



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Lara D'Alkmin Trombe

**O EFEITO DA INGESTÃO DE VICILINA NA FISIOLOGIA DIGESTIVA DO
MOSQUITO VETOR *Aedes Aegypti***

Florianópolis

2024

Lara D'Alkmin Trombe

**O EFEITO DA INGESTÃO DE VICILINA NA FISIOLOGIA DIGESTIVA DO
MOSQUITO VETOR *Aedes Aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas

Orientador(a): Prof.(a) José Henrique M. de Oliveira, Dr

Coorientador(a): Prof.(a) Carlos Peres Silva, Dr

Florianópolis

2024

Trombe, Lara D'Alkmin

O EFEITO DA INGESTÃO DE VICILINA NA FISIOLOGIA
DIGESTIVA DO MOSQUITO VETOR AEDES AEGYPTI / Lara D'Alkmin
Trombe ; orientador, José Henrique M. de Oliveira,
coorientador, Carlos Peres Silva, 2024.

39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Mosquito vetor. 3. Tripsina.
4. Vicilina . 5. Bioquímica . I. de Oliveira, José
Henrique M.. II. Silva, Carlos Peres. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências
Biológicas. IV. Título.

Lara D'Alkmin Trombe

**O EFEITO DA INGESTÃO DE VICILINA NA FISIOLOGIA DIGESTIVA DO
MOSQUITO VETOR *Aedes Aegypti***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharelado e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 05 de agosto de 2024

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof.(a) José Henrique de Oliveira, Dr.(a)
Orientador(a)

Prof.(a) Luisa D. Rona Pitaluga, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.(a) Mariana Maraschin da Rocha
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024.

À minha família, não teria chegado aqui sem o amor e apoio de vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer minha mãe, meu pai e meu irmão por serem o bem mais precioso que carrego nessa terra, não sei o que eu seria sem vocês. Muito obrigada pelo amor incondicional, por sempre me apoiarem no que seja e incentivarem que eu corra atrás dos meus sonhos numa cidade a 700km de casa. Apesar da saudade ser grande durante os anos, sei que sorriem quando pensam no caminho que estou traçando aqui em Florianópolis e tudo que estou construindo.

À toda minha família também, amo todos vocês, obrigada por todos os momentos de carinho, amor e companheirismo ao longo de toda minha vida.

Aos meus melhores amigos, de curso e de vida, Duda e Jacó. Nossos caminhos se cruzaram no primeiro dia de aula e nunca mais nos separamos, vocês foram a minha grande força durante os anos da faculdade, só nós sabemos tudo que passamos, entre sorrisos e lágrimas, nossa amizade é mais forte por conta disso.

Obrigada por todas as conversas, risadas e amor ao longo dos anos. Vocês foram minha família numa cidade na qual eu não conhecia ninguém, não consigo imaginar mais minha vida sem a alegria que vocês trazem para ela, muito obrigada por fazerem parte dessa jornada e que venham mais conquistas para comemorarmos lado a lado. Todas as alegrias e surpresas que a vida ainda nos guarda quero poder compartilhá-las junto a vocês.

Às meninas da Mansão da Flores, Lívia, Duda e Vitória, éramos todas novas numa cidade desconhecida morando sob o mesmo teto, encontramos companhia e amizade umas nas outras e os anos morando lá se tornaram mais leves e felizes por ter tido a oportunidade de compartilhar tudo isso com vocês. Obrigada por todas as risadas e abraços, amo vocês.

Aos meus colegas de laboratório e bancada, Athina, Diego, Giovana, Mariana, Luci, Luiza e Emili, obrigada pela companhia e todos os conhecimentos compartilhados durante meus anos no laboratório.

Um grande agradecimento ao meu orientador Zé e meu coorientador Carlos por terem me orientado e aconselhado durante a elaboração desse trabalho, vocês me colocaram no caminho para realmente ser uma cientista. Eu não poderia ter pedido por uma orientação melhor e tão enriquecedora quanto a que eu tive, Zé obrigada mais uma vez por todos os ensinamentos, levarei para a vida tudo que aprendi dentro do seu laboratório.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é um inseto extremamente adaptado ao cenário urbano e graças ao hábito hematófago das fêmeas dessa espécie são vetores de arboviroses que acometem o país inteiro. Sabe-se que esse mosquito produz em seu intestino uma camada protetora, conhecida como matriz peritrófica (PM) composta por proteínas, quitina e proteoglicanos e que exerce funções importantes na fisiologia digestiva do mosquito como a proteção contra possíveis patógenos ou toxinas que possam vir a ser ingeridas. Levando em consideração a importância da PM é possível desenvolver estratégias que mexam com a integridade dessa barreira, atrapalhando a fisiologia do vetor, estratégia que pode funcionar como método de controle de doenças que envolvem o *Aedes aegypti* como transmissor, tais como as arboviroses. Nesse estudo foi utilizada uma proteína vegetal chamada vicilina que apresenta propriedades quitino-ligantes. Nossa hipótese é que a vicilina interage com a quitina constituinte da PM do mosquito e, com isso, afete o processo de digestão e absorção de nutrientes, podendo ter um potencial inseticida e possivelmente atuar no controle e manejo de insetos-pragas e vetores de doenças. Foi avaliado a oviposição de fêmeas alimentadas com uma dieta de sangue suplementado com vicilina e também a atividade específica da enzima tripsina, uma enzima proteolítica com papel fundamental na digestão do *Aedes aegypti*, com o objetivo de observar o impacto da vicilina no metabolismo do mosquito. Os resultados sugerem que, nas condições testadas, a vicilina em fêmeas adultas não interfere no processo digestivo e absorção de nutrientes provindos da refeição sanguínea.

Palavras-chave: Arbovírus; Mosquito vetor; Bioquímica; Vitelogênese

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is an insect extremely adapted to the urban environment and, thanks to the hematophagous habit of the females of this species, they are vectors of arboviruses that affect our entire country. It is known that this mosquito produces a protective layer in its intestine, known as peritrophic matrix (PM), composed of proteins, chitin and proteoglycans, which performs important functions in the mosquito's digestive physiology, such as protection against possible pathogens or toxins that may come into contact with the mosquito, through its digestive tract. Taking into account the importance of PM, it is possible to develop strategies that affect the integrity of this barrier, disrupting the physiology of the vector, a strategy that can function as a method of controlling diseases that involve *Aedes aegypti* as a transmitter, such as arboviruses. In this study, a vegetable protein called vicilin was used, which has chitin-binding properties. Our hypothesis is that vicilin interacts with the chitin that constitutes the mosquito's PM and, therefore, affects the process of digestion and absorption of nutrients, indicating potential insecticidal properties and possibly acting in the control and management of insect pests and disease vectors. The oviposition of females fed a blood diet supplemented with vicilin was evaluated, as well as the specific activity of the enzyme trypsin, a proteolytic enzyme with a fundamental role in the digestion of *Aedes aegypti*, with the aim of observing the impact of vicilin on the mosquito's metabolism. The results suggest that, under the conditions tested, vicilin in adult females does not interfere with the digestive process and absorption of nutrients from the blood meal.

Key-words: Arbovirus; Vector mosquito; Biochemistry; Vitellogenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo completo do desenvolvimento do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	15
Figura 2: Esquema das principais arboviroses.....	16
Figura 3: Esquema representativo do aparelho digestivo de insetos.....	17
Figura 4: Esquema das vias de utilização de aminoácidos provindos da alimentação com sangue.....	19
Figura 5: Representação do intestino médio do mosquito após uma alimentação com sangue.....	21
Figura 6: Contagem de ovos após 96 horas da alimentação sanguínea com vicilina 1mg/ml.....	28
Figura 7: Atividade específica da tripsina após 24 horas da alimentação sanguínea.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados do teste estatístico (ANOVA - Kruskal-Wallis).....	30
Tabela 2: Resultados do teste estatístico (Teste de Dunn para comparação múltipla).....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PM	Membrana peritrófica
BAPNA	$N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride
YPP	Proteína precursora de vitelo
SBTI	Inibidor proveniente da soja

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
1.1.	<i>Aedes Aegypti</i>	15
1.2.	DIGESTÃO EM INSETOS HEMATÓFAGOS.....	17
1.3.	A ENZIMA TRIPSINA.....	19
1.4.	A MATRIZ PERITRÓFICA.....	20
1.5.	A PROTEÍNA VICILINA.....	22
2.	OBJETIVO.....	24
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1	CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS.....	24
3.2	ALIMENTAÇÃO COM SANGUE E VICILINA.....	25
3.3	MEDINDO OVIPOSIÇÃO.....	25
3.4	DISSECAÇÃO DE MOSQUITO.....	26
3.5	ENSAIO DE ATIVIDADE DE TRIPSINA.....	26
3.6	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	27
3.7	ESTATÍSTICA.....	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é um inseto da família *Culicidae*, de coloração preta e manchas brancas dispostas pelo corpo e altamente adaptado ao ambiente urbano. Acredita-se que devido às pressões humanas vindas com a destruição dos habitats naturais, talvez uma variação genética desse mosquito teria sofrido algum processo seletivo (Natal, D. 2002). Adaptando-se às áreas alteradas e depois teria encontrado nos aglomerados humanos um ambiente adequado à sua sobrevivência (Christopher, 1960), portanto o mosquito *Aedes aegypti* desenvolveu uma adaptabilidade ao nosso *modus vivendi* (Natal, D. 2002). O ciclo de desenvolvimento do mosquito é dividido em quatro etapas: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Em condições favoráveis como temperatura e quantidade de alimento, geralmente leva uma semana entre o período dos ovos eclodirem em larvas, se transformarem em larvas e posteriormente em mosquitos. Importante pontuar que os ovos possuem a característica de serem resistentes à ressecamento, podendo eclodir larvas meses após sua postura se colocados num ambiente favorável, como locais molhados que propiciem o contato com a água permitindo que o ovo entre em processo de eclosão, isso propicia ao inseto uma grande vantagem evolutiva.

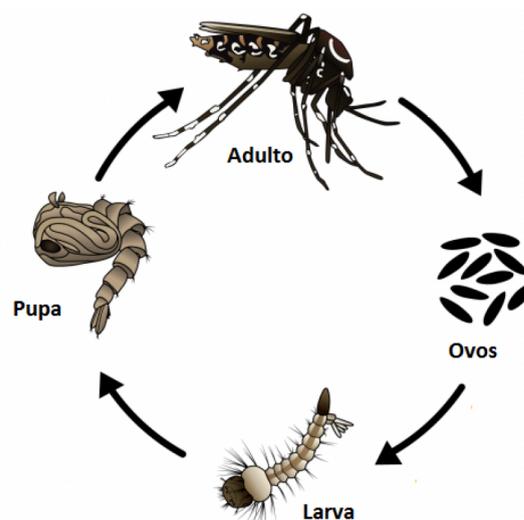


Figura 1: Ciclo completo do desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*, desde a etapa de ovos até a maturação do indivíduo adulto.

Fonte: Adaptado de Fiocruz, 2024.

Quando adultos os machos da espécie apresentam uma dieta baseada somente em compostos açucarados, o que garante nutrientes suficientes para suas atividades metabólicas e fisiológicas, como vôo e acasalamento com fêmeas. Nas fêmeas observamos um comportamento diferente, para que sejam capazes de exercerem suas funções elas procuram seus nutrientes numa dieta hematófaga. Se alimentam de sangue de animais vertebrados que ao ser digerido servirá como fonte de nutriente para suas atividades metabólicas. O comportamento hematófago do mosquito fornece a energia necessária para a maturação dos ovos durante cada ciclo de desenvolvimento dos ovários, chamado de ciclo gonotrófico (Chouin-Carneiro, T. e Santos, F. 2017). Vale lembrar que as fêmeas também podem se alimentar de compostos açucarados, caso necessário, mas a taxa nutritiva que recebem somente com esses é menor do que a alimentação com sangue e não fornece energia suficiente para a ovogênese. Para que ocorra o desenvolvimento dos ovos é necessário que haja alimentação com sangue e essa necessidade de sangue para a maturação dos ovários faz da maioria dos mosquitos dependentes do contato com algum hospedeiro vertebrado (Natal, D. 2002).

Devido seus hábitos hematófagos, o mosquito *Aedes aegypti* é um vetor biológico e grande representante na transmissão de arbovírus, como Dengue, Zika e Chikungunya. Arboviroses são doenças na qual o vírus é transmitido principalmente por artrópodes com padrões hematófagos, como mosquitos e carrapatos, são capazes de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, desde humanos até animais como aves (Higgs, S. e Beary, B. J. 2004) (Figura 2).

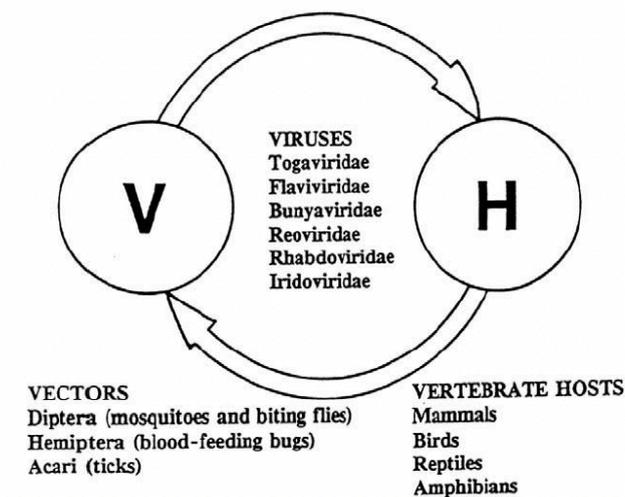


Figura 2: Esquema das principais arboviroses, assim como os principais vetores e hospedeiros e simples representação de como seria o ciclo de transmissão.

Fonte: Livro *Biology of disease vectors*, cap. 14, p. 168. Higgs, S. e Beary, B.J., 2004.

Dengue e Zika são arbovírus transmitidas por mosquitos do gênero *Aedes*, atualmente não existe vacina para o Zika, e para Dengue temos uma vacina, de primeira geração, com um perfil de segurança aceitável mas que ainda necessita de mais estudos para investigar sua eficácia a longo prazo e em grupos populacionais diferentes (Pereira, T. S., et al. 2024). O controle do mosquito vetor é a única medida disponível para reduzir o impacto negativo na sociedade causado pelas arboviroses (Wilson et al., 2020). Portanto, é de interesse geral saber mais como se dá os processos biológicos da digestão de sangue do *A. aegypti*, já que esse também seria o período de infecção do mosquito com os arbovírus, para que a partir disso, seja possível pensar em estratégias para moderar esse crescimento de arboviroses no Brasil.

1.2 Digestão em insetos hematófagos

O principal sítio de digestão e absorção em insetos na maior parte das espécies é o intestino médio. Este se constitui num tubo simples (ventrículo) de onde podem se expandir divertículos (cecos gástricos) usualmente na sua extremidade proximal (Silva, C. P., et al. 2012). Essa porção do aparelho digestivo contém uma membrana conhecida como membrana peritrófica, que se forma após a refeição e envolve o bolo alimentar.

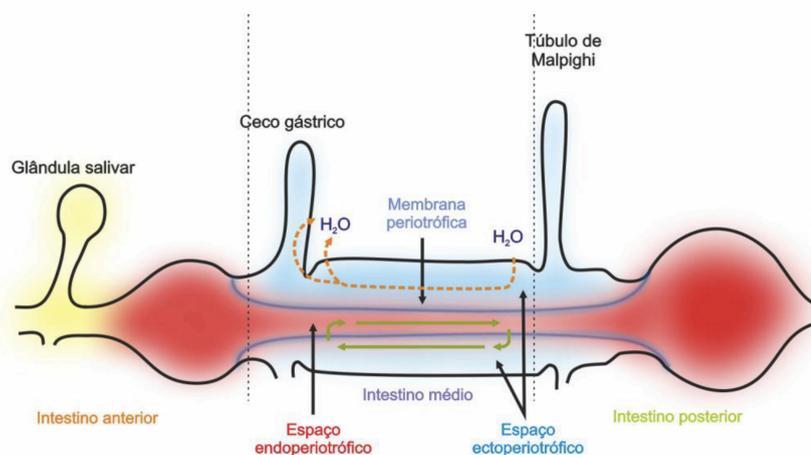


Figura 3: Esquema representativo do aparelho digestivo de insetos.

Fonte: Livro *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, cap. 5. Silva, C. P., et al. 2012.

Assim que o animal se alimenta, se inicia uma cascata de eventos para que o sangue seja transformado em fonte de nutrientes e o remanescente não digerido e não aproveitado ou até mesmo tóxico seja excretado (Romoser, 1996).

O sangue é considerado um alimento de alta taxa nutritiva para esses animais pois é constituído basicamente por proteínas como: hemoglobina, albumina entre outras, também possui carboidratos e lipídeos em menor concentração. As fêmeas da espécie utilizam o sangue como fonte essencial dos aminoácidos necessários para a maturação de ovos (Silva, C. P., et al. 2012). Os aminoácidos, carboidratos e lipídeos também irão atuar como fonte de energia para que essas fêmeas consigam passar por esse processo de oviposição (Wells, M. e Pennington, J., 2004). O processo digestivo ocorre na porção do intestino médio.

A digestão do sangue começa com a hidrólise do conteúdo do bolo alimentar decorrente da ação de inúmeras enzimas digestivas secretadas após a ingestão do alimento (proteases, carboxilases e lipases) que, juntamente com as proteínas transportadoras, são fundamentais para a absorção de nutrientes (Santiago et al., 2017; Talyuli et al. 2021).

A mesma pode ser dividida em 4 etapas, primeiro temos a remoção do excesso de água do sangue alimentado, após ocorre a hemólise, a quebra das macromoléculas liberadas pelas hemácias com o auxílio de inúmeras enzimas digestivas e por fim a absorção dos nutrientes resultantes da digestão (Romoser, 1996).

A hemólise é um passo fundamental desse processo já que nela estão contidas basicamente a grande maioria das proteínas e nutrientes importantes para o metabolismo do mosquito. Acredita-se que a tripsina possa exercer algum papel, além do já conhecido, na etapa da hemólise (Romoser, 1996). Na digestão estão envolvidas inúmeras enzimas endopeptidases, responsáveis por quebrarem macromoléculas em moléculas capazes de serem absorvidas, como a tripsina que participa da porção inicial da digestão do sangue, durante a digestão intermediária observamos a ação de aminopeptidases e carboxipeptidases (Terra e Ferreira 1994, Romoser 1996).

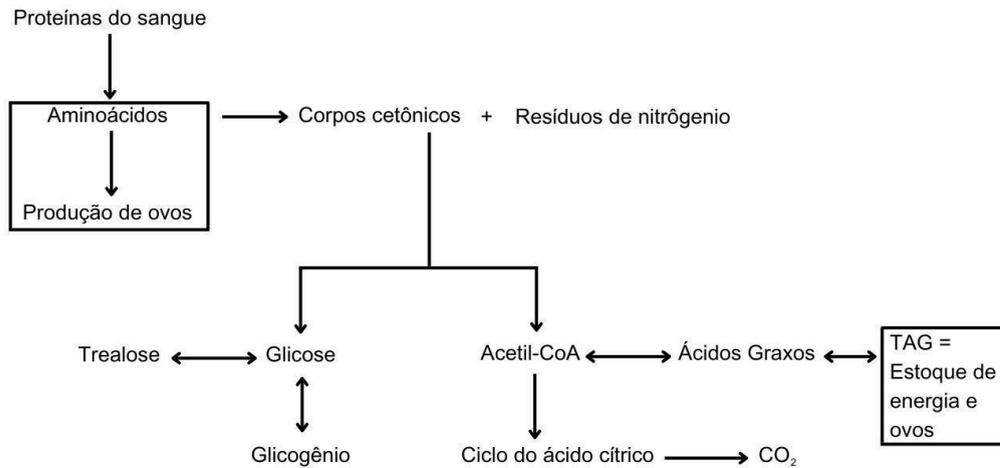


Figura 4: Esquema das vias de utilização de aminoácidos providos da alimentação com sangue.

Fonte: Adaptação do Livro *Biology of disease vectors*, cap. 23, p. 312. Wells, M., Scaraffia, P. e Zhou G., 2004)

Uma parte dos α -cetoácidos providos da desaminação de aminoácidos podem ser usados na via lipídica da produção de ovos e outra porção na produção de energia, esses também podem participar da síntese de reserva energética (lipídeos ou glicogênio + trealose) da fêmea (Wells, M., Scaraffia, P. e Zhou G., 2004).

1.3 A enzima tripsina

A tripsina é uma serino protease, que são enzimas que contém um resíduo de serina em seu sítio ativo, portanto esse resíduo que irá desempenhar o mecanismo de ação nessas enzimas (Nelson, D. L. e Cox, M. M. 2014). Essas apresentam preferência por clivar o lado carboxila de dois aminoácidos: a arginina e a lisina (Terra, W.R. et al. 1996). Esta protease é a principal responsável pela digestão inicial do sangue no *Aedes aegypti*, seu pico de atividade é geralmente observado 24 horas depois da alimentação (Lu, S.J. et al. 2006) e retornam ao seu nível basal depois de 60 horas pós alimentação (Nuss, A.B. e Gulia-Nuss, M. 2023).

Em fêmeas *Aedes aegypti* a transcrição de tripsina é bifásica (Lu, S.J. et al. 2006), ou seja, ela é dividida entre fase precoce, que ocorre entre 1-3 horas pós refeição sanguíneas, e fase tardia, que ocorre 8-36 horas pós refeição sanguínea

(Felix, C.R. et al. 1991). Durante esse processo, diferentes tripsinas são transcritas em diferentes quantidades no intestino médio após a alimentação (Santiago et al. 2017). O grupo das tripsinas precoces é expresso logo após a alimentação e diminui 8 horas após a ingestão de sangue (Lu, S.J. et al. 2006). O grupo de tripsinas tardias começa a ser expresso em grande quantidade entre 8-10 horas pós refeição, acredita-se que esse segundo grupo seja responsável por grande parte do processo digestivo (Noriega, F., et al. 1996). É interessante pensar que esse sistema bifásico de expressão de tripsina permite com que o mosquito avalie se a produção de tripsinas tardias é realmente necessária para aquela refeição, via produção de tripsinas precoces. Se houver uma refeição na qual a taxa proteica é muito baixa, ou uma disponibilidade insignificante de nutrientes não haverá expressão e síntese de tripsinas tardias (Wells, M. e Noriega, F., 1999), já que essa protease em grande quantidade pode ser prejudicial para fisiologia do mosquito (Barrilas-Mury, C.V., Noriega, F. e Wells, M. 1995). Em mosquitos alimentados com compostos açucarados também é observado a expressão de tripsina no processo de digestão (Silva, C. P. et al. 2012).

Num estudo de Venâncio e cols. (2009) foi proposto que seria possível existir mais oito possíveis tripsinas que atuariam durante a alimentação por sangue no intestino médio do *Aedes aegypti*, o processo de digestão de mosquitos ainda se mostra ser algo bem complexo (Silva, C. P., et al. 2012) e ainda se tem um longo caminho a ser traçado quando se trata desse assunto.

1.4 A matriz peritrófica

Nos mosquitos, em seu intestino, após uma alimentação é possível observar a presença de uma camada de compostos que irá separar o bolo alimentar das células do intestino médio do animal (Richards e Richards, 1977; Peters 1992; Miller e Lehane 1993), chamada de matriz ou membrana peritrófica. O tipo 1 de PM é produzido pelas células do intestino médio, que são induzidas a secretar essa 'barreira' em insetos hematófagos quando acontece uma alimentação sanguínea (Jacobs-Lorena and Oo, 1996; Tellam et al., 1999).

A membrana peritrófica é composta majoritariamente por proteínas, quitina e proteoglicanos. Ela irá separar o trato do intestino médio em três compartimentos (Figura 5), o espaço ectoperitrófico (espaço entre a PM e o epitélio do intestino médio), o espaço endoperitrófico (espaço contendo o bolo alimentar no lúmen do inseto) e a membrana em si (Hegedus, D. et al. 2009).

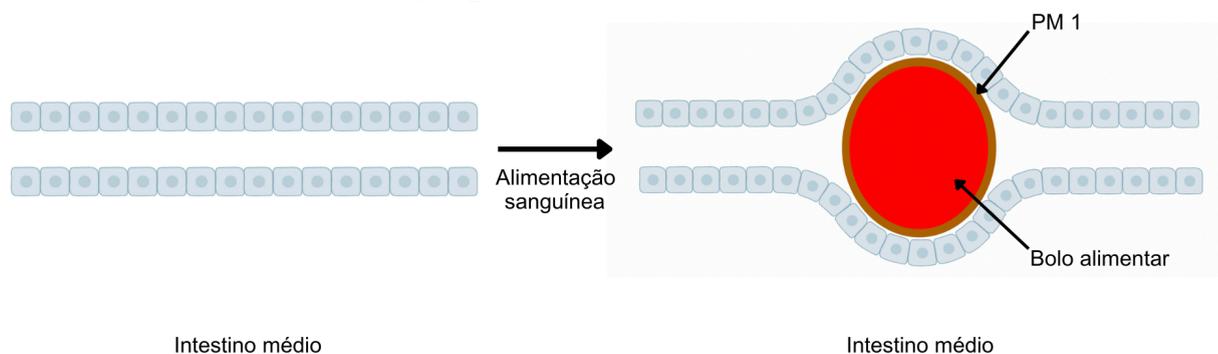


Figura 5: Representação do intestino médio do mosquito após uma alimentação com sangue.

Fonte: Adaptação do Livro *Biology of disease vectors*, cap. 22, p. 298. Jacobs-Lorena, M. e Devenport, M., 2004)

A PM apresenta certa porosidade, portanto as macromoléculas (proteínas, lipídeos e carboidratos) que iniciam no espaço endoperitrófico são parcialmente digeridas, pelas endopeptidases, em peptídeos, açúcares e ácidos graxos e são transportadas para o espaço ectoperitrófico para que a digestão se conclua. Acredita-se que essa descontinuidade na degradação dos nutrientes, causada pela PM, traga um certo aumento na eficiência do processo digestivo (Tellam, R. L. 1996).

Outra função atribuída à membrana peritrófica é proteger o intestino do inseto contra possíveis toxinas que possam ser ingeridas pelo animal. Um exemplo é depois de uma alimentação sanguínea, a hemoglobina quebrada no processo de digestão libera a molécula heme, essa por sua vez pode acabar gerando moléculas reativas e tóxicas para o organismo, se permanecer livre no intestino. Portanto, a PM irá se ligar a heme para que ela seja excretada e não prejudique o metabolismo do mosquito (Pascoa et al. 2002, Jacobs-Lorena, M. e Devenport, M., 2004 e Hegedus, D. et al. 2009).

A PM também atua como uma barreira protetora entre o conteúdo no lúmen e os tecidos do mosquito (Tellam, R. L. 1996). Essa barreira pode proteger o intestino médio tanto de componentes no alimento que possam vir a afetar negativamente o animal (Hegedus, D. et al. 2009) quanto contra a infecção de vírus, bactérias ou

parasitas. Os poros da membrana são muito pequenos e na maioria das vezes não permitem a locomoção desses microorganismos para o espaço ectoperitrófico (Tellam, R. L. 1996). Sabe-se que interferências na membrana peritrófica refletem diretamente no acesso de microorganismo e toxinas externas ao intestino médio do mosquito (Hegedus, D. et al. 2009).

O intestino é o primeiro ponto de comunicação entre mosquito e patógeno, por isso acaba por exercer grande influência sob a competência vetorial do inseto (Taracena-Agarwal, M. L., et al. 2024).

1.5 A proteína vicilina

A vicilina é uma proteína de reserva, do tipo globulina 7S, recebem essa denominação por conta do seu coeficiente de sedimentação (Shutov et al., 1995), de múltiplas subunidades, encontrada principalmente nas sementes de leguminosas.

Sua principal função é fornecer aminoácidos essenciais para o crescimento do embrião e desenvolvimento da planta.

Além dessas funções, ao longo dos anos foram descobertas outras possíveis ações realizadas pela vicilina, como por exemplo atividade inseticida (Macedo et al., 1993; Mota et al., 2003; Paes et al., 2008; Oliveira et al., 2014; Kunz et al., 2017), envolvimento em processos de dessecação/re-hidratação (Bäumlein et al., 1995; Shutov et al., 1998), atividade de ligação de sacarose (Braun et al., 1996) e atividade antimicrobiana (Gomes et al., 1997; Marcus et al., 1999; Ng, 2004; Manners, 2007; Monteiro et al., 2015).

Sabe-se que a vicilina atua como inseticida não somente em insetos adaptados ao consumo de feijões como os carunchos *C. maculatus*, mas também a insetos não-adaptados como as larvas de broca de cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Mota et al., 2003) e as larvas do verme-de-trigo *Tenebrio molitor* (Paes et al., 2008) se ligando a membrana peritrófica deles e conseqüentemente dificultando seu desenvolvimento. A proteína aparenta ter propriedades quitino-ligantes e como citado anteriormente a quitina representa uma grande parte da composição das membranas peritróficas de insetos, portanto, esses estudos evidenciam que em insetos não-adaptados à ingestão de vicilina também impacta negativamente o seu organismo, e seu mecanismo de ação pode ser parecido com os de lectinas, anticorpos e outros compostos quitino-ligantes como a heveína, uma

cisteíno-protease encontrada em seringueiras (*Hevea brasiliensis*) (Loo et al. 2022) e as quitinases (Wang and Granados, 2001).

Visto os efeitos inseticidas em insetos não-adaptados, a vicilina apresenta o potencial de atuar no controle e manejo de insetos-pragas e vetores de doenças tanto em humanos quanto em animais, como o mosquito *Aedes aegypti*, um inseto de hábitos hematófagos e produtor de membrana peritrófica após a ingestão de alimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os possíveis efeitos tóxicos da proteína vegetal vicilina na fisiologia digestiva do mosquito *Aedes aegypti*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da vicilina em parâmetros da história de vida de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* tais como fertilidade.
- Avaliar o efeito da vicilina na fisiologia digestiva (cinética de digestão e formação da matriz peritrófica) de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue suplementado com vicilina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Criação dos mosquitos

Os mosquitos *A. aegypti* foram criados em incubadoras isoladas no laboratório como detalhado em Oliveira et al., 2011 e de acordo com padrões internacionais estabelecidos pela comunidade de biologia de vetores (Gerberg, 1970). Adultos e larvas foram mantidos em fotoperíodo 12h claro: 12h escuro, a aproximadamente 70-80% de umidade do ar e temperatura de 27°C. Uma solução de sacarose 10% foi oferecida “*ad libitum*” aos adultos. Os ovos foram eclodidos em bandejas de plástico contendo água filtrada e as larvas alimentadas com ração de cachorro triturada. Assim que as larvas se tornam pupas foram transferidas para gaiolas dentro de copos descartáveis de 50ml onde permanecem por até 48 horas,

sendo esse o período esperado de metamorfose para a emergência do indivíduo adulto. Junto as pupas foi colocado outro copo descartável contendo algodão umedecido com solução sacarose 10% para que os mosquitos se alimentassem.

Todos os mosquitos usados nos experimentos foram fêmeas entre 3 e 10 dias de vida.

3.2 Alimentação com sangue e vicilina

Os mosquitos foram separados em duas gaiolas, uma foi reservada para a alimentação com sangue e a outra para a alimentação de sangue suplementado com vicilina 1mg/ml. Foi preparado um banho maria para que a água que passasse pelos alimentadores artificiais ficasse numa temperatura de 37°C. O grupo alimentado com sangue, foi suplementado com 10µl de ATP (1mM), um fagoestimulante utilizado para atrair os mosquitos a consumirem o sangue disponibilizado (Dutra H. L. C. et al., 2017). Já para o segundo grupo o sangue foi suplementado com 10µl de ATP (1mM) e 20µl de vicilina 50mg/ml. Os dois grupos foram alimentados com 1ml de sangue humano. Os mosquitos são deixados em jejum por 16h-24h antes da alimentação.

Após a preparação dos sangues, eles serão oferecidos utilizando um alimentador artificial de vidro aquecido por água a 37°C. Os animais ficam comendo por pelo menos 1 hora, para otimizar a alimentação cobrimos a gaiola com saco de plástico preto.

3.3 Medindo oviposição

Para medirmos a oviposição foram selecionadas 7 fêmeas totalmente ingurgitadas de ambos os grupos e colocadas em gaiolas individuais juntamente com um copo descartável contendo uma fita de papel filtro e o máximo de água filtrada dentro para que as fêmeas realizem a postura dos ovos. Foi oferecido *ad libitum* uma solução de sacarose 10% para que os mosquitos se alimentassem. Após 5 dias, retiramos a fita com os ovos já postos e a deixamos secar num recipiente por mais 1 dia separado, passado esse período foi realizada a contagem do número de ovos que foram colocados no papel filtro utilizando um estereoscópio.

3.4 Dissecação de mosquito

Os mosquitos foram dissecados 24 horas após a alimentação, foi retirado o epitélio do intestino médio dos animais. Primeiramente, os mosquitos foram colocados no freezer por cerca de 1-2 minutos para os adormecer, facilitando o manuseio dos animais sem que haja perigo de escape, e então foram transferidos para placas de petri sobre gelo,. A dissecação foi feita em etanol 50% com o auxílio de pinças entomológicas e um estereoscópio. Assim que dissecados, os epitélios foram lavados em PBS e transferidos para um tubo contendo 200 μ l de tampão fosfato de sódio 200mM, pH 7,5. Foram dissecados 30 epitélios de cada grupo alimentado, esses 30 epitélios foram divididos em 3 pools diferentes de 10 epitélio, portanto para cada epitélio temos 20 μ l de tampão fosfato 200mM. No final da dissecação teremos 60 epitélios, 30 de mosquitos alimentados apenas com sangue que são divididos em 3 tubos contendo 10 epitélios dissecados e 30 de mosquitos alimentados com uma solução de sangue e vicilina 1mg/ml na mesma disposição que o outro grupo.

3.5 Ensaio enzimático da Tripsina

Numa placa de ELISA com 96 poços utilizamos 11 desses poços para fazer a curva padrão com p-nitroanilina numa diluição seriada de 0,02mM - 0,2mM, em todos eles o volume final foi de 100 μ l. Em outro poço é feito o branco do substrato contendo 50 μ l de tampão fosfato de sódio 200mM, pH 7,5 e 50 μ l de substrato, com o intuito de ser nosso controle para corrigir quaisquer interferências na leitura que não seja causada pela atividade enzimática. No ensaio é utilizado o substrato Bapna 4mM, esse nos foi fornecido pelo professor Carlos Peres do Departamento de Bioquímica da UFSC, o restante dos poços contém os seis grupos de amostras utilizamos 50 μ l de amostra bruta, em estimativa seriam 2,5 epitélios por poço, e 50 μ l de substrato. A análise das amostras é feita em triplicata técnica. A placa então é lida numa leitora de ELISA, em um comprimento de onda de 405nm.

3.6 Determinação de proteínas

Para a determinação de proteína total nas amostras utilizamos o método de Bradford (1976), usando a proteína albumina sérica bovina (BSA) para a construção da curva padrão.

3.7 Estatística

Para os cálculos direcionados à atividade específica da tripsina foi feita uma regressão linear simples com $p < 0,0001$ e as construções dos gráficos foram geradas com o auxílio do programa GraphPad Prism em sua versão 9.0.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maturação dos ovários e formação dos ovos do *Aedes aegypti* está diretamente ligada à alimentação sanguínea (Eldridge, B. 2004). Utilizando os nutrientes provindos da alimentação sanguínea, a proteína precursora de vitelo (YPP) é sintetizada. Ela é responsável por acumular e reservar nutrientes como aminoácidos para o desenvolvimento dos oócitos, processo que compõem a vitelogênese (Raikhel, A. 2004). Os nutrientes necessários para esse processo, são adquiridos através da digestão do sangue de vertebrados, como aminoácidos, lipídeos e carboidratos. Esses nutrientes, são transportados para o corpo gorduroso do mosquito, uma vez lá, esses aminoácidos absorvidos são metabolizados em YPPs e então levados para os oócitos, localizados nos ovários (Pinch, M. et al. 2021).

Em decorrência do papel fundamental que o sangue exerce para o processo de vitelogênese, decidimos alimentar mosquitos com uma solução de sangue e vicilina 50 mg/ml a fim de observar se a proteína causaria algum efeito negativo no organismo do inseto. Se essa hipótese estivesse correta, a presença de vicilina afetaria diretamente a oviposição do animal. Logo, se a vicilina interferisse de algum jeito na absorção de nutrientes durante a digestão esperaríamos observar uma queda na quantidade de ovos postos pelo mosquito. Uma deficiência na taxa de absorção supostamente causada pela interação bioquímica entre a vicilina e a PM

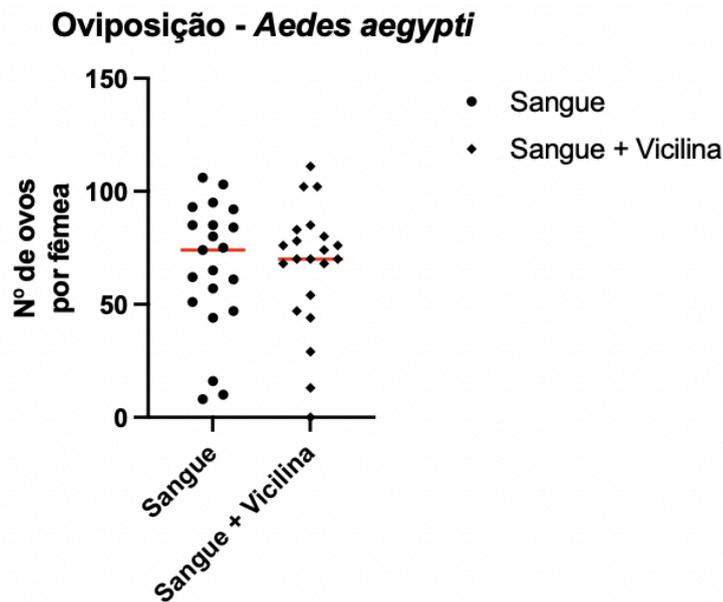
do animal significaria menos nutrientes disponíveis para serem absorvidos e realocados no processo de vitelogênese.

Aos serem alimentados, os mosquitos separados em gaiolas individuais, permaneceram por 96 horas em função da oviposição, visto que a reserva de proteínas e lipídeos nos oócitos começam geralmente 48 horas após uma alimentação sanguínea (Troy et al., 1975). Ao final desse período se espera que o processo de oviposição tenha acabado. E então a contagem dos ovos postos no papel filtro, previamente colocado dentro da gaiola, foi feita. Não foi observada uma diferença significativa entre o grupo de mosquitos alimentado com sua dieta normal, somente sangue, e o grupo de mosquitos alimentados por uma dieta suplementada com vicilina (Figura 6).

Uma fêmea bem alimentada e saudável geralmente costuma produzir cerca de 100 - 150 ovos por alimentação (Eldridge, B. 2004), em nosso experimento as fêmeas alimentadas somente com sangue apresentaram uma média de 74 ovos postos, e as suplementadas com a proteína vicilina tiveram uma média de 70 ovos. Apesar de existir uma pequena diferença entre o número de ovos postos pelos dois grupos isso provavelmente não representa uma grande mudança no metabolismo do inseto pois se era esperado que a oviposição diminuísse drasticamente já que, em teoria, a vicilina por ser uma quitino-ligase se ligaria a PM e criaria uma 'barreira' entre o espaço endo e ectoperitrófico impossibilitando o fluxo de moléculas entre os dois.

Se o fluxo de nutrientes provindos da digestão é interrompido o mosquito teria disponível para usar na produção de ovos uma quantidade consideravelmente menor de nutriente, ou seja, o número de ovos cairia consideravelmente o que nos leva a acreditar que a vicilina não apresenta nenhum obstáculo para a obtenção de nutrientes vindos da digestão.

Figura 6: Contagem de ovos após 96 horas da alimentação sanguínea suplementada com vicilina 1mg/ml.



Legenda: O símbolo do círculo representa o grupo controle positivo, Sangue, o símbolo diamante representa o grupo de estudo, Sangue + Vicilina. A linha vermelha representa a média. Cada símbolo representado na figura equivale a quantidade de ovos postos por uma fêmea adulta.

A quitina é um composto importante da membrana peritrófica, quando secretada no intestino médio do mosquito ela se organiza em fibras fornecendo um esqueleto para que proteínas e outros componentes se liguem dando força e estrutura para a membrana (Jacobs-Lorena, M. e Devenport, M., 2004 e Hegedus, D., Toprak, U. e Erlandson, M. 2019). Graças ao seu envolvimento crucial na digestão de inseto e defesa contra a ingestão de possíveis patógenos, a membrana peritrófica é um excelente alvo para controle e manejo de insetos-pragas já foram desenvolvidos alguns estudos que por meio de compostos produzidos em vegetais atuaram de alguma maneira como 'entupidores' da membrana peritrófica, inclusive estudos envolvendo a proteína vicilina. Como mecanismo de defesa as plantas às vezes sintetizam compostos que contém propriedade de quitino-ligase e quando estes interagem com a quitina da membrana peritrófica do inseto acabam por interferir na absorção de nutrientes (Yunes, A. et al. 1998), larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Diatraea saccharalis* quando oferecidas com uma dieta suplementada com vicilina apresentam uma queda na taxa de sobrevivência (Sales, M. P. et al. 2001; Mota et al., 2003; Uchôa, A. et al. 2006; Souza, S. et al. 2010). Nos estudos

citados, as concentrações de vicilina usadas na alimentação eram maiores do que a utilizada neste trabalho, talvez seja necessário rever a concentração escolhida. Pode-se pensar que se uma concentração maior, ou até mesmo parecida com a destes estudos fosse aplicada em trabalhos futuros a vicilina possa vir a apresentar efeitos negativos na fisiologia digestiva do mosquito.

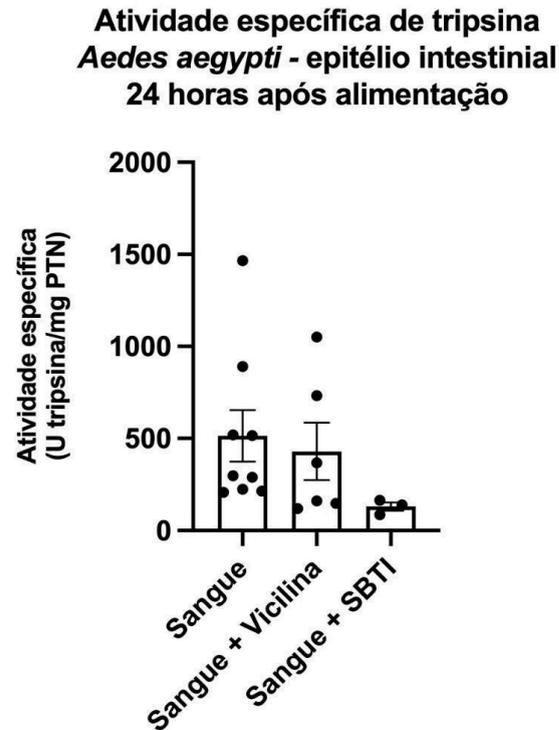
Portanto pensando nas propriedades químicas da proteína vicilina e papel importante que a membrana peritrófica exerce durante a digestão do mosquito *Aedes aegypti*, foi realizado um estudo para medir a atividade específica da enzima tripsina, uma das enzimas mais importantes para o processo de digestão do mosquito.

A permeabilidade da PM é importante para manter o fluxo de moléculas, uma vez que, as enzimas digestivas precisam ser capazes de transitar livremente, chegar ao bolo alimentar para a degradação das macromoléculas e os produtos da digestão precisam sofrer difusão para alcançarem as células epiteliais do intestino médio e serem absorvidos (Jacobs-Lorena, M. e Devenport, M., 2004). Uma forte ligação entre uma quitino-ligase como a vicilina e a quitina constituída na membrana apresenta ser uma ameaça para esse fluxo dinâmico.

A fim de observar se a vicilina atrapalha o fluxo de tripsina e sua atuação durante a digestão, mosquitos *Aedes aegypti* foram alimentados com sangue e vicilina 1mg/ml na qual se alimentaram até ficarem completamente ingurgitadas e 24 horas após a alimentação, durante o pico de ação da tripsina (Lu, S.J. et al. 2006), foi realizada a dissecação dos epitélios intestinais. Esses, foram macerados com um pistilo de vidro 125µl e as amostras submetidas a testes enzimáticos-colorimétricos, utilizando o substrato específico BAPNA 4 mg/mL e ensaio de Bradford para a determinação total de proteínas e normalização da atividade específica.

Ao analisar os resultados não é visível nenhuma queda significativa entre o grupo alimentado com uma dieta normal de sangue e o alimentado com sangue suplementado com vicilina. Como pode ser observado no grupo que foi alimentado com um sangue suplementado com 1mg de SBTI, um inibidor conhecido de tripsina extraído da soja (Figura 7), nos indicando que a vicilina não age de nenhuma forma como inibidora da enzima tripsina e provavelmente também não apresenta nenhuma interferência em seu fluxo pela membrana peritrófica já que a tripsina é uma enzima tanto endoperitrófica quanto ectoperitrófica portanto atuará durante todo processo de digestão.

Figura 7: Atividade específica da tripsina após 24 horas da alimentação sanguínea. Foram feitas replicatas biológicas e técnicas do experimento, duas para o grupo sangue + vicilina e uma para o grupo SBTI, o grupo de sangue por ser nosso controle positivo esteve presente em todas as três rodadas de experimentos.



Legenda: Cada símbolo representado na figura equivale a uma amostra contendo 10 epitélios de intestino de *Aedes aegypti*.

Tabela 1: Resultados do teste estatístico (ANOVA - Kruskal-Wallis)

Table Analyzed	atividade específica tripsina
Kruskal-Wallis test	
P value	0.0500
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No

Tabela 2: Resultados do teste estatístico (Teste de Dunn para comparação múltipla)

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Sangue vs. Sangue + SBTI	8.444	No	ns	0.0530
Sangue vs. Sangue + Vicilina	2.611	No	ns	>0.9999
Sangue + SBTI vs. Sangue + Vicilina	-5.833	No	ns	0.3668

Legenda: As tabelas detalham os testes estatísticos a fim de verificar se os resultados apresentam significância estatística.

Como os estudos que analisam o efeito inseticida da vicilina foram realizados em larvas talvez o metabolismo e processo de digestão de um indivíduo adulto seja mais complexo e consiga reverter de alguma maneira o possível efeito negativo que a proteína exerce sob a PM, pode-se especular também que por termos trabalhado com fêmeas adultas seja necessário administrar concentração mais alta de vicilina na alimentação com sangue por se tratar de um indivíduo mais desenvolvido e maduro. Além disso acredito que seja de interesse geral investigar se a vicilina afetaria de alguma forma as larvas do *Aedes aegypti*, por já se ter conhecimento que larvas de outros insetos são efetivamente prejudicadas pela ingestão de vicilina, provavelmente veríamos efeitos similares no desenvolvimento das larvas do mosquito por se tratar de ser uma fase mais inicial e vulnerável do inseto na qual muitos mecanismos de defesa ainda estão se desenvolvendo.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se portanto que a vicilina não apresentou capacidade de bloqueio da atividade de tripsina e redução na postura de ovos em *Aedes aegypti*. Esses resultados sugerem que a vicilina não altera a permeabilidade da PM de *Aedes aegypti*.

Logo, a proteína vicilina, nas condições experimentais testadas, não é uma alternativa eficaz para interferir na fisiologia de digestão do mosquito *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS

Barillas-Mury, C.V., Graf, R., Hagedorn, H.H., Wells, M., 1991. cDNA and deduced amino acid sequence of a blood meal-induced trypsin from the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry** v. 21, 825–831.

Barillas-Mury CV, Noriega FG, Wells MA. Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol**. 1995;25(2):241–6.

Bäumlein, H., Braun, H., Kakhovskaya, I.A. and Shutov, A.D., 1995. Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. **Journal of Molecular Evolution** v. 41, 1070-1075.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 72, 248-254.

Braun, H., Horstmann, C., Bäumlein, H, 1996. A vicilin-like seed protein of cycads: similarity to sucrose-binding proteins. **Plant Molecular Biology** v. 31, 35-44.

Christophers, S.R. *Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. **Cambridge University Press**, 1960.

BRUCE, F. E. Mosquitoes, The Culicidae. *In*: MARCQUARDT, W, C. **Biology of Disease Vectors**. 2a edição. p. 95-111. 2004.

CHOUIN-CARNEIRO T., SANTOS F. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: the role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. *In*: Shields VDC, editor. **Biological control of pest and vector insects**. London: IntechOpen; 2017. p. 231-255.

Delsio, Natal. (2002). Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**. v. 64.

Devenport, M. e Jacobs-Lorena, M. The Peritrophic Matrix of Hematophagous Insects *In*: MARCQUARDT, W, C. **Biology of Disease Vectors**. 2a edição. p. 297-310. 2004.

Dutra, H.L.C., Rodrigues, S.L., Mansur, S.B. *et al*. Development and physiological effects of an artificial diet for *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* . **Sci Rep** 7, 15687 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16045-6>

Felix CR, Betschart B, Billingsley PF, Freyvogel TA. Post-feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera, Culicidae) is separable into 2 cellular phases. **Insect Biochem**. 1991;21:197–203.

Gerberg, 1970. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Bull. Am. Mosq. Control Assoc. 5, 1–109.

Gomes, V.M., Mosqueda, M.-I., Blanco-Labra, Sales, A.M.P., Fernandes, K.V.S., Cordeiro, R.A., Xavier-Filho, J., 1997. Vicilin storage protein from *Vigna unguiculata* (legume) seeds inhibit fungal growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 45, 4110-4115.

Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, 285–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090559>

Hegedus, D. D., Toprak, U., & Erlandson, M. (2019). Peritrophic matrix formation. In **Journal of Insect Physiology** (Vol. 117). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103898>

Higgs, S. e Beary, B. J. Natural Cycles of Vector-Borne Pathogens *In*: MARCQUARDT, W, C. **Biology of Disease Vectors**. 2a edição. p. 167-185. 2004.

Kunz, D., Oliveira, G.B., Uchôa, A.F., Samuels, R.I., Macedo, M.L.R., Silva, C.P., 2017. Receptor mediated endocytosis of vicilin in *Callosobruchus maculatus*

(Coleoptera: Chrysomelidae) larval midgut epithelial cells. **Comparative Biochemistry and Physiology** 210B, 39-47.

Loo Shining , Tay Stephanie V. , Kam Antony , Lee Warren , Tam James P. Hololectin Interdomain Linker Determines Asparaginyl Endopeptidase-Mediated Maturation of Antifungal Hevein-Like Peptides in Oats. **Frontiers in Plant Science**. v.13. 2022. doi: 10.3389/fpls.2022.899740

Lu SJ, Pennington JE, Stonehouse AR, Mobula MM, Wells MA. Reevaluation of the role of early trypsin activity in the transcriptional activation of the late trypsin gene in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol**. 2006 Apr;36(4):336-43. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.01.011. Epub 2006 Jan 19. PMID: 16551547.

Macedo, M.L.R., Andrade, L.B.S, Moraes, R.A., Xavier-Filho, J., 1993. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology** 105C, 88-94.

Manners, J.M., 2007. Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes. **Genome Biology** 8:225.

Marcus, J.P.; Goulter, K.C.; Manners, J.M., 2008. Peptide fragments from plant vicilins expressed in *Escherichia coli* exhibit antimicrobial activity in vitro. **Plant Molecular Biology Reporter** v. 26, 75–87.

Miller, N., Lehane, M.J., 1993. Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors. **Parasitol. Today** v. 9, 45-50.

Moskalyk L.A., Oo M.M., Jacobs-Lorena M. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Mol Biol**. 1996 Nov;5(4):261-8. doi: 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00100.x. PMID: 8933177.

Monteiro, S., Carreira, A., Freitas, R., Pinheiro, A. M., & Ferreira, R. B. (2015). A Nontoxic Polypeptide Oligomer with a Fungicide Potency under Agricultural Conditions Which Is Equal or Greater than That of Their Chemical Counterparts. **PLOS ONE**, 10(4), e0122095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122095>

Mota, A.C., DaMatta, R.A., Lima-Filho, M., Silva, C.P., Xavier-Filho, J., 2003. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). **Journal of Insect Physiology** v. 49, 873-880.

Nelson, D. L. e Cox, M. M. Enzimas. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6a edição. p. 189-241. 2014.

Ng, T.B., 2004. Antifungal proteins and peptides of leguminous and nonleguminous origins. **Peptides** v. 25, 1215-1222.

Noriega FG, Wang XY, Pennington JE, Barillas-Mury CV, Wells MA. Early trypsin, a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, aminoterminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. **Insect Biochem Mol Biol**. 1996;26(2):119–26.135.

Noriega, F. G., & Wells, M. A. (1999). A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, 45(7), 613–620. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00052-9)

Nuss AB, Gulia-Nuss M. Trypsin, the Major Proteolytic Enzyme for Blood Digestion in the Mosquito Midgut. **Cold Spring Harb Protoc**. 2023 Apr 3;2023(4):pdb.top107656. doi: 10.1101/pdb.top107656. PMID: 36787964.

Oliveira, G.B., Kunz, D., Peres, T.V., Leal, R.B., Uchôa, A.F., Samuels, R.I., Macedo, M.L.R., Carlini, C.R., Ribeiro, A.F., Grangeiro T.B., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Silva,

C.P., 2014. Variant vicilins from a resistant *Vigna unguiculata* lineage (IT81D-1053) accumulate inside *Callosobruchus maculatus* larval midgut epithelium. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 168, 45–52.

Paes, E.V., Uchôa, A.F., Pinto, M.S.T., Silva, C.P., Fernandes, K.V.S., Oliveira, A.E.A., Xavier-Filho, J., 2008. Binding of *Vigna unguiculata* vicilins to the peritrophic membrane of *Tenebrio molitor* affects larval development. **Entomology Experimentalis et Applicata** v. 129, 11–17.

Pascoa, V., Oliveira, P.L., Dansa-Petretski, M., Silva, J.R., Alvarenga, P.H., Jacobs-Lorena, M., Lemos, F.J.A., 2002. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 32, 517-523.

Pereira, T. S., Sampaio, M. P. N., de Freitas, I. A., Arruda, P. A. V. M., Almeida, R. de A., Cerqueira, J. K. M., da Silva, C. A., & Milki, M. V. (2024). NOVA VACINA DA DENGUE, O QUE JÁ SABEMOS SOBRE ELA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 28, 103787. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2024.103787>

Pennington, J. e Wells, M. The Adult Midgut: Structure and Function *In*: MARCQUARDT, W, C. **Biology of Disease Vectors**. 2a edição. p. 3289-295. 2004.

Peters, W., 1992. Peritrophic membranes. Bradshaw e cols. **Zoophysiology**, Springer-Verlag, Berlim v. 30, 1a.. edição, p. 238.

Pinch, M., Mitra, S., Rodriguez, S. D., Li, Y., Kandel, Y., Dungan, B., Holguin, F. O., Attardo, G. M., & Hansen, I. A. (2021). Fat and Happy: Profiling Mosquito Fat Body Lipid Storage and Composition Post-blood Meal. **Frontiers in Insect Science**, v. 1. <https://doi.org/10.3389/finsc.2021.693168>

Raikhell, A. Vitellogenesis of Disease Vectors, From Physiology to Genes *In*: MARCQUARDT, W, C. **Biology of Disease Vectors**. 2a edição. p. 329-346. 2004.

Richards, A.G., Richards, P.A., 1977. The peritrophic membranes of Insects. **Ann. Rev. Entomol.** v. 22, 219-240.

Rosomer, W. The Vector Alimentary System *In: B. J. BEATY, MARCQUARDT, W, C. Biology of Disease Vectors.* 1a. edição. p. 298-317. 1996.

Sales, M. P., Pimenta, P. P., Paes, N. S., Grossi-De-Sá, M. F., & Xavier-Filho, J. (2001). Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **In Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (Vol. 34, Issue 1).

Santiago PB, de Araújo CN, Motta FN, Praça YR, Charneau S, Bastos IM, Santana JM. Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity - a review. **Parasit Vectors.** 2017 Feb 13;10(1):79. doi: 10.1186/s13071-017-2005-z. PMID: 28193252; PMCID: PMC5307778.

Shutov, A.D., Kakhovskaya, I.A., Braun, H., Bäumllein, H., Müntz, K., 1995. Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene. **Journal of Molecular Evolution** **41**, 1057–1069.

Shutov, A.D., Braun, H., Chesnokov, Y.V., Bäumllein, H., 1998. A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. Evolutionary pathway of seed storage globulins. **European Journal of Biochemistry** v. 252, 79-89.

Silva, C. P., José, F., Lemos, A., & Roberto Da Silva, J. *Digestão em Insetos. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular* p. 1-32. 2012.

Souza, S. M., Uchôa, A. F., Silva, J. R., Samuels, R. I., Oliveira, A. E. A., Oliveira, E. M., Linhares, R. T., Alexandre, D., & Silva, C. P. (2010). The fate of vicilins, 7S storage globulins, in larvae and adult *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:

Chrysomelidae: Bruchinae). **Journal of Insect Physiology**, v. 56(9), 1130–1138. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.009>

Taracena-Agarwal, M.L., Hixson, B., Nandakumar, S. *et al.* The midgut epithelium of mosquitoes adjusts cell proliferation and endoreplication to respond to physiological challenges. **BMC Biol** **22**, 22 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01769-x>

Talyuli OAC, Bottino-Rojas V, Polycarpo CR, Oliveira PL, Paiva-Silva GO. Non-immune Traits Triggered by Blood Intake Impact Vectorial Competence. **Front Physiol.** 2021 Mar 2;12:638033. doi: 10.3389/fphys.2021.638033. PMID: 33737885; PMCID: PMC7960658.

Tellam, R.L., 1996. The peritrophic matrix. MJ Lehane, PF Billingsley, **Biology of the insect midgut**. 1a. edição. London, Chapman & Hall, 86-114.

Tellam, Ross & Wijffels, Gene & Willadsen, Peter. (1999). Peritrophic matrix proteins. **Insect biochemistry and molecular biology**. v. 29. 87-101. 10.1016/S0965-1748(98)00123-4.

Terra, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. **Ann. Rev.. Entomol.** v. 35, 181-200.

Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.** B 109, 1-62.

Troy, S., Anderson, W.A., Spielman, A., 1975. Lipid content of maturing ovaries of *Aedes aegypti*. **Comp. Biochem. Physiol.** 50B, 457–461.

Uchôa, A. F., DaMatta, R. A., Retamal, C. A., Albuquerque-Cunha, J. M., Souza, S. M., Samuels, R. I., Silva, C. P., & Xavier-Filho, J. (2006). Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:

Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 52(2), 169–178.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.10.002>

Venancio, T.M., Cristofolletti, P.T., Ferreira, C., Verjovski-Almeida, S., Terra, W.R., 2009. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. **Insect Mol. Biol.** v. 18, 33–44.

Wilson, A.L., 2020. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases, **PLoS Neglected Tropical Diseases**. doi:10.1371/journal.pntd.0007831.

Wang, P., Granados, R.R., 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** v. 47, 110–118.

Yunes, N. A., Tereza de Andrade, M., Sales, cio P., Morais, R. A., Valevski Fernandes, tia S., & Gomes, V. M. (1998). Legume Seed Vicilins Storage Proteins) (7S Interfere with the Development of the Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus* (F)). In **J Sci Food Agric** (Vol. 76).

Zhou, G., Scaraffia, P. e Wells, M. Vector Nutrition and Energy Metabolism *In*: MARCQUARDT, W, C. **Biology of Disease Vectors**. 2a edição. p. 311-315. 2004.