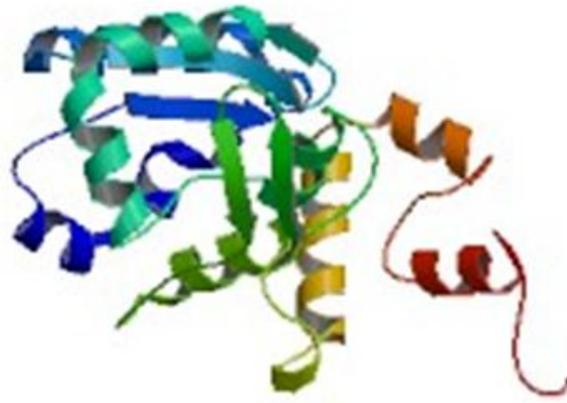


Figura 13 - Estrutura 3D da proteína Fator de Elongação 1 alpha de *Anopheles farauti*.

A proteína Adp6 tem homologia com a AGAP004610, anotada no NCBI para *A. gambiae*, no processo biológico é descrita como uma partícula de reconhecimento de sinal (SRP) é uma partícula citosólica que transitoriamente se liga ao retículo endoplasmático (ER), seqüência de sinal de uma proteína nascente, para a grande unidade ribossomal e o receptor SRP para ER. Apresenta ligação GTPase, Essa proteína apresenta 504 resíduos de aminoácidos, peso molecular 55.991 KDa.

10 20 30 40 50 60
 MVLADLGRKI TNALHSLSKA TIINEEVLDL MLKEICTALL EADVNIRLVK KLRENVRSVI

 70 80 90 100 110 120
 DFDEMAGGLN KRRMIQSAVF KELVKLVDPG VKPYQPIKGR PNVIMFVGLQ GSGKTTTCTK

 130 140 150 160 170 180
 LAYHYQKKNW KSCLVCADTF RAGAYDQIKQ NATKARIPFY GSYTEVDPVT IAQDGVEMFK

 190 200 210 220 230 240
 KEGFEFIIVD TSGRHKQEEES LFEEMLAVAN AVNPDNIIFV MDATIGQACE AQAKAFKEKV

 250 260 270 280 290 300
 DIGSVIITKL DGHAKGGGAL SAVAATNSPI IFIGTGEHID DLEPFKTKPF IS**KLLGMGDI**

 310 320 330 340 350 360
EGLIDKNEL KLDDNEELID KIKHGQFTIR DMYEQFQNIM KMGPFQIMG MIPGFSQDFM

 370 380 390 400 410 420
 TKGGEQESMA RIKRLMTMMD SMSDGELDNK DGAKLFSKQP TRVTRVAQGS GVMEREVRDL

 430 440 450 460 470 480
 ISQYTKFAAV IKKMGGIKGL FKSGDMTKNV NPTQMAKLNQ QMAKMIDPRM FQQMGGMNGL

 490 500
 QNMMRQLQQG AGGLGNLMSG FGK

Sequência de resíduos de aminoácidos sugere similaridade com a proteína AGAP004610-PA de *Anopheles gambiae*. Destacadas com vermelho corresponde a sequência de peptídeos detectados na proteína AdP8 da matriz peritrófica de *Anopheles darlingi*.

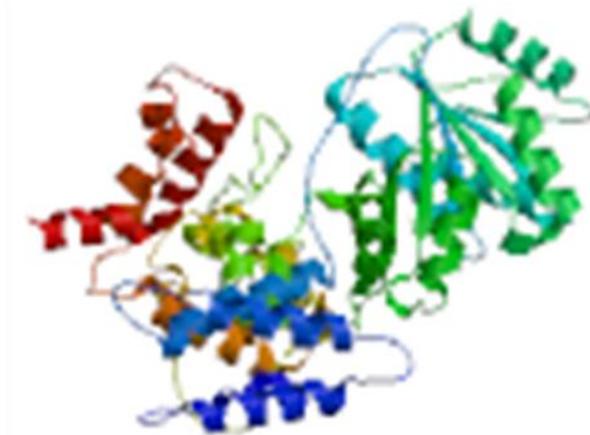


Figura 14. Estrutura 3D da proteína AGAP004610 de *Anopheles gambiae*.

A proteína AdP3 é uma proteína kinase do tipo receptor com repetições ricas em leucina, intimamente associadas com respostas imunes contra os parasitos da malária. Elas estão presentes nos complexos LRIM1 (Leucine-Rich-Immune Molecule 1) e APL1C (*Anopheles Plasmodium*-responsive Leucine-rich repeat protein 1), que conjuntamente com um terceiro fator (TEP1 – thioester-containing protein 1) atuam na morte do parasito invasor, seja por fagocitose, lise ou melanização (Baxter *et al.*, 2010). A identificação desta proteína em uma matriz peritrófica induzida por látex pode indicar que ela seja ativada não somente pela presença do plasmódio, mas sim pela formação da matriz peritrófica.

10	20	30	40	50	60
MRPPTHFGND	ITNTEANGDD	QQNNNNNNNG	GGNGGNNNNN	HADHIVERLT	QMGATINFPK
70	80	90	100	110	120
VAGRGIIRVV	ERCDDAKENN	NLDLSECELI	QVPDAVYHLM	RHTELKTCDL	SSNVITKISP
130	140	150	160	170	180
KFAVKFSLIT	DLNLSHNQMA	RLPDELADLH	SLEMLDISHN	SFITLPAVVF	KMPKLRELKA
190	200	210	220	230	240
NNNAIIDIDR	DEIIASDSLE	LVDLRHNPLT	PMCHDLLKHA	VLSF RIELSE RVKE	DWEDLT

Sequência de resíduos de aminoácidos sugere similaridade com a proteína AGAP002575-PA de *A. gambiae*. Destacadas com vermelho corresponde a sequência de peptídeos detectados na proteína AdP3 da matriz peritrófica de *Anopheles darlingi*.



Figura 15. Estrutura 3D da proteína de AGAP002575 de *Anopheles gambiae*.

As proteínas AdP4 e AdP7 são histonas, ambas são ricas em lisina e tem importante papel na regulação de genes. Geralmente 2 histonas de cada classe agregam-se para formar um nucleossoma, juntamente com o DNA. A presença

destes tipos de proteínas na matriz peritrófica parece ter sido ocasionada por contaminação das células epiteliais adjacentes, no momento da dissecação.

```
      10          20          30          40          50          60
SRSNRAGLQF PVGRIHRLLR KGNYAERVGP GAPVYLAAVM EYLAAEVLEL AGNRARDNKK

      70          80          90         100
ERRIIPRLQL AIRNDEEENK LLRRVTIAQG GVLPNIQAVL LPKRTTE
```

Sequência de resíduos de aminoácidos sugere similaridade com a proteína “Histona 2A” de *Anopheles gambiae*. Destacadas com vermelho corresponde a sequência de peptídeos detectados na proteína AdP4 da matriz peritrófica de *Anopheles darlingi*.

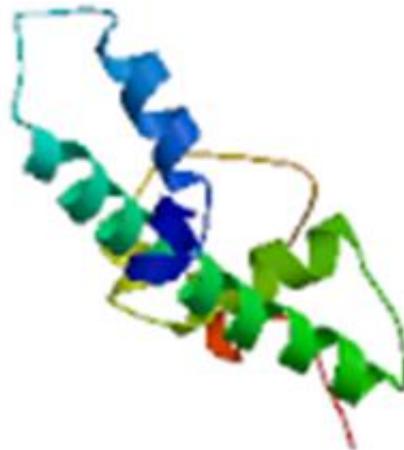


Figura 16. Estrutura em 3D da proteína Histona H2A de *A. gambiae*.

10 20 30 40 50 60
 MAPKTSKGAA KKSGKAQKNI SKSDKKKKRRK TRKESYAIYI YKVLKQVHPD TGISSKAMSI

 70 80 90 100 110 120
 MNSFVNDIFE RIAAEASRLA HYNKRSTITS REIQTAV**RLL LPGELAKHAV** SEGTKAVTKY

 TSSK

Sequência de resíduos de aminoácidos sugere similaridade com a proteína “Histona 2B” de *Anopheles gambiae*. Destacadas com vermelho corresponde a sequência de peptídeos detectados na proteína AdP7 da matriz peritrófica de *Anopheles darlingi*.

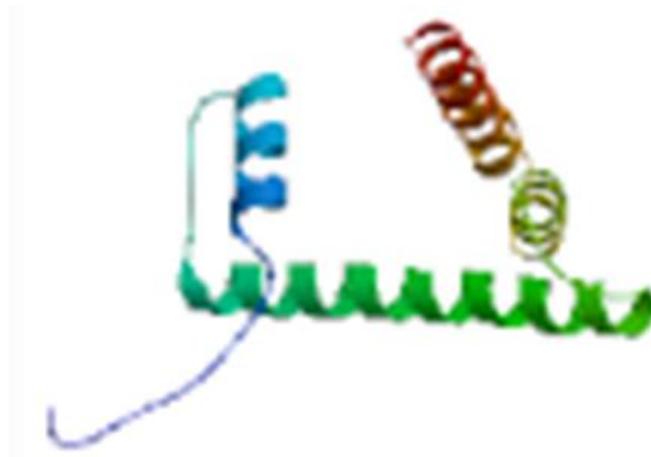


Figura 17. Estrutura em 3D da proteína Histona H2B de *A. gambiae*.

A proteína AdP5 é uma calreticulina que em anofelinos está presente nas células das microvilosidades do intestino médio e agem como moléculas de reconhecimento para o parasito. Possivelmente este tipo de proteína não faz parte da matriz peritrófica. Sua detecção pode ter sido ocasionada também por contaminação oriunda de células epiteliais adjacentes à matriz peritrófica.

```

10      20      30      40      50      60
MRAFVTVLAS ALAIAAVAAE VYFEENFKDD SWQKNWVQSE HKGVEYGKFE YTAGKFFNDA

70      80      90     100     110     120
DADKGIQTSQ DARFYALSSK FKPFTNKDDT LVVQFSVKHE QNIDCGGGYL KVFDCSVDQK

130     140     150     160     170     180
DLHGESP YLL MFGPDICGPG TKKVHVIFSY KGKNHLINKD IRCKDDVFTH FYTLIVRPDN

190     200     210     220     230     240
TYEVLIDNEK VESGSLEDDW DFLPPKKIKD PEAKKPEDWD DRATIPDPDD TKPEDWDKPE

250     260     270     280     290     300
HIPDPDATKP DDWDEMDGE WEPPMIDNPE YKGEWKPKQI DNPAYKGVVW HPEIDNPEYV

310     320     330     340     350     360
EDKTLYLRED ICTVGIDVWQ VKSGTIFDNF LITNDVEVAK KAAATVKATQ EGEKKIKDAQ

370     380     390     400
EAEERKKAAEE EAAAEAAAKD DEDADDEEDD DDNALPGDAT PEDEGHDEL

```

Sequência de resíduos de aminoácidos sugere similaridade com a proteína calreticulina de *Anopheles albimanus*. Destacadas com vermelho corresponde a sequência de peptídeos detectados na proteína AdP5 da matriz peritrófica de *Anopheles darlingi*.



Figura 18. Estrutura em 3D da proteína Calreticulina de *Anopheles albimanus*.

A proteína AdP8 tem similaridade com membro da superfamília de proteínas acetiltransferase lisofosfolipídica (LPLAT).

10	20	30	40	50	60
MGGLQAAWSI	MSMVTLLTPFF	AFLFSIVFMA	SIGKSEFGVRR	LYVNLLVKIF	EFGR QNI ESV
70	80	90	100	110	120
RKQ QFANITQ	SDPEDEDAPT	GDNPSPDAAD	TGDGTGSAKT	NGTLPNGGSH	RYMNGRDTSS
130	140	150	160	170	180
HIANGGNTVI	SRAESLILSP	EMIDDTRSKS	AEPQEEGAGG	AGFKLSNCLD	YVKSGMEAI
190	200	210	220	230	240
EDQVTSRFLA	EELKNWNLLT	RTNRQYEFIS	WRLTVIWMIG	FLIRYFILMP	MRVLCIFIGV
250	260	270	280	290	300
VYCVIGFAFV	GMIPTYRLRR	AMNDIVFKHT	FRMITRSISG	VVRFHHPEYK	PKNCGFCVAN
310	320	330	340	350	360
HTTPIDIAIL	STDCTYSLVI	WTLTCTAVVG	CVPEGSIKRA	LVKNVLIQCF	GFLSSALSSV
370	380	390	400	410	420
VNYHNIQNRP	LNGICVANHT	SPIDVLMMLC	DNCYSLIGQR	HGGFLGVLQR	ALARASPHIW
430	440	450	460	470	480
FERAEAKDRI	LVAKRLKEHV	TDPKNPPILI	FPEGTCINNT	SVMQFKKGSF	EVGGVIYPVA
490	500	510	520	530	540
IKYDPRFGDA	FWNSSRYSMM	QYLFLMMSW	AIVCDVWYLP	PMERQEGESA	IDFANRVKRV
550	560	570	580		
IADQGGLVDL	VWDGQLKRSK	PKKEWKEKQQ	EKFSKLLKGE		

Sequência de resíduos de aminoácidos sugere similaridade com a proteína AGAP002084-PA. Destacadas com vermelho corresponde a sequência de peptídeos detectados na proteína AdP8 da matriz peritrófica de *Anopheles darlingi*.

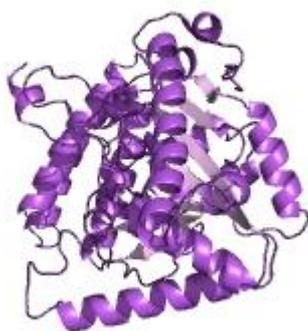


Figura 19. Estrutura em 3D da proteína AGAP002084-PA de *Anopheles gambiae*.

6. CONCLUSÕES

1 – Após todos os procedimentos para a indução experimental da MP **Tipo I** ficou padronizado que as fêmeas a serem utilizadas nos alimentadores necessitam ter pelo menos de 3 a 5 dias e que o período de 10 horas após alimentação é tempo suficiente para a completa formação da MP em adultos.

2 – A padronização da MP **Tipo II** possibilitou verificar que para indução experimental em larvas de *A. darlingi*, com alimentação a base de carvão ativo, necessita do período de uma hora para consolidar a MP e as larvas necessitam ser privadas de alimentação por um período de seis horas.

3 – A solução aquosa de látex foi efetiva na indução da MP **Tipo I**, após alimentação de uma hora, desencadeando o processo de formação da MP pela distensão provocada no intestino interno de *A. darlingi*.

4 – A análise por meio da Espectrometria de Massa, permitiu identificar oito proteínas que estão caracterizadas em diferentes espécies de anofelinos: As proteínas AdP1, AdP4, AdP6, AdP7 e AdP8 foram identificadas como proteínas anotadas em *A. gambiae*, a proteína AdP2 em *Anopheles farauti* e a proteína AdP5 em *Anopheles albimanus*.

5 – As proteínas AdP3 e AdP5, por similaridade das proteínas presentes no banco de dados do NCBI, foram identificadas em *A. gambiae* e *A. albimanus*, respectivamente. Estas proteínas podem fazer parte do epitélio do intestino e estarem envolvidas com a resposta imune contra a ação invasiva do parasito da malária em *A. darlingi*, igualmente ao registrado para *A. gambiae* e *A. albimanus*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.G.; JACOBS-LORENA, M. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34:667–71. 2004.

ANGÊLLA, A. F.; GIL, L. H. S.; SILVA, L. H. P.; RIBOLLA, P. E. M. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Rondônia, Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA. *Mem. do Instituto Oswaldo Cruz* 102(8): 953-8. 2007.

AEBERSOLD, R.; GOODLET, D.R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.*, v.101, p.269-295. 2001.

BALBIANI, E.G. Estudos anatomicos et histologicos sur le tube digestif des *Cryptops*. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 8, 1–82. 1890.

BARRILAS-MURY, C.; KUMAR, S. Plasmodium-mosquito interacciones: a tale of dangerous liaisons. *Cell Microbiol.* 7: 1539-45. 2005.

BAXTER, H.G. R.; STEINERT, S.; CHELLIAH, Y.; VOLOHONSKY, G.; LEVASHINA, A.E.; DEISENHOFER, J. A heterodimeric complex of the LRR proteins LRIM1 and APL1C regulates complement-like immunity in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.107, n.39, p. 16817- 22. 2010.

BILLINGSLEY, P. F.; RUDIN, W. The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *J. parasitol.*, v. 78, p. 430-440. 1992.

BIRON, D. G.; AGNEW, P.; MARCHE, L.; RENAULT, L.; SIDOBRE, C.; MICHALAKIS, Y. Proteoma of *Aedes aegypti* larvae in response to infection by the intracellular parasite *Vavraia culicis*. *International Journal for Parasitology* 35: 1385-1397. 2005.

CAGNEY, G.; AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. *Proteome Sci.*, v.1, p.1-15. 2003.

CASU, R.; EISEMANN C.; PEARSON R.D.; EAST I.; DONALDSON A.; CADOGAN L.; TELLAM R.L. Antibody-mediated inhibition of the growth of larvae from an insect causing cutaneous myiasis in a mammalian host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:8939-8944. 1997.

CASU, R.; PEARSON, R.D., JARMEY, J.M., CADOGAN, L.C., RIDING, G.A. AND TELLAM, R.L. Excretory/secretory chymotrypsin from *Lucilia cuprina*: purification, enzymatic specificity, and amino acid sequence deduced from mRNA. *Insect Mol. Biol.* 3, pp. 201–211. 1994.

CHAPMAN, R.F. *The Insects: Structure and Function*. In Hodder and Stoughton, Hong Kong. 1982.

CLEMENTS, A.N. *The biology of mosquitos sensory reception and behaviour*, vol.2, CABI Publishing, New York. 1999.

COLNAGO, L. A.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE, A. P. Espectrometria de massa e Ressonância magnética nuclear: Resolução no estudo de macromoléculas biológicas. *Química Nova na escola*, vol.16: 9-14. 2002.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora FIOCRUZ, 228p. 1998.

DAS, S.; DIMOPOULOS, G. Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. *BMG Phisiology*.8:23. 2008.

DEANE, L.M. Malaria vectors in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81 (suppl.II): 5-14. 1986.

DEANE, L. M. Malaria studies and control in Brazil. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 38: 223-230. 1988.

DEVENPORT, M.; FUJIOKA, H.; JACOBS-LORENA, M. Storage and secretion of the peritrophic matrix protein Ag-Aper1 and trypsin in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 13 (4): 349-58. 2004.

DEVENPORT, M.; FUJIOKA, H.; DONNELLY-DOMAN, M.; SHEN, Z.; JACOBS-LORENA, M. Storage and secretion of Ag-Aper14, a novel peritrophic matrix protein, and Ag-Muc1 from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Tissue Res.*, 320 (1): 175-185. 2005.

DINGLASAN, R.R.; DEVENPORT, M.; FLORENS, L.; JOHNSON, J.R.; MCHUGH, C.A.; DONNELLY-DOMAN, M.; CARUCCI, D.J.; YATES, J.R.; JACOBS-LORENA, M. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect Biochemistry and Mol. Biol.* 39.125-134. 2009.

DUNLAP, J.P. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96.271-290. 1999

EAST, I.J.; FITZGERALD, H.; PEARSON, R.D.; DONALDSON R.A, VUOCOLO T, CADOGAN L.C, TELLAM R.L, EISEMANN C.H. *Lucilia cuprina*: inhibition of larval growth induced by immunization of host sheep with extracts of larval peritrophic membrane. *Int. J. Parasitol.*, 23: (2): 221-9. 1993.

EDWARDS, M.J.; JACOBS-LORENA, M. Permeability of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Physiology* 46 (2000) 1313-1320. 2000.

EISEMANN, C.H.; BINNINGTON, K.C. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *Int. J. Parasitol.* 24 (1): 15-26. 1994.

ELVIN, C.M.; VUOCOLO, T.; PEARSON, R.D.; EAST, I.J.; RIDING, G.A.; EISEMANN, C.H.; TELLAM, R. Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin- 44, from the larvae of *Lucilia cuprina*. cDNA and deduced amino acid sequences. *J. Biol. Chem.*, 271, 8925-35. 1996.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Ann.Rev. Entomol.* 54: 285-302. 2009.

FARAN, M. E. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXXIV. A revision of the *Albimanus* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contributions of the American Entomological Institute* 15 (7): 1-215. 1980.

FARAN, M.E. & LINTHICUM, K.J. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.*, 13 (1): 01-81. 1981.

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. vol. 1 e 2, São Paulo: EDUSP. 1965.

FORATTINI, O.P. KAKITANI, I.; MASSAD E.; MARUCCI, D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) na anthropic environment. 11 Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles* (*Kerteszia*) in South-Eastern Brazil. *Rev. Saúde Pública*, 30: 309-313. 1996.

FORATTINI, O.P. Culicidologia Médica. Vol.2. São Paulo:EDUSP. 2002.

GORHAM, J.R.; STOJANOVICH, J.C.; SCOTT, H.G. *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica Oriental*. Department of Health, Education, and Welfare Public Health Service. 64 p. 1967.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P.S. Os insetos: um resumo de entomologia. Editora Roca, 3ª Edição. São Paulo. il. 2007.

GUPTA, L.; KUMAR, S.; HAN, Y.S.; PIMENTA, P.F.P.; BARILLAS-MURY, C. Midgut epithelial responses of different mosquito-Plasmodium combinations: The actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:4010-4015. 2005.

GROSS, S. R.; KINZY, T. G. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nature Structural & Molecular Biology*. Volume 12 numero 9, USA. 2005.

HARWOOD, R.F., JAMES, M.T. Entomology in Human and Animal Health. Seventh Edition, *Macmillan Publishing Co.*, Inc. 1979.

HE, N.; BOTELHO, J.M.C., McNALL, R. J.; BELOZEROV, V.; W. DUNN, A., MIZE, ORLANDO R, WILLIS, J. H. Proteomic analysis of cast cuticles from *Anopheles gambiae* by tandem mass spectrometry. *Insect Biochem Mol. Biol.*, **37**:135-146. 2007.

HENZEL, W. J.; BILLECI, T. M.; STULTS, J. T.; WONG, S. C.; GRIMLEY, C.; WATANABE, C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, n. 11, p. 5011-5015. 1993.

IBRAHIM, G.H.; SMARTT, C.T.; KILEY, L.M.; CHRISTENSEN B.M. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30 (12): 1213-22. 2000.

ISHINO, T.; YANO, K.; CHINZEL, Y.; YUDA, M. Cell Passage Activity Is Required For The Malarial Parasite To Cross The Liver Sinusoidal Cell Layer. *Plos Biol.* 2, E4. . 2004.

ISHINO, T.; ORITO, Y.; CHINZEI, Y.; YUDA, M. A calcium-dependent protein kinase regulates Plasmodium Ookinetes Access to the midgut epithelial cell. *Mol. Microbiol.*, 59: 1175-1184. 2006.

JAMES, A. A. Salivary glands of vector mosquitoes. *Bull. Inst. Pasteur*, 92: 133-150. 1994.

JACOBS-LORENA, M.; OO, M. M. In *The Biology of Disease Vectors* (Beaty BJ, Marquardt WC, eds) pp. 318-332, University Press of Colorado, Colorado. 1996.

KATO, N., DASGUPTA, R., SMARTT, C.T., CHRISTENSEN, B.M. Glucosamine: fructose-6-phosphate aminotransferase: gene characterization, chitin biosynthesis and peritrophic matrix formation in *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 11, 207–216. 2002.

KATO, N.; MUELLER, C.R.; FUCHS, J.F.; WESSELY; V.; LAN, Q.; CHRISTENSEN, B.M. 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. 2006.

KLOWDEN, M. Vectors behavior. In: *The Biology of Disease Vectors*. (B.J Beaty & W.C. Marquardt., Eds.), pp.34-50, University Press of Colorado, Colorado, 1996.

KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 27 (11): 887-900. 1997.

KOPKE, A. Proteomics – a new drug discovery tool. Disponível em: <<http://www.witaproteomics.com> - Acesso em: 01 set. 2010. 2003.

LAM, C.T.; CHUN, K.M.R.; LI, K.K.; TO, CHI-HO. Application of proteomic technology in eye research: a mini-review. *Clin. Exp. Optom*; 91:1:23-33. 2008.

LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. Biology of the insect midgut. I- Structure and ultrastructure of the insect midgut. *Chapman & Hall*. 1996.

LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol*, 42: 29-37. 1997.

LIMA, S. S. A. Aspectos básicos do desenvolvimento e da reprodução em laboratório de *Anopheles* neotropicais, vetores de malária. Dissertação do Curso Biologia Parasitária. IOC. RJ. 2009.

MACDONALD, A.J.; BORMAN, A.M. Analyzing biological function with emerging proteomic technologies. *International Congress Series* 1275 . 14–21. 2004.

MANN, M., HENDRICKSON, R.C., PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, v. 70, p.437-473, 2001.

MARCONDES, C. B. Entomologia médica e veterinária. São Paulo: editora *Atheneu*. 59-104. 2001.

MARQUES, A. C; CARDENAS, H. Combate da malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27: (Sup.III) 91-108. 1994.

MEIRELES-FILHO, A.C. Análise funcional comparativa do relógio circadiano de *Drosophila melanogaster* e insetos vetores. Tese do Curso de Biologia Celular e Molecular. IOC. RJ. 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Informe Epidemiológico da Malária. Brasília - Distrito Federal. 2009.

MONTI, M.; ORRU, S.; PAGNOZZI, D.; PUCCI, P. Interaction Proteomics. *Bioscience Reports*, 25: 10540-005-2847. 2005.

MOSKALYK, L.A, OO M.M.; JACOBS-LORENA M. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect. Mol. Biol.*, 5: 261-8. 1996.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov / Acessado em 29/10 a 13/12/2010.

NEVES, D.P. 2005. *Parasitologia Humana*, 11. Ed. Editora Atheneu: São Paulo.

OMS, 2007. Organização Mundial de Saúde – Relatório de 2007 “Um futuro mais seguro: saúde pública global no século XXI. <http://www.portaldasaude.pt/portal/> Acessado em 05/02/09.

PÁSCOA, V.; OLIVEIRA, P.L.; DANSA-PETRETSK, M.; SILVA, J.R.; ALVARENGA, P.H, JACOBS-LORENA, M. LEMOS, F.J. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during food digestion. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 32 (5): 517 – 523. 2002.

PASKEWITZ, S.M., SHI, L. The hemolymph proteome of *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 815–824. 2005.

PERREIRA, K. L. Análise do perfil proteico do intestino médio de machos e fêmeas de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae), em diferentes condições alimentares. Dissertação de Mestrado em Entomologia. INPA/UFAM. Manaus,AM. 2007.

PETERS, W. 1992. Peritrophic membranes. In *Zoophysiology* (Bradshaw D, Burggren W, Heller HC, Ishii S, Langer H, Neuweiller G, Randall DJ, eds.), Vol. 130. Springer-Verlag, Berlin.

PIMENTA P.F.; TOURAY M.; MILLER L. The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J.Eukaryot. Microbiol.*, 41 (6):608-24. 1994.

PIMENTA, A. M. C. Núcleo de Biomoléculas e Laboratório de Venenos e Toxinas animais- Departamento de Bioquímica e Imunologia. *Biologia Molecular – Ciência Hoje*. Vol. 32, nº 192, p 17-22. 2003.

RAMOS A.; MAHOWALD A.; JACOBS-LORENA M. Peritrophic matrix of the black fly *Simulium vitatum*: formation, structure and analysis of its protein components. *J Exp Zool* 268:269–281. 1994.

RICHARDS A.G.; RICHARDS P.A.; The peritrophic membranes of insects. *Annu Rev Entomol* 22:219–240. 1977.

RIEHLE, M.A.; MOREIRA, C.K.; LAMPE, D.; LAUZON, C.; JACOBS-LORENA, M. Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *Int. J. Parasitol.*, In press. 2007.

ROCHA, T.L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N.S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. Comunicado Técnico 136 ISSN 9192-009. Embrapa, Brasília – DF. 2005.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados sétima edição. Roca Editora, Sao Paulo, 1168p. 2005.

SHAHABUDDIN, M.; LEMOS, F.J.; KASLOW, D.C.; JACOBS-LORENA, M. Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsin blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect. Immun.* 64:739-43. 1996.

SHAHABUDDIN, M.; PIMENTA, P.F. *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 95 (7): 3385-9. 1998.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; FUJIOKA, H.; GHOSH, A.; JACOBS-LORENA, M. 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: 947-59. 2005.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 47 (2): 119 – 125. 2001.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; FUJIOKA, H.; GHOSH, A.; JACOBS-LORENA, M. 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.*, v.35, p.947-59. 2005.

SHEN, Z.; EDWARDS, M. J.; JACOBS-LORENA, M. A gut-specific serine protease from the malaria vector *Anopheles gambiae* is down regulated after blood ingestion. *Insect Molecular Biology*, v.9 n.3, p. 223-9. 2000.

SHEN, Z.; JACOBS-LORENA, M. A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. *The Journal Biological Chemistry*, v.273 n. 28, p. 17665-70. 1998.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O.N.; PODTELEJNIKOV, A.V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Largescale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, v.93, p.14440-14445, 1996.

SALAZAR, C.E.; HAMM, D.M.; WESSON, D.M.; BEARD, C.B.; KUMAR, K.; COLLINS, F.H. A cytoskeletal actin gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology.* v.3, n.1, p. 1 – 13. 1994.

SINDEN, R. E. Gametocytes and sexual development. *In Malaria: Parasite biology, pathogenesis and protection*, I. W. Sherman (eds.). *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., p. 25-48. 1998.

SIDEN, R.E.; ALAVI, Y.; RAINE, J.D. Mosquito-malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. *Insect Biochem. Molecular Biology*, v.34, n.7, p. 625-9. 2004

SIDEN-KIAMOS I, ECKER A, NYBACK S, LOUIS C, SIDEN R.E, BILLKER O. *Plasmodium bergeri* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Molecular Microbiology.* v.60, n.6, p. 1355-63. 2006.

SOUZA-SANTOS, R. Distribuição sazonal de vetores da malária em Machadinho d'Oeste, Rondônia, Região Amazônica, Brasil. *Caderno de Saúde Pública.* 18(6): 1813-1818. 2002.

MEIS, J.F.; WISMANS, P.G.; JAP, P.H.; LENSEN, A.H.; PONNUDURAI, T. A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Acta Tropica.* n.50, p.227-36. 1992.

TADEI, W. P. Diferenças cromossômicas entre espécies e populações de *Anopheles*. *Acta Amazônica*, v.10, n. 2, p.369-377. 1980.

TADEI, W. P.; CORREIA, J.M. Biologia de anofelinos Amazônicos. IV. Observações sobre atividade de picar de *Anopheles nuneztovari* Gabaldon (Diptera, Culicidae). *Acta Amazônica*, v.12, n. 1, p.71-74. 1982

TADEI, W. P. MASCARENHAS, B.M; PODESTÁ, M.G. Biologia de anofelinos Amazônicos. VIII. Conhecimentos sobre distribuição de *Anopheles* na região de Tucuuruí-Marabá (Pará). *Acta Amazônica*, v.13, n. 1, p.103-140. 1983

TADEI, W. P.; GENARO, O.; AQUINO, J. S. Manutenção de colônia de *Anopheles* por tentativa de cruzamento natural e artificial. 36^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência e XXX Congresso de Genética. São Paulo. SP. 1984.

TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M.; COSTA, W, L. S.; SCARPASSA, V. M. Biologia de anofelinos Amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.30, p.221-251. 1988.

TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B. Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia Brasileira. *In: Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia*. Ferreira, E. J. G.; Santos, G. M.; Leão, E. L. M.; Oliveira, L. A., (Eds). Vol. 02. Ed.1ª. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. p.167-196. 1993.

TADEI W.P.;THATCHER B.D.; SANTOS J.M.M, SCARPASSA V.M.; RODRIGUES I.B.; RAFAEL M.S. Ecologic observations on Anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. n. 59, p.325-35. 1998.

TADEI, W. P.; DUTARY-THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: of the subgenus *Nyssorhynchus* (1). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, n. 42, p. 87-94. 2000.

TADEI, W. P.; RODRIGUES, I, B.; SANTOS, J. M. M.; RAFAEL, M. S.; PASSOS, R.A.; COSTA, F. M.; PINTO, C.P.; OLIVEIRA, E. M. O papel da entomologia no controle da malária. X Reunião de Malaria. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 40. sup. II. 2007.

TAUIL, P.L. Urbanização e ecologia do dengue. *Caderno de Saúde Pública*. N.17, p. 99-102, 2001.

TELLAM, R.L. The peritrophic matrix. *In: Biology of the Insect Midgut*, ed. MJ Lehane, PF Billingsley, pp. 86–114. London: Chapman & Hall. 1996a

TELLAM, R.L. Protein motifs in filarial chitinases: an alternative view. *Parasitology Today* 12, 291–292. 1996b.

TELLAM, R.L.; WIJFFELS, G.; WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29:87–101. 1999.

TERRA, W.R. Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Ciência e Cultura*, 48: 317-24. 1996.

TERRA, W.R. The Origin and Functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47:47–61. 2001.

TEIXEIRA R.R.; CALÁBRIA, L. K.; ESPINDOLA, F.S. Estudos Proteômicos da Abelha *Apis mellifera* e dos produtos da colméia. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 23, Supplement 1, p. 125-133. 2007.

WAGNER, K.; MILIOTIS, T.; MARKO-VARGA, G.; BISCHOFF, R.; UNGER, K.K. An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. *Analytical Chemistry*, v.74, p.809-820, 2002.

WANG P., GRANADOS R.R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 47: 110-8.2001.

WHO. 2005. [www.worldmalaria-report](http://www.worldmalaria-report.org/). Acessado em 05/02/09.

WHO. 2008. <http://rbm.who.int/wmr2008/pdf>. Acessado em 03/12/2009.

WHO, 2008. <http://www.who.int/malaria/>. Acessado em 03/08/2009.

WHO, 2009. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/MAL2008>. Acessado em 05/08/2009.

WHO, 2010. Roll Back Malaria. Global malaria action Plan: The global strategic. <http://rbm.who.int/gmap/part2.pdf>. Acessado em 03/02/2010.

VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 7ª Edição – Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan. p. 1250-1263. 1983.

VLACHOU, D.; SCHLEGELMILCH, T.; RUNN, E.; MENDES, A.; KAFATOS, C.F. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current Opinion in Genetics & Development*. v.16:384-391. 2006.

