

MECANISMOS ANTIOXIDANTES EM *Aedes aegypti*: INTERAÇÃO DA
HEMOGLOBINA COM A MATRIZ PERITRÓFICA E PROTEÔMICA DE
LARVAS E ADULTOS EXPOSTOS AO GRUPO PROSTÉTICO HEME

KARLA BARRETO DA SILVA OROZIMBO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES- RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO 2024

MECANISMOS ANTIOXIDANTES EM *Aedes aegypti*: INTERAÇÃO DA
HEMOGLOBINA COM A MATRIZ PERITRÓFICA E PROTEÔMICA DE
LARVAS E ADULTOS EXPOSTOS AO GRUPO PROSTÉTICO HEME

KARLA BARRETO DA SILVA OROZIMBO

Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutora em Biociências e
Biotecnologia

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ ALVES LEMOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES- RIO DE JANEIRO

DEZEMBRO 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

074

Orozimbo, Karla Barreto da Silva.

MECANISMOS ANTIOXIDANTES EM *Aedes aegypti* : INTERAÇÃO DA HEMOGLOBINA COM A MATRIZ PERITRÓFICA E PROTEÔMICA DE LARVAS E ADULTOS EXPOSTOS AO GRUPO PROSTÉTICO HEME. / Karla Barreto da Silva Orozimbo. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

113 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: Francisco Jose Alves Lemos.

1. *Aedes aegypti*. 2. matriz peritrófica. 3. hemoglobina. 4. estresse oxidativo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

MECANISMOS ANTIOXIDANTES EM *Aedes aegypti*: INTERAÇÃO DA
HEMOGLOBINA COM A MATRIZ PERITRÓFICA E PROTEÔMICA DE LARVAS E
ADULTOS EXPOSTOS AO GRUPO PROSTÉTICO HEME

KARLA BARRETO DA SILVA OROZIMBO

Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutora em Biociências e
Biotecnologia

Aprovada em 19/12/2024

Comissão examinadora

Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo - UENF

Dr. Gerson Adriano Silva - UENF

Dr. José Roberto Silva - UFRJ

Dr. Francisco José Alves Lemos - UENF (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por guiar meus passos e minha vida, sempre com muito amor e cuidado nos mínimos detalhes, sendo meu suporte e sustento nos momentos de angústia e o abraço perfeito que me proporciona alegria.

Ao professor Dr. Francisco José Alves Lemos, pelos ensinamentos, paciência e por compartilhar seus conhecimentos comigo, sempre me orientando da melhor forma possível. Ao amigo Franzé, pelo suporte emocional ao longo desses anos.

Aos membros da banca, Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo, Dr. Gerson Adriano Silva e Dr. José Roberto Silva, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

À UENF, pela estrutura; ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia (PPGGBB), pela oportunidade de realizar o curso com todo o apoio científico e institucional; à FAPERJ e à CAPES, pelo financiamento dos projetos que possibilitaram o desenvolvimento da pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. E aos Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), pelo suporte financeiro.

À secretaria do PPGGBB; aos professores do Programa de Pós-Graduação, pelo conhecimento transmitido; e aos professores, técnicos, alunos e pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia (LBT). Aos companheiros do insetário, pelo compartilhamento de conhecimentos e pelo apoio emocional.

Aos amigos que a UENF me trouxe, à técnica Rivea, Jucélia, Beatriz e tantos outros, pelos ensinamentos, pelo suporte acadêmico, pelo apoio nos momentos difíceis e pelas risadas nos momentos felizes. À amiga e irmã Raquel de Souza, por todo o suporte emocional e acadêmico. Você me ensina muito em todos os sentidos, sou grata a Deus pela sua vida.

À minha mãe, Amarilda Campista, por não medir esforços para cuidar de mim, me dando suporte para que eu pudesse trilhar minha vida e minha jornada acadêmica; às minhas irmãs, Kariny e Kamila Barreto, pelo suporte emocional; ao meu amigo Rafael, pelo apoio acadêmico e emocional e por aceitar revisar minha tese.

Ao meu esposo, Mateus Orozimbo, e ao meu filho, Paulo Barreto, por me apoiarem em tudo que preciso, sempre com muito amor e cuidado. Os dias difíceis se tornam mais leves com vocês. Sem vocês, eu não teria a menor chance de passar por tudo isso.

Gratidão a todos que, de alguma forma, me auxiliaram a dar mais um passo nessa longa caminhada.

Nunca foi sobre onde se chega, mas sim sobre o caminho percorrido, as pessoas que nos acompanham nesse percurso e a maneira como caminhamos. Gratidão Senhor.

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. Revisão bibliográfica.....	15
1.1. O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	15
1.2. Digestão sanguínea e o intestino médio de <i>A. aegypti</i>	16
1.3. A matriz peritrófica.....	18
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
Referências.....	21
Capítulo I – Análise Estrutural e Funcional da Ligação da Hemoglobina à Matriz Peritrófica Durante a Digestão Sanguínea em <i>Aedes aegypti</i>	24
Abstract.....	26
1. Introduction.....	27
2. Material and Methods.....	30
2.1. Mosquitoes and Colony Maintenance.....	30
2.2. Feeding of Mosquitoes.....	30
2.3 Dissection <i>A. aegypti</i> Midgut and Processing of Peritrophic Matrices	31
2.4. Immunofluorescence Microscopy	31
2.5. Affinity Chromatography of Bovine Hemoglobin and Hemin with Chitin.....	32
2.6. Computational approach for structural modeling and blind docking of Bovine Hemoglobin subunits with the oligosaccharide (NAG) ₄	33
2.7. Extraction and quantification of peritrophic matrix proteins from <i>A. aegypti</i>	34
2.8. Electrophoresis, Detection of Peroxidase Activity, and Protein Quantification by Densitometry.....	35
2.9. Amino-terminal sequencing of the majority PM proteins	36
3. Results.....	37

3.1. Dynamic Visualization of Midgut Morphology During Digestion in <i>A. aegypti</i>	37
3.2. Protein Profiling of the Peritrophic Matrix in Blood-Fed Mosquitoes.....	37
3.3. Comparative Analysis of Peritrophic Matrix Proteins and Bovine Hemoglobin: Structural and Sequence Insights	38
3.4. Visualization of Hemoglobin-Chitin Interaction in the Peritrophic Matrix via Immunofluorescence Microscopy	39
3.5. Affinity Chromatography Profiles of Chitin with Bovine Hemoglobin and Hemin	39
3.6. Computational Insights into the Binding of Bovine Hemoglobin Subunits with (NAG) ₄ Oligosaccharide: Structural Modeling and Docking Analysis.....	40
3.7. Temporal Dynamics of Hemoglobin Association and Peroxidase Activity in the Peritrophic Matrix of <i>A. aegypti</i> During Blood Digestion.....	40
3.8. Comparative Analysis of Luminal and Peritrophic Matrix-Associated Hemoglobin Degradation During Blood Digestion in <i>A. aegypti</i>	42
3.9. Proteolytic Regulation of Heme Protein with <i>A. aegypti</i> Peritrophic Matrix: A Comparative SDS-PAGE Analysis	43
3.10. Analysis of Heme Protein Binding to <i>A. aegypti</i> Peritrophic Matrix by SDS-PAGE...	44
4. Discussion	46
5. Conclusions	49
6. References	50
Supplementary material	61
Capítulo II- Proteômica de larvas e mosquitos <i>A. aegypti</i> expostos ao grupo prostético heme.....	65
1. Introdução	66
1.1. Estresse Oxidativo em Insetos.....	66
1.2. Estresse Oxidativo e os Impactos na Biologia dos Mosquitos.....	67
1.3. Adaptações Antioxidantes de Insetos Hematófagos.....	68
1.4. Avanço da Proteômica e o estudo do mosquito	70
2. Objetivo Geral.....	73
2.1. Objetivos Específicos	73

3. Materiais e métodos.....	74
3.1. Mosquitos e manutenção de colônias	74
3.2. Alimentação de mosquitos	74
3.3. Proteômica.....	75
3.3.2. Cromatografia Líquida.....	75
3.3.3. Espectrometria de Massas	76
3.3.4. Análise de Bioinformática.....	76
4. Resultados	77
5. Discussão	95
6. Conclusões	98
Referências.....	99
Dados Suplementares	103

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figure 1. Temporal analysis of <i>A. aegypti</i> midgut morphology during blood digestion by optical microscopy.....	54
Figure 2. SDS-PAGE analysis of sequential protein extraction from <i>A. aegypti</i> peritrophic matrix (PM) using solutions with varying extraction efficiencies.....	55
Figure 3. Tricine-SDS-PAGE analysis of sequential proteins extracted from peritrophic matrix of <i>A. aegypti</i> using solutions with varying extraction efficiencies.....	55
Figure 4. Analysis of <i>A. aegypti</i> peritrophic matrix (PM) proteins and comercial bovine hemoglobin by electrophoresis.....	56
Figure 5. Visualization of hemoglobin-peritrophic matrix interaction in <i>A. aegypti</i> after 24h of artificial feeding (plasma + hemoglobin, 70 mg/mL) using epifluorescence microscopy.	57
Figure 6. Analysis of chitin binding properties of hemoglobin and hemin using affinity chromatography.	58
Figure 7. Molecular docking demonstrating the possible molecular interactions between bovine hemoglobina (golden color) and the oligosaccharide (NAG) ₄ (blue-green color) using DockThor v.2 software.	58
Figure 8. Analysis of hemoglobin binding and peroxidase activity in <i>A. aegypti</i> peritrophic matrix during blood digestion.....	59
Figure 9. Comparative analysis of hemoglobin degradation in luminal content and peritrophic matrix during blood digestion by SDS-PAGE (15%).	59
Figure 10. Temporal analysis of proteolytic effects on hemoglobin binding to <i>Aedes aegypti</i> peritrophic matrix. Proteins were separated by 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue.....	60
Figure 11. Protein binding analysis of heme and non-heme proteins to <i>A. aegypti</i> peritrophic matrix by SDS-PAGE. Proteins were separated on 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue.....	60

Supplementary material

Figure S 1. Western blotting of proteins extracted from adult <i>A. aegypti</i> PM and revealed with an antibody against human hemoglobina.....	61
Figure S 2. Confocal fluorescence microscopy sequential optical sections showing the spatial distribution of hemoglobin and chitin (24h blood feeding).....	61
Figure S 3. Visualization of peritrophic matrix (PM) in <i>A. aegypti</i> midgut 24 hours after artificial feeding (plasma + albumin, 70 mg/mL) using epifluorescence microscopy....	62
Figure S 4. Densitometric analysis of hemoglobin bands associated with the <i>A. aegypti</i> peritrophic matrix.	63
Figure S 5. Densitometric analysis of luminal and PM-associated hemoglobin during blood digestion in <i>A. aegypti</i>	64
Figure S 6. Densitometric analysis of hemoglobina (14 kDa) associated with perittrophic matrix under diferente treatments.....	64

CAPÍTULO 2

Figura 1. Gráfico de Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil proteômico de larvas e mosquitos adultos tratados com 10 mM de heme e seus respectivos controles.	78
Figura 2. Dados comparativos da expressão proteica de larvas e mosquitos tratados com heme 10 mM em comparação aos grupos controle.....	78
Figura 3. Expressão diferencial de proteínas em larvas e mosquitos adultos.	80
Figura 4. Proteínas coincidentes de larvas e adultos de <i>A. aegypti</i> tratados com heme 10 mM.	94

Índice de tabelas

Tabela 1. Relação das proteínas, e suas respectivas categorias funcionais, das regiões do heatmap que mostram uma expressão proteica mais expressivas em larvas.....	81
Tabela 2. Categorias funcionais das proteínas de larvas de <i>A. aegypti</i> com expressão aumentada após tratamento com heme. 10 mM.	83
Tabela 3. Proteínas de <i>A. aegypti</i> que foram expressas unicamente, e agrupadas por seu grupo funcional, nas larvas com tratadas com hemina 10 mM.	84
Tabela 4. Categorias funcionais das proteínas de larvas de <i>A. aegypti</i> com expressão diminuída após tratamento com heme 10 mM.	85
Tabela 5. Proteínas de <i>A. aegypti</i> e seus grupos funcionais que foram expressas unicamente, agrupadas por seu grupo funcional, nas larvas controle.....	88
Tabela 6. Categorias funcionais das proteínas de adultos <i>A. aegypti</i> com expressão aumentada após tratamento com hemina 10 mM.	90
Tabela 7. Proteínas de <i>A. aegypti</i> que foram expressas unicamente, agrupadas por seu grupo funcional, nos adultos tratados com hemina 10 mM.	92
Tabela 8. Proteínas de <i>A. aegypti</i> que foram expressas unicamente, agrupadas por seu grupo funcional, nos adultos controle.....	93

Material suplementar

Gráfico S 1.Efeito do tratamento com hemina na sobrevivência de larvas de mosquito.	103
Tabela S 2. Proteínas de larvas de <i>A. aegypti</i> que foram mais expressas após tratamento com heme 10 mM.	103
Tabela S 3. Proteínas de larvas de <i>A. aegypti</i> que foram menos expressas após tratamento com heme 10 mM.	104
Tabela S 4. Proteínas de adultos de <i>A. aegypti</i> que foram mais expressas após tratamento com heme 10 mM.	110

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de doenças virais como dengue, chikungunya e Zika, representando um grave problema de saúde pública. Apesar de essencial para a reprodução, a alimentação sanguínea impõe desafios fisiológicos significativos, especialmente durante a digestão. A proteólise da hemoglobina, a proteína mais abundante no sangue, libera grandes quantidades de heme, uma molécula altamente pró-oxidante, no lúmen intestinal. Para mitigar os efeitos tóxicos do heme, os mosquitos desenvolveram mecanismos antioxidantes especializados, incluindo a formação da matriz peritrófica (MP), uma estrutura formada durante a digestão sanguínea que desempenha um papel crucial ao se ligar ao heme livre e reduzir sua toxicidade. Este estudo investigou a interação entre a hemoglobina e a MP em *A. aegypti*. Por meio de técnicas eletroforéticas, confirmamos a associação da hemoglobina à MP. Observamos que, no início do processo digestivo, parte da hemoglobina liberada pela lise das hemácias se liga à MP em formação. À medida que a atividade proteolítica aumenta, o heme livre, derivado da degradação da hemoglobina, torna-se o principal componente associado à MP. Além disso, experimentos demonstraram o papel protetor da MP contra a proteólise excessiva da hemoglobina. Os resultados também revelaram que a hemoglobina se liga fortemente à MP, de forma semelhante às peritrofinas, principais proteínas estruturais dessa matriz. Através de microscopia de fluorescência, verificamos a sobreposição da marcação da hemoglobina e da quitina ao longo da MP em mosquitos alimentados com sangue ou artificialmente com plasma suplementado com hemoglobina. A interação entre hemoglobina e quitina foi confirmada por cromatografia de afinidade, enquanto estudos de docking molecular evidenciaram ligações promissoras entre as subunidades alfa e beta da hemoglobina e o oligossacarídeo (NAG)₄ da quitina. Adicionalmente, realizamos uma análise proteômica de larvas e mosquitos adultos expostos ao heme na concentração de 10 mM. Identificamos um total de 2127 proteínas, revelando diferenças significativas nos perfis proteômicos entre os estágios larval e adulto após o tratamento. Os adultos demonstraram uma resposta mais adaptada ao estresse oxidativo, refletindo mecanismos eficientes de detoxificação e homeostase celular. Por outro lado, as larvas apresentaram uma estratégia distinta, com redução do metabolismo geral e aumento da expressão de proteínas estruturais e antioxidantes. Essas descobertas elucidam as estratégias adaptativas específicas de cada estágio de vida e apontam proteínas-chave que podem ser exploradas como potenciais alvos para intervenções no controle populacional de *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, matriz peritrófica, hemoglobina, estresse oxidativo

ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti* is the primary vector of viral diseases such as dengue, chikungunya, and Zika, representing a serious public health concern. Although essential for reproduction, blood-feeding imposes significant physiological challenges, particularly during digestion. The proteolysis of hemoglobin, the most abundant protein in blood, releases large amounts of heme, a highly pro-oxidant molecule, into the intestinal lumen. To mitigate the toxic effects of heme, mosquitoes have developed specialized antioxidant mechanisms, including the formation of the peritrophic matrix (PM), a structure formed during blood digestion that plays a crucial role by binding free heme and reducing its toxicity. This study investigated the interaction between hemoglobin and the PM in *A. aegypti*. Using electrophoretic techniques, we confirmed the association of hemoglobin with the PM. We observed that, at the onset of digestion, part of the hemoglobin released from lysed erythrocytes binds to the forming PM. As proteolytic activity increases, free heme, derived from hemoglobin degradation, becomes the primary component associated with the PM. Additionally, experiments demonstrated the protective role of the PM against excessive hemoglobin proteolysis. The results also revealed that hemoglobin binds strongly to the PM, similarly to peritrophins, the main structural proteins of this matrix. Using fluorescence microscopy, we observed colocalization of hemoglobin and chitin staining along the PM in mosquitoes fed with either blood or plasma supplemented with hemoglobin. The interaction between hemoglobin and chitin was confirmed by affinity chromatography, while molecular docking studies identified promising binding interactions between the alpha and beta subunits of hemoglobin and the (NAG)₄ oligosaccharide of chitin. Furthermore, we conducted a proteomic analysis of larvae and adult mosquitoes exposed to heme at a concentration of 10 mM. A total of 2127 proteins were identified, revealing significant differences in proteomic profiles between larval and adult stages after treatment. Adults demonstrated a more adapted response to oxidative stress, reflecting efficient detoxification and cellular homeostasis mechanisms. In contrast, larvae adopted a distinct strategy, characterized by a reduction in overall metabolism and an increase in structural and antioxidant proteins. These findings elucidate stage-specific adaptive strategies and highlight key proteins that could serve as potential targets for interventions aimed at controlling *Aedes aegypti* populations.

Keywords: *Aedes aegypti*, peritrophic matrix, hemoglobin, oxidative stress

1. Revisão bibliográfica

1.1. O mosquito *Aedes aegypti*

Os mosquitos fazem parte da ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, na qual está a sub-família Culicinae. Os mosquitos da família Culicidae têm grande relevância médica como vetores de diversas doenças, atuando como vetores de vírus, protozoários e nematoides. O gênero *Aedes*, o maior da sub família Culicinae, agrupa espécies abundantes e possui uma ampla distribuição geográfica (Consoli; Oliveira, 1994; Hubálek, 2008; Matheson, 1932).

O mosquito *Aedes aegypti*, provavelmente originário da região etiópica e descrito pela primeira vez no Egito, espalhou-se globalmente ao longo dos séculos, acompanhando a migração humana. Sua proliferação foi favorecida pela urbanização, que criou ambientes ideais para o desenvolvimento da espécie. Atualmente, é considerado um mosquito cosmopolita, amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, acredita-se que o *A. aegypti* tenha sido introduzido durante o período colonial, possivelmente trazido em navios negreiros (Consoli, Oliveira, 1994).

O mosquito *A. aegypti* é o principal vetor de arbovíroses como a dengue, chikungunya, febre amarela e o Zika vírus (Maringer, 2017). Em áreas tropicais e subtropicais onde cerca de 3,9 bilhões de pessoas vivem, essas arboviroses representam ameaças à saúde pública, agravadas pela ausência de antivirais e vacinas eficazes contra esses patógenos. Assim, as principais estratégias de prevenção e controle dependem do manejo do vetor ou da interrupção do contato humano-vetor (Alves *et al.*, 2020).

A frequência e a magnitude dos surtos de arbovírus transmitidos por mosquitos *Aedes* estão aumentando globalmente, inclusive em regiões de clima temperado como a Europa. Estudos de modelagem de distribuição sugerem que, devido às mudanças climáticas, áreas anteriormente inadequadas para esses vetores poderão se tornar habitáveis ao longo do próximo século, expandindo potencialmente o alcance geográfico dessas doenças (Iwamura *et al.*, 2020; Laporta *et al.*, 2023).

A incidência global de dengue aumentou drasticamente nas últimas décadas. Os casos relatados à OMS saltaram de 505.430 em 2000 para 5,2 milhões em 2019 (WHO, 2022). Entretanto, esses números subestimam a realidade, pois muitos casos são assintomáticos, leves ou erroneamente diagnosticados como outras doenças febris (WHO,

2022). Em 2023, a situação se agravou ainda mais, com um recorde de mais de 6,5 milhões de casos registrados, resultando em mais de 7.300 mortes e afetando mais de 80 países (WHO, 2024). Esse aumento alarmante destaca a crescente ameaça global da dengue e a necessidade urgente de medidas eficazes de prevenção e controle.

O mosquito *A. aegypti* apresenta diversas características que contribuem para seu sucesso reprodutivo e proliferativo, como o rápido desenvolvimento, ovos resistentes à dessecação, resistência às principais classes de inseticidas e preferência por ambientes urbanos. Esses fatores favorecem a oviposição em recipientes artificiais, que se tornam criadouros ideais para a espécie (Carvalho; Moreira, 2017; Tauil, 2002). O ciclo biológico do *A. aegypti* inclui quatro estágios: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto, sendo concluído, em média, em 7 a 10 dias. Os adultos vivem de 4 a 6 semanas, e apenas as fêmeas atuam como vetores de doenças, pois necessitam de sangue tanto para o desenvolvimento de seus ovos quanto para a manutenção metabólica (Consoli; Oliveira, 1994; OPAS, 2020).

A digestão sanguínea em mosquitos vetores têm sido amplamente estudada devido à sua importância na transmissão de arboviroses. Essas doenças afetam principalmente países em desenvolvimento, gerando significativos prejuízos sociais e econômicos, além de contribuírem para altas taxas de mortalidade anualmente (OPAS, 2020; WHO, 2024).

1.2. Digestão sanguínea e o intestino médio de *A. aegypti*

Em mosquitos adultos, a alimentação é predominantemente baseada no néctar de frutas, exceto nas fêmeas, que também se alimentam de sangue. Esse processo, conhecido como hematofagia, é essencial para o desenvolvimento e a maturação de seus ovos. As fêmeas do *A. aegypti* apresentam preferência antropofílica, ou seja, alimentam-se prioritariamente de sangue humano, geralmente durante o período diurno. O sangue de vertebrados é uma fonte rica em nutrientes, sendo composto principalmente por proteínas como hemoglobina, albumina e imunoglobulina (Wicher; Fries, 2006).

O canal alimentar dos mosquitos é um tubo que se estende da boca até o ânus. As três regiões do canal são: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Romoser, 1996). O intestino médio é longitudinalmente dividido em uma região anterior e a região posterior, local de destino, armazenagem e digestão do sangue e absorção de nutrientes (Billingsley; Lehane, 1996).

A digestão sanguínea no intestino médio do *A. aegypti* ocorre de forma coordenada e envolve a remoção do excesso de água ingerida, o rompimento dos eritrócitos, a degradação hidrolítica de macromoléculas e a absorção de pequenas moléculas pelas células epiteliais do intestino (Romoser, 1996). As hemácias representam o maior componente celular do sangue e, como a hemoglobina está contida dentro das hemácias, a lise destas células é o passo inicial para a digestão nos insetos hematófagos (Horn *et al.*, 2009).

A hemoglobina é uma proteína globular composta por quatro subunidades: duas cadeias alfa e duas cadeias beta. Cada subunidade contém um grupo heme, uma molécula que possui ferro em sua estrutura e é responsável pela ligação ao oxigênio. O átomo de ferro presente no grupo heme pode se ligar a uma molécula de oxigênio, permitindo que a hemoglobina transporte até quatro moléculas de O₂ simultaneamente (Gupta, 2019).

A digestão sanguínea nos mosquitos resulta na liberação de peptídeos, aminoácidos e uma grande quantidade de heme no lúmen intestinal (Pascoa *et al.*, 2002). O heme, grupo prostético da hemoglobina, é uma molécula catalisadora essencial em diversos processos oxidativos biológicos, como a cadeia transportadora de elétrons (citocromos), a detoxificação de drogas (citocromo P450) e o transporte de oxigênio (hemoglobina e hemocianina). No entanto, quando liberado da cadeia polipeptídica da hemoglobina, o heme torna-se altamente pró-oxidante (Dansa-Petretski *et al.*, 1995; Ryter *et al.*, 2000).

Nos mosquitos *A. aegypti*, o ferro proveniente do heme, derivado da digestão da hemoglobina é a principal fonte de ferro, sendo responsável por 98% do total utilizado pelo inseto e 97% do necessário para o desenvolvimento de seus ovos, em comparação ao ferro férrico (Gonzales *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2007). Por ser uma molécula anfifílica, com propriedades polares e apolares, o heme pode se associar a membranas biológicas, causando perturbações na sua integridade e induzindo a peroxidação dos lipídeos componentes (Schmitt *et al.*, 1993).

O intestino médio, única porção do trato digestivo dos mosquitos que não é revestida por uma cutícula protetora, depende de mecanismos específicos para proteção. As células epiteliais dessa região produzem uma camada extracelular conhecida como matriz peritrófica (MP), que desempenha um papel fundamental na defesa contra danos químicos e mecânicos (Peters, 1992).

1.3. A matriz peritrófica

A matriz peritrófica (MP) dos insetos pode ser classificada em dois tipos, com base em sua formação: MP tipo I e MP tipo II (Wigglesworth, 1930). As MPs do tipo I são as mais comuns em insetos, e estão presentes na fase adulta de mosquitos hematófagos. Seus componentes são secretados normalmente em resposta à alimentação pelas células ao longo do epitélio intestinal, ou por partes específicas do mesmo (região anterior ou posterior e envolvem o bolo alimentar ao longo de todo o intestino médio) (Tellan, 1996; Lehane, 1997; Terra, 2001).

Em geral as MPs tipo I são bem menos estruturadas e diferenciadas do que as MPs do tipo II. As MPs do tipo II são secretadas como um tubo contínuo, constitutivamente por um grupo especializado de células, conhecido como cárdia. Este tipo de matriz geralmente está presente em larvas de Diptera, mas também na fase adulta de moscas e de mosquitos não hematófagos, além de representantes de outros grupos (Tellan, 1996; Jacobs Lorena, 1996). As fêmeas do mosquito *A. aegypti* adultas produzem a MP do tipo I (Lehane, 1997).

A MP é composta de quitina, proteoglicanos e proteínas. A quitina corresponde a aproximadamente 3,7-13% da massa total da MP. As fibrilas de quitina hidratadas provavelmente contribuem para a resistência da MP (Terra, 1996; Lehane, 1997). Os proteoglicanos são macromoléculas constituídas de proteínas e um ou mais glicosaminaglicanos ligados covalentemente (Eisemann; Binnington, 1994; Terra, 1996; Lehane, 1997). Os proteoglicanos estão envolvidas na resistência, porém sua principal função está ligada a permeabilidade da MP (Tellam; Eisemann, 2000, Hegedus, *et al.*, 2009). As proteínas são os componentes mais abundantes da PM na maioria dos insetos (Lehane, 1997).

Em algumas espécies de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, a matriz peritrófica (MP) começa a ser sintetizada entre 3 e 6 horas após a ingestão de sangue e, em média, está completamente formada após cerca de 24 horas. Ela persiste por aproximadamente 48 horas, até que os resíduos sejam excretados do intestino (Páscoa *et al.*, 2002; Okuda *et al.*, 2002).

A MP possui algumas funções, normalmente ligadas à digestão e à proteção do epitélio do intestino médio (Terra, 2001). Dentre as funções estão:

- Permeabilidade: a MP é uma membrana semipermeável que permite o movimento seletivo de moléculas do lúmen do intestino para as células digestivas do epitélio e a retenção de moléculas maiores no lúmen (Tellam, 1996);
- Proteção mecânica: a MP forma uma barreira que evita a abrasão de partículas ingeridas contra o epitélio intestinal (Richards; Richards, 1977)
- Barreira contra microrganismos: a matriz peritrófica atua como um obstáculo evitando ou dificultando a passagem de possíveis parasitas do bolo alimentar para as células epiteliais, além disso, a MP tem papel essencial na modulação da microbiota intestinal, que acaba por interferir na competência de arbovírus, como Dengue e Zika (Lehane, 1991; Talyuli, *et al.*, 2022).
- Proteção antioxidante: durante a digestão do sangue ocorre uma grande liberação de heme, grande parte desta molécula fica associada à matriz peritrófica, sugerindo que esta poderia ter também um papel antioxidante. A MP de *A. aegypti* é capaz de ligar-se ao heme de forma que, a quantidade de heme ligado à MP aumenta em paralelo ao curso da digestão, atingindo seu máximo 18 nmol em 48h após a alimentação (Pascoa, *et al.*, 2002). Tal fato sugere que a matriz peritrófica tem um papel no mecanismo de sequestro de heme.
- Auxilia na coordenação do processo digestivo: estudos demonstraram que ao romper a MP de fêmeas de *A. aegypti* e *Anopheles stephensi* por alimentação com quitinase ou com anticorpos anti-proteínas de MP, havia uma aceleração no processo de digestão, ou seja, uma das funções da matriz no adulto seria limitar a velocidade de digestão (Villalon *et al.*, 2003).

Nesse contexto é necessário aprofundar o conhecimento sobre o papel da MP na fisiologia digestiva dos mosquitos, como, por exemplo, entender a interação de seus componentes com os constituintes do sangue. O estudo dos mecanismos de ligação entre a MP e a principal proteína do sangue, a hemoglobina, irá contribuir para esse entendimento.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar os mecanismos de interação entre a hemoglobina e a matriz peritrófica durante o processo de digestão sanguínea no mosquito *A. aegypti*, visando compreender seu papel na fisiologia digestiva e potenciais implicações para o controle vetorial.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar pela técnica de eletroforese, o perfil proteico da matriz peritrófica em mosquitos alimentados com sangue, evidenciando a interação da hemoglobina com a PM.
2. Analisar a dinâmica temporal da formação da matriz peritrófica e sua associação com a hemoglobina durante o processo de digestão sanguínea em *A. aegypti*.
3. Avaliar o papel protetor da matriz peritrófica na degradação da hemoglobina durante o processo digestivo, comparando a cinética de degradação da hemoglobina livre e associada à matriz.
4. Investigar a interação entre a hemoglobina e os componentes da matriz peritrófica, com ênfase nas interações com a quitina, utilizando a técnica de Docking molecular.
5. Verificar o possível papel da hemoglobina na complexidade estrutural da matriz peritrófica de *A. aegypti*.

Referências

- ALVES, M. L. R.; MELO-JUNIOR, O. A. D. O.; SILVEIRA, P.; MARIANO, R. M. D. S.; LEITE, J. C.; SANTOS, T. A. P.; GIUNCHETTI, R. C. Historical perspective and biotechnological trends to block arboviruses transmission by controlling *Aedes aegypti* mosquitos using different approaches. *Frontiers in Medicine*, v. 7, 2020.
- BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. *Biology of the Insect Midgut*. 1. ed. London: Chapman & Hall, 1996. p. 86-114.
- CARVALHO, F.D.; MOREIRA, L.A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? *Neotropical Entomology*, v. 46, p. 243–255, 2017.
- CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.
- DANSA-PETRETSKI, M. RIBEIRO J.M.C., ATELLA G.C., MASUDA H., OLIVEIRA P.L. Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 10893–10896, 1995.
- GONZALES, K.K.; RODRIGUEZ, S.D.; CHUNG, H.-N.; KOWALSKI, M.; VULCAN, J.; MOORE, E.L.; LI, Y.; WILLETTE, S.M.; KANDEL, Y.; VAN VOORHIES, W.A.; HOLGUIN, F.O.; HANLEY, K. A.; HANSEN, I.. The Effect of SkitoSnack, an Artificial Blood Meal Replacement, on *Aedes aegypti* Life History Traits and Gut Microbiota. *Sci. Rep.* 2018, 8, 11023.
- GUPTA, A. Hemoglobin. *Comprehensive Biochemistry for Dentistry: Textbook for Dental Students*, p. 77-100, 2019.
- HEGEDUS, D.; Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. Novos insights sobre peritrófico síntese, arquitetura e função da matriz. *Annual Review of Entomology*, v. 54, p. 285-302, 2009.
- HORN, M. ; NUSSBAUMEROVÁ, M., ŠANDA, M., KOVÁŘOVÁ, Z., SRBA, J., FRANTA; SOJKA, D.; BOGYO, M.; CAFFREY, C. R.; KOPA, P.MARE, M. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chemistry & Biology*, v. 16, p. 1053-1063, 2009.
- HUBÁLEK, Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitology Research*, v. 103, 2008.
- IWAMURA, T.; GUZMAN-HOLST, A.; MURRAY, K.A. Accelerating Invasion Potential of Disease Vector *Aedes aegypti* under Climate Change. *Nature Communications*, v. 11, 2130, 2020.

JACOBS-LORENA, M.; OO, M.M. The peritrophic matrix of insects. In: BEATY, B.J.; MARQUARDT, W.C. *Biology of Disease Vectors*. Colorado: University Press of Colorado, p. 318-332, 1996.

LAPORTA, G. Z., POTTER, A. M., OLIVEIRA, J. F., BOURKE, B. P., PECOR, D. B., & LINTON, Y. M. (2023). Global distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a climate change scenario of regional rivalry. *Insects*, 14(1), 49.

LEHANE, M. J. *Biology of blood-sucking insects*. 1. ed. United Kingdom: Harper Collins Academic, 1991.

LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, v. 4, p. 525-550, 1997.

MARINGER, K.; YOUSUF, A.; HEESOM, K. J.; FAN, J.; LEE, D.; FERNANDEZ-SESMA, A.; BESSANT, C.; MATTEWS, D. A.; DAVIDSON, A. D. Proteomics informed by transcriptomics for characterising active transposable elements and genome annotation in *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, v. 18, 2017.

MATHESON, R. The utilization of aquatic plants as aids in mosquito control. *The American Naturalist*, v. 64, p. 56-86, 1932.

OKUDA, K.; CAROCI, A. S., RIBOLLA, P. E., BIANCHI, A. G., & BIJOVSKY, A. T. Morfologia funcional do intestino médio de *Culex quinquefasciatus* fêmea adulta durante a digestão do sangue. *Tissue & Cell*, v. 34, p. 210-219, 2002.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Folha informativa – Dengue e dengue grave: OPAS, 2019. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5963:folha-informativa-dengue-e-denguegrave&Itemid=812#:~:text=Estimativas%20recentes%20indicam%20390%20milh%C3%B5es,com%20qualquer%20gravidade%20da%20doen%C3%A7a. Acesso em: 5 dez. 2020.

PASCOA, V OLIVEIRA P.L., DANSA-PETRETSKI M., SILVA J.R., ALVARENGA P.H., JACOBS-LORENA M., LEMOS F.J.A. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, p. 517-523, 2002.

PETERS, W. Peritrophic membranes. In: ZOOPHYSIOLOGY. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v. 30, p. 238.

RICHARDS, A.G.; RICHARDS, P.A. The peritrophic membranes of insects. *Annual Review of Entomology*, v. 22, p. 219–240, 1977.

ROMOSER, W. S. The vector alimentary system. In: BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C. *The biology of disease vectors*. 1. ed. Colorado: University Press, 1996. p. 298-317.

RYTER, S. W. OTTERBEIN, L. E., MORSE, D., & CHOI, A. M. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Molecular Cell Biochemistry*, v. 235, p. 249-63, 2002.

SCHMITT, T. H.; FREZZATTI, W. A., & SCHREIER, S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 307, p. 96-103, 1993.

TALYULI, O., OLIVEIRA, J., BOTTINO-ROJAS, V., SILVEIRA, G., ALVARENGA, P., KANTOR, A., PAIVA-SILVA, G., BARILLAS-MURY, C., & OLIVEIRA, P. The *Aedes aegypti* peritrophic matrix controls arbovirus vector competence through HPx1, a heme-induced peroxidase. *PLOS Pathogens*, v. 19, 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011149>.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 18, p. 867-871, 2002.

WHO - World Health Organization. (2022). Global Arbovirus Initiative: WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/03/31/default-calendar/global-arbovirus-initiative>. Acesso 8 de setembro de 2024.

WHO - World Health Organization. (2024). Dengue and severe dengue: WHO, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em 8 de setembro de 2024.

WICHER, Krzysztof B.; FRIES, Erik. Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 11, p. 4168-4173, 2006.

ZHOU, G.; KOHLHEPP, P.; GEISER, D.; FRASQUILLO, M.D.C.; VAZQUEZ-MORENO, L.; WINZERLING, J.J. Fate of Blood Meal Iron in Mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 2007, 53, 1169–1178.

**Capítulo I – Análise Estrutural e Funcional da Ligação da
Hemoglobina à Matriz Peritrófica Durante a Digestão Sanguínea em
*Aedes aegypti***

(Artigo publicado dia 24 de janeiro de 2025 pela revista Insects)

Structural and Functional Analysis of Hemoglobin Binding to the Peritrophic Matrix During Blood Digestion in *Aedes aegypti*.

Karla Barreto da Silva Orozimbo ^{1*}; Desiely da Silva Gusmão Tauil ²; Aline Melila Licurgo ³; Felipe Figueirôa Moreira ⁴; Jucélia da Silva Araújo ³; Maria Aparecida Aride Bertonceli ³; Sérgio Henrique Seabra ⁴; Olga Lima Tavares Machado ³; Francisco José Alves Lemos ^{1*}

¹ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil, Laboratório de Biotecnologia, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, 28013-602.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 28030-130.

³ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil, Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, 28013-602

⁴ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil, Laboratório de Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, 28013-602

*Corresponding authors: franze@uenf.br ; karla28orozimbo@gmail.com;

Abstract

The *Aedes aegypti* mosquito is responsible for transmitting pathogens such as the Dengue, Zika, and Chikungunya viruses. The peritrophic matrix (PM) is an extracellular chitin-rich structure that lines the midgut of arthropods, providing a crucial protective barrier for the gut epithelium against mechanical damage, ingested pathogens, and toxic substances. During blood digestion, hemoglobin is lysed, releasing free heme into the midgut lumen. Part of this heme binds strongly to the PM, mitigating its harmful effects on the mosquito epithelial cells. Our study focused on investigating the interaction dynamic between hemoglobin and the PM during blood digestion in *A. aegypti*. Optical microscopy was employed to observe the temporal progression of blood digestion in the *A. aegypti* midgut, highlighting significant morphological changes in the blood bolus. An electrophoresis analysis revealed distinct protein bands in the PM extract, some of which were associated with hemoglobin and its subunits. The presence of PM-associated hemoglobins was confirmed by amino-terminal sequencing and an immunoblot analysis using anti-hemoglobin antibodies. Furthermore, fluorescence microscopy revealed overlapping labeling between hemoglobin and chitin, suggesting an interaction between hemoglobins and PM chitin. Corroborating these results, hemoglobin showed an affinity with chitin in the chromatography and molecular docking assays, in which the hemoglobin subunits interacted with the oligosaccharide (NAG)₄. Thus, hemoglobin may perform a function similar to that of peritrophins. Further experiments demonstrated the protective role of the PM against hemoglobin proteolysis during blood digestion. Overall, this study provides valuable insights into the intricate interactions between hemoglobin and the PM, enhancing our understanding of mosquito digestive physiology and potentially contributing to the development of vector control strategies.

Keywords: *Aedes aegypti*; blood digestion; hemoglobin; heme; chitin

1. Introduction

Mosquitoes are vectors of several infectious diseases that significantly impact human and animal health. These diseases, including dengue, yellow fever, malaria, and filariasis, are particularly prevalent in regions such as Latin America and Africa [1]. In 2023, global reports of dengue reached a record high, with over five million cases and more than 5000 deaths [2]. Furthermore, *A. aegypti* transmits key pathogens, such as the Zika and Chikungunya viruses, which are major contributors to morbidity and mortality worldwide [3], underscoring its critical importance in public health.

The peritrophic matrix (PM) is a chitin-based extracellular structure in the midgut of arthropods, acting as a semi-permeable barrier [4,5]. In blood-feeding insects like mosquitoes, it forms a protective sleeve around the blood bolus, separating it from the midgut epithelium [6]. The PM exists in two types: Type I, produced in response to feeding, and Type II, continuously secreted by specialized cells [7].

The PM provides physical protection for epithelial cells by preventing mechanical damage, acting as a selective barrier to pathogens, toxins, and other harmful substances [8]. It also defends against pathogens by limiting their access to the midgut and maintaining gut homeostasis [9,10]. In addition to its protective functions, the PM optimizes digestion by facilitating the compartmentalization of digestive processes and enhancing enzymatic efficiency [11]. The peritrophic matrix significantly influences vector competence through multiple mechanisms. The heme-peroxidase HPx1 plays a crucial role by promoting

PM assembly and modulating arbovirus vector competence in mosquitoes [12]. Beyond viral pathogens, the PM serves as a critical barrier against *Plasmodium* parasites, directly affecting their development and transmission potential [13]. This protective function is enhanced by the gut microbiota, which stimulates PM formation through immune signaling pathways, thereby maintaining midgut homeostasis and preventing

systemic infections [12,14]. The complex interplay between the PM, gut microbiota, and immune responses represents a sophisticated defense mechanism that modulates vector competence for various pathogens [13,14].

The PM comprises proteins, chitin, and other polysaccharides, with proteins being a major structural and functional component [15]. Peters [16] emphasized the dominance of proteins in the PM, while Tellam [17] introduced a classification system categorizing PM proteins based on their association with the structure. Among these, class III proteins, known as peritrophins, are particularly abundant. Peritrophins bind strongly to the PM through chitin-binding domains (CBDs), which contain cysteine residues forming disulfide bonds that stabilize the matrix [18]

Vertebrate hemoglobin (Hb) is a sophisticated tetrameric protein that serves as the primary oxygen carrier within erythrocytes [19]. The molecule consists of four globin chains arranged in a quaternary structure: two alpha (α) subunits with 141 amino acid residues (approximately 15.2 kDa each) and two beta (β) subunits with 146 amino acid residues (approximately 15.8 kDa each) (Mozzarelli et al., 2010), resulting in a total molecular mass of about 64 kDa for the complete tetramer. Each subunit contains a prosthetic heme group—an iron-containing protoporphyrin IX that enables reversible oxygen binding [20,21].

During blood digestion in hematophagous insects, erythrocyte lysis releases significant amounts of free heme into the midgut lumen [22,23]. While heme is essential for various biological functions, such as oxygen transport and signal transduction [24], free heme is toxic due to its ability to catalyze the oxidation of biomolecules, including nucleic acids, proteins, and lipids [25,26].

Studies have shown that the PM plays a crucial role in mitigating heme toxicity. Páscoa et al. [23] demonstrated that a portion of the heme released during blood digestion

binds strongly to the PM, preventing it from reaching the gut epithelium and causing oxidative damage. Devenport and colleagues [22] identified AeIMUC1 as a key peritrophic matrix protein in *A. aegypti* that possesses dual functionality.

This protein contains three chitin-binding domains (CBDs) with an intervening mucin-like domain and can bind significant amounts of heme in vitro, suggesting its crucial role in heme detoxification during blood digestion.

Blood digestion in *A. aegypti* involves several coordinated processes, including water removal, erythrocyte disruption, macromolecule hydrolysis, and the absorption of nutrients by midgut epithelial cells [27]. Digestion occurs in two phases: an early phase (4–6 h post-feeding) with low trypsin activity facilitating limited proteolysis and a late phase (8–36 h post-feeding) characterized by a high activity of trypsin [28].

During the initial hours of digestion, when protease activity is low, the PM may bind intact or partially degraded hemoglobin. As digestion progresses, the mature PM predominantly binds free heme, reducing its diffusion to epithelial cells. This dual capacity highlights the PM's role in sequestering hemoglobin-associated and free heme, mitigating oxidative damage during blood digestion.

This study investigated the interaction between hemoglobin and the peritrophic matrix, offering a deeper understanding of the digestive physiology of *A. aegypti*.

2. Material and Methods

2.1. Mosquitoes and Colony Maintenance

The insects were sourced from a colony of *A. aegypti* (Rockefeller strain) maintained at the Laboratory of Biotechnology, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil. The larvae were fed with Tetramin fish food and reared in trays at room temperature. The adult mosquitoes were housed at 27°C with a relative humidity of 70%, under a 12 h photoperiod, and provided with a 10% sucrose solution. To stimulate egg production, females aged 3–5 days were artificially fed with defibrinated sheep blood using a membrane-feeding apparatus (CEUA/CBB/UENF approval no. 011/2023).

2.2. Feeding of Mosquitoes

For experiments involving blood feeding, mosquitoes were fed using gently immobilized Balb/c mice, following approved ethical protocols (CEUA/CBB/UENF approval no. 011/2023), which adhere to the guidelines established by National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA)

For artificial feeding, sheep blood plasma was supplemented with various proteins and offered to mosquitoes using a water-jacketed membrane-feeding apparatus at 37°C. The proteins used in the experiments were (a) bovine hemoglobin H2500, Sigma-Aldrich, City of Saint Louis, MO, USA), (b) bovine serum albumin (B14, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), (c) bovine trypsin (Sigma-Aldrich, T8003), (d) soybean trypsin inhibitor (101113, MP Biomedicals, Singapore) 10 mg/mL, (e) bovine cytochrome C (C3131, Sigma-Aldrich, City of Saint Louis, MO, USA) 70 mg/mL, and (f) equine myoglobin (M1882, Sigma-Aldrich, City of Saint Louis, MO, USA).

2.3 Dissection *A. aegypti* Midgut and Processing of Peritrophic Matrices

The mosquitoes were blood-fed, and at specific time points post-blood feeding, the mosquitoes were immobilized in a freezer for 3 min at -20°C and transferred to Petri dishes on ice. Dissections were performed in either 50% ethanol or PBS 1X under a Karl Zeiss stereoscopic microscope (Karl Zeiss, Oberkochen, Germany). The midgut was carefully exposed by gently pulling the last abdominal segment while holding the thorax with fine forceps. The isolated midgut was transferred to fresh buffer, where a precise incision was made to expose the blood bolus. The epithelial layer was carefully removed using fine forceps while preserving the integrity of the peritrophic matrix structure. The isolated peritrophic matrices were thoroughly washed with distilled water to remove residual blood content through a combination of mechanical disruption with a pestle and vortexing. The samples were centrifuged at $13,000\times g$ for 5 min, and this washing procedure was repeated five times until the supernatant became colorless. Clean peritrophic matrices were either processed immediately or stored at -70°C for later use. For the protein analysis, the samples were homogenized in appropriate buffer and separated by denaturing electrophoresis. For the morphological analysis, the midguts with blood bolus were photographed to document the structural changes in the midgut throughout the digestive process.

2.4. Immunofluorescence Microscopy

The midguts from mosquitoes fed on sheep's blood or bovine hemoglobin were fixed in 4% paraformaldehyde. They were then washed three times for 30 minutes each in PBS and were transferred, embedded in Optimal Cutting Temperature (OCT) and frozen in liquid nitrogen. Thereafter, cryosections ($40\text{ }\mu\text{m}$ thick) were obtained with a

Hyrax C25 cryostat (Zeiss, Stuttgart, Germany) at -20°C and placed onto gelatin 0, 5 % - treated glass slides. The slides were permeabilized in 50 mM ammonium chloride, blocked with 3% bovine serum albumin (BSA), and subsequently incubated for 24 h at 15°C with an anti-human hemoglobin primary antibody (H4890; dilution 1:100, Sigma-Aldrich, City of Saint Louis, MO, USA) in PBS containing 3% BSA. The samples were then washed three times with PBS (5 min each), blocked with 3% BSA, and incubated with the secondary antibody (Sigma-Aldrich, A3687; 1:500 dilution) in PBS for 24 h at 15 °C. This was followed by three additional PBS washes. Finally, the slides were stained with Calcofluor White (Sigma-Aldrich, 18909), a fluorescent blue dye that binds to chitin, and analyzed and photographed using an Olympus BX60 epifluorescence microscope. The samples prepared with sheep's blood were examined using a Zeiss LSM-710 confocal microscope, and the images were processed and assembled using Zeiss Zen Lite 2.1 software

2.5. Affinity Chromatography of Bovine Hemoglobin and Hemin with Chitin

To evaluate the potential interactions between bovine hemoglobin and chitin, as well as between the hemin (Sigma-Aldrich, H-9039) and chitin (Sigma-Aldrich, C-9213), affinity chromatography was performed using chitin as the matrix. Initially, 1 mg of bovine hemoglobin or bovine hemin was dissolved separately in 1 mL of sodium acetate buffer (0.1 M, pH 6.0) and incubated with 8 mL of hydrated chitin resin under constant agitation at room temperature for 30 minutes. The mixture was then loaded onto a glass chromatography column (2 x 15 cm), and the column was packed using a pressure pump with a constant flow rate of 1.0 mL/min. The non-retained fraction was eluted with sodium acetate buffer (0.1 M, pH 6.0) until the absorbance at 280 nm reached near-zero values, indicating the removal of unbound proteins from the chitin. The proteins retained on the column were eluted with 0.1 M HCl, chosen for its ability to disrupt protein-chitin

interactions. Eluates were collected in 1 mL fractions and monitored for protein content by measuring absorbance at 280 nm using a Belpotonics spectrophotometer (BEL engineering, Italy).

2.6. Computational approach for structural modeling and blind docking of Bovine Hemoglobin subunits with the oligosaccharide (NAG)₄

The FASTA sequence of bovine hemoglobin (PDB ID: 2QSS) was used to validate and obtain the three-dimensional models of the alpha and beta subunits in PDB format. Structural modeling of each subunit was performed using SWISS-MODEL (available at <https://swissmodel.expasy.org/interactive> “URL accessed on 27 October 2024”) employing the crystal structure of bovine hemoglobin (PDB ID: 2QSS) as a structural model. The molecular docking of the alpha and beta subunits with the oligosaccharide (NAG)₄ was conducted using the DockThor v.2 software. A blind docking approach was employed, defining the search space as a cube with dimensions 40 Å × 40 Å × 40 Å, sufficient to encompass potential binding sites across the protein surface. The three-dimensional model of the ligand (NAG)₄ was constructed in PyMOL using the Azahar plug-in, specifically for oligosaccharide projection. During the procedure, all ligand rotations were set to free, while the protein atoms remained rigid. The standard DockThor algorithm was used with parameters adjusted for 1,000,000 evaluations and 24 runs per experiment. The most stable protein-ligand complex was selected based on the affinity energy. Protein-ligand interactions were analyzed in PyMOL, focusing on hydrogen bonds, interaction distances (measured in Å), and amino acids at the binding interface, specifically LYS, ARG, and HIS, which are critical for stabilizing the complex.

2.7. Extraction and quantification of peritrophic matrix proteins from *A. aegypti*

The solutions used in the progressive protein extractions from PM were: distilled water; Tris-HCl buffer 100 mM pH 7.5 containing NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, PMSF 0.1 mM; Tris-HCl buffer 20 mM pH 7.4 containing NaCl 140 mM, Triton X-100 1.5%, PMSF 0.1 mM; Tris-HCl buffer 20 mM pH 7.4 containing NaCl 140 mM, urea 6 M, PMSF 0.1 mM and 0.125M Tris-HCl sample buffer, pH 6.8 containing 20% glycerol, 10% SDS, 10% 2- β -mercaptoethanol and 0.004% bromophenol blue. The volume of buffer added to the PMs for each extraction was 1.0 mL, regardless of the number of PMs used. Following each extraction, samples were homogenized using a pestle and centrifuged at $13,000 \times g$ for 5 minutes at 4°C in a refrigerated centrifuge. The samples were dialyzed in distilled water, in a volume of 1L, for 6 h, with exchanges at intervals of 6 hours. Finally, the samples were lyophilized.

After dialyzing and lyophilizing each sample obtained from the described extractions, the protein content was measured using the Folin-Ciocalteu method, as outlined by Lowry *et al.* [29]. Total protein concentration was estimated in the crude extract, the different extraction fractions, and the final precipitate.

Trichloroacetic acid (TCA) was added to the PM protein samples to a final concentration of 10%, promoting protein precipitation by acid-induced denaturation. The samples were then incubated on ice for 1 hour to enhance precipitation efficiency. Then, centrifugation was performed at 1,650 g for 20 minutes at 4°C in a 15 mL centrifuge tube, and the supernatants were discarded. The precipitated samples were thoroughly washed with 1 mL of pure ethanol to ensure complete removal of residual TCA. Following the ethanol wash, the samples were transferred to Eppendorf-type tubes, where they were carefully homogenized and subjected to centrifugation at $22,000 \times g$ for 5 minutes at 4°C to isolate the purified precipitate. The supernatants were discarded. After these steps, 1 mL of pure acetone was added to the precipitates. The samples were homogenized,

centrifuged at 22,000 x g for 5 minutes at 4°C in a refrigerated centrifuge, and the supernatants were discarded. The tubes containing the final precipitates were left open for acetone evaporation. Finally, 20 µL of sample buffer was added to the final precipitates, followed by boiling and rapid centrifugation.

2.8. Electrophoresis, Detection of Peroxidase Activity, and Protein Quantification by Densitometry

TCA-precipitated proteins were separated using SDS-PAGE 15% [30], SDS-Tricine 10%T, 3%C [31]. After electrophoresis, the gels were stained with Coomassie Blue R (0.1% Coomassie Blue R, 40% methanol, 10% acetic acid), silver nitrate, or dimethoxybenzidine (DMB), depending on the objective. Coomassie Blue R and silver nitrate staining were used to visualize total protein content, followed by destaining with 40% methanol and 10% acetic acid to enhance contrast. DMB staining was applied specifically for the detection of peroxidase activity.

The detection of peroxidase activity was performed as described by Francis and Becker [32]. After electrophoresis, gels were incubated with 12.5% trichloroacetic acid (TCA) for 30 minutes, washed with distilled water for another 30 minutes, and developed in 100 mL of 0.05 M sodium citrate buffer (pH 4.4) containing 0.1 g of DMB and 200 µL of H₂O₂. Samples analyzed included peritrophic matrices (PMs) extracted from *A. aegypti* mosquitoes fed on blood for 48 hours or subjected to diets containing plasma + albumin, plasma + hemin, and plasma + hemoglobin. Bovine hemoglobin was used as a control.

The densitometric analysis was performed using ImageJ software 1.54m (NIH, Bethesda, MD, USA) to quantify protein band intensities in SDS-PAGE gels. The 15% polyacrylamide gels were digitally scanned and converted to 8-bit grayscale images. For each gel, the background was calibrated and subtracted using a rolling ball radius of 50 pixels. The band intensities were measured using rectangular selections of equal size for

the 14 kDa bands across all lanes. The integrated density function was used to obtain intensity values, with local background subtraction applied for each measurement. Values were normalized using the highest intensity band as 100% reference, and all other measurements were calculated as relative percentages. To ensure accuracy, measurements were performed in triplicate, and only bands within the linear range of detection were included in the analysis. The resulting values were plotted as bar graphs showing relative band intensities (%) for each experimental condition. This standardized methodology allowed for reliable quantification and comparison of protein levels across different samples and treatments.

2.9. Amino-terminal sequencing of the majority PM proteins

After electrophoresis, the proteins from adult PM were transferred to a PVDF membrane using a transfer buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM boric acid) at 28 V for 16 h. Prior to transfer, the membrane was activated in 100% methanol, rinsed with ultrapure water, and equilibrated in transfer buffer alongside the gel for 20 minutes.

Following the transfer, the membrane was stained with Coomassie solution (40% methanol, 10% acetic acid, 0.1% Coomassie R-250). The corresponding protein bands were excised and subjected to sequencing by automated Edman degradation, performed using a Shimadzu liquid-phase sequencer. The resulting phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were identified via a Shimadzu HPLC system equipped with a Wakopak WS-PTH reverse-phase analytical column.

3. Results

3.1. Dynamic Visualization of Midgut Morphology During Digestion in *A. aegypti*.

We used optical microscopy to observe the digestion of blood in the midgut of mosquitoes at different times after feeding (Figure 1). Right after the mosquitoes fed (Figure 1A), before the peritrophic matrix (PM) had formed, the blood was in direct contact with the stretched intestinal lining, making it difficult to distinguish the epithelium. By 4 h after feeding (Figure 1B), the epithelium became visible, separating from the blood. Between 6 and 22 h after feeding, the midgut gradually darkened, a process associated with the breakdown of hemoglobin and the release of free heme (Figures 1C–1F). In Figure 1D, when part of the intestinal epithelium was removed, we observed that the PM contained the food bolus. By 54 h (Figure 1G), the blood was fully digested, and the midgut appeared uniformly dark due to the presence of oxidized heme.

3.2. Protein Profiling of the Peritrophic Matrix in Blood-Fed Mosquitoes

To better understand the protein composition of the PM in blood-fed mosquitoes, we analyzed it using denaturing electrophoresis. After thoroughly washing the PMs with distilled water, we performed sequential extractions with buffers of increasing solubilization power (Figure 2). We observed several distinct protein bands, with the most prominent appearing at approximately 43, 30, and 14 kDa. These bands consistently appeared in different extraction steps, suggesting that the associated proteins interact with the PM through various mechanisms. To obtain a clearer view of the low molecular weight proteins, we used tricine gel electrophoresis (Figure 3). The tricine gel electrophoresis samples were the same as those used in the standard Laemmli gel electrophoresis shown in Figure 2, with the exception of the sample extracted using the Laemmli buffer. As expected, tricine electrophoresis allowed for a clearer visualization

of protein bands below 30 kDa, with a notable emphasis on proteins with a molecular mass below 14 kDa (Figure 3).

3.3. Comparative Analysis of Peritrophic Matrix Proteins and Bovine Hemoglobin: Structural and Sequence Insights

To better understand how proteins from the peritrophic matrix (PM) compare to hemoglobin, we conducted denaturing electrophoresis using a tricine gel. For this analysis, PM proteins were extracted from 2, 4, and 8 PMs of *A. aegypti* mosquitoes (Figure 4A). These mosquitoes were blood-fed and dissected 24 hours post-feeding. As controls, we included 5 and 10 µg of bovine hemoglobin (Figure 4A). The results demonstrated that proteins extracted from the PM, with molecular weights of approximately 67, 43, 30, and 14 kDa, exhibited gel migration patterns consistent with the tetrameric form of hemoglobin (67 kDa) and its trimeric (43 kDa), dimeric (30 kDa), and monomeric (14 kDa) forms. Notably, when lower amounts of PM proteins were analyzed (Figure 4A, lane 1) and in Figure 4B, the 14 kDa protein band resolved into two distinct bands with closely similar molecular weights, which are likely the alpha and beta subunits of hemoglobin.

To confirm the identity of the proteins associated with the PM, we analyzed the Nterminal amino acid sequences of the 14 kDa predominant proteins extracted from it. The sequences matched those of the alpha and beta subunits of mouse hemoglobin, consistent with the use of mice as the blood source for the mosquitoes in this experiment. Specifically, the higher molecular weight protein displayed the sequence VLSGEDKSN, corresponding to the alpha subunit, while the lower molecular weight protein showed the sequence VHLTDAEKA, corresponding to the beta subunit.

These sequencing results align with the findings from Western blot analysis, where an anti-hemoglobin antibody strongly recognized the 14 kDa hemoglobin subunits

in the PM extracts from blood-fed mosquitoes (Figure S1, Supplementary Materials). Together, these results confirm the association of hemoglobin with the PM and its incorporation into the matrix during blood digestion.

3.4. Visualization of Hemoglobin-Chitin Interaction in the Peritrophic Matrix via Immunofluorescence Microscopy

To investigate the interaction between hemoglobin and the (PM), the mosquitoes fed with bovine hemoglobin were dissected, and their midguts were subjected to an immunofluorescence analysis. The midguts were treated with a primary anti-human hemoglobin antibody, followed by incubation with a fluorescent secondary antibody that emitted green light. Additionally, the midguts were also stained with CalcoFluor White, a chitin specific that fluoresces blue upon binding. Examination under an epifluorescence microscope revealed overlapping fluorescence signals from hemoglobin and chitin along the PM structure (Figure 5). Similar overlapping signals were observed in the PM of blood-fed mosquitoes (Figure S2, Supplementary Materials). In contrast, the PM of mosquitoes fed with albumin showed only CalcoFluor White staining, demonstrating the specificity of the primary anti-human hemoglobin antibody binding (Figure S3, Supplementary Materials).

3.5. Affinity Chromatography Profiles of Chitin with Bovine Hemoglobin and Hemin

The affinity between hemoglobin and heme with chitin was examined by affinity chromatography. The graph (figure 6A) shows the chromatographic elution profile of bovine hemoglobin. As expected, only one peak was observed, referring to bovine hemoglobin in the eluate with 0.1 M HCl, where the proteins with affinity for chitin are located. In the graph (figure 6B) referring to the chromatographic elution profile

of heme, it can be seen from the presence of a peak in the non-retained fraction that heme shows no affinity for chitin.

3.6. Computational Insights into the Binding of Bovine Hemoglobin Subunits with (NAG)₄ Oligosaccharide: Structural Modeling and Docking Analysis

The molecular docking analysis revealed specific interactions between bovine hemoglobin α and β subunits and the oligosaccharide (NAG)₄ (Figure 7). Both subunits exhibited an identical binding affinity energy (ΔG) = of -30,125 joules/mol (J/mol), suggesting favorable and spontaneous interactions. The three-dimensional structural models demonstrate that the oligosaccharide binds to specific regions of both hemoglobin subunits through multiple hydrogen bond interactions with key amino acid residues, including lysine (LYS 61 and LYS 90), arginine (ARG 92), and histidine (HIS 45). These residues form stable hydrogen bonds with interatomic distances smaller than 4 Å, indicating strong and stable bonding networks. The binding mode shows remarkable similarity between α and β subunits, suggesting a conserved interaction mechanism between hemoglobin and chitin oligomers. The structural analysis emphasizes the importance of basic amino acid residues and histidine in establishing specific interactions with the oligosaccharide, providing molecular insights into the mechanism of hemoglobin binding to the chitin-rich peritrophic matrix.

3.7. Temporal Dynamics of Hemoglobin Association and Peroxidase Activity in the Peritrophic Matrix of *A. aegypti* During Blood Digestion

An SDS-PAGE analysis was used to assess the dynamics of hemoglobin association with the peritrophic matrix (PM) in *A. aegypti* during blood digestion (Figure 8). The Coomassie-stained gel (Figure 8A) revealed that PM samples from mosquitoes fed with plasma + albumin or plasma + hemin did not exhibit the characteristic

hemoglobin subunits (14 and 17 kDa). In contrast, both plasma + hemoglobin and blood-fed samples showed distinct hemoglobin subunit bands. Blood-fed samples displayed a clear temporal pattern, with strong band intensities observed at 6 hours post-feeding, which gradually decreased over subsequent time points, reaching a lower intensity at 48 hours (lanes 4-8). The parallel analysis of peroxidase activity using DMB staining (Figure 8B) revealed distinct temporal patterns. While the PM samples from plasma + albumin and plasma + hemin treatments showed no peroxidase activity, the hemoglobin bands progressively increased from 6 h post-feeding, reaching maximum levels between 24-36 h, followed by a notable decline at 48 h, which coincides with the final stages of blood digestion. The commercial bovine hemoglobin (10 μ g) exhibited relatively low peroxidase activity despite its high protein concentration. Additionally, peroxidase-active bands below 14 kDa, likely representing hemoglobin degradation products, were more prominent at 24 and 36 h (lanes 6 and 7). The inverse relationship between the hemoglobin band intensity and peroxidase activity suggests progressive structural modifications of PM-associated hemoglobin during digestion. While the total protein amount decreases over time, the accessibility of heme groups appears to increase, likely due to partial proteolysis or conformational changes, resulting in enhanced peroxidase activity despite lower protein quantities

The densitometric analysis of hemoglobin bands associated with the PM revealed a clear temporal pattern during blood digestion ((Figure S4A, Supplementary Materials). The analysis showed high band intensities during the early digestion stages (100% at 6 h and 90% at 12 h), with a subsequent decrease to 70% at 24 h. The intensity continued to decline, reaching 57% at 36 h and 22% at 48 h. The densitometric analysis of the peroxidase activity of hemoglobin bands associated with the PM revealed distinct temporal pattern (Figure S4B, Supplementary Materials). Using blood samples at 24 h as

a reference (100%), the analysis showed that the plasma + hemoglobin samples exhibited a relatively low intensity (35%). During blood digestion, the band intensity increased progressively from 55% at 6 h to 80% at 12 h post-feeding, reaching maximum levels at 24 h. Subsequently, the intensity gradually declined to 90% at 36 h and further decreased to 68% at 48 h. The commercial bovine hemoglobin displayed a minimal intensity at approximately 20%. This pattern demonstrates a dynamic profile of peroxidase activity, characterized by a progressive increase during early digestion, followed by a gradual decline during later stages of blood meal processing

3.8. Comparative Analysis of Luminal and Peritrophic Matrix-Associated Hemoglobin Degradation During Blood Digestion in *A. aegypti*

The comparative analysis of luminal and peritrophic matrix (PM)-associated hemoglobin (14 kDa) degradation during blood digestion in *A. aegypti* reveals distinct patterns of protein breakdown (Figure 9). The SDS-PAGE analysis shows that luminal hemoglobin (Figure 9A) exhibits more intense 14 kDa bands during the first 24 h (lanes 1-3), followed by a sharp decline in intensity at 36 and 48 h (lanes 4-5). In contrast, PM-associated hemoglobin (Figure 9B) shows a more gradual decrease in band intensity, with moderate intensity levels maintained even at later time points.

The densitometric analysis corroborates these observations, highlighting that luminal hemoglobin undergoes faster degradation compared to PM-associated hemoglobin (Figure S5). Specifically, luminal hemoglobin exhibits a pronounced reduction in band intensity over time: from 100% at 6 h (reference) to approximately 92% at 12 h, 87% at 24 h, a sharp drop to 45% at 36 h, and a further decrease to 32% at 48 h. This suggests that luminal hemoglobin is more rapidly degraded during blood digestion (Figure S5A). In contrast, the PM-associated hemoglobin shows a more gradual decrease in intensity: it starts at 100% at 6 h (reference), decreases slightly to 97% at 12 h and

around 95% at 24 h, and declines mildly to 92% at 36 h, with a moderate reduction to 88% at 48 h (Fig. S5B).

These findings indicate that luminal hemoglobin is subject to faster degradation, with a sharp decline after 24 h, while PM-associated hemoglobin remains relatively stable throughout digestion. This suggests that the association with the peritrophic matrix provides some level of protection against proteolysis, contributing to a slower degradation rate for hemoglobin within the matrix during blood digestion.

3.9. Proteolytic Regulation of Heme Protein with *A. aegypti* Peritrophic Matrix: A Comparative SDS-PAGE Analysis

The SDS-PAGE analysis reveals distinct patterns in the 14 kDa hemoglobina band across different experimental treatments, providing insights into the dynamics of hemoglobin– peritrophic matrix interactions in *A. aegypti* (Figure 10). In the control blood-fed mosquitoes (lanes 1–3), the 14 kDa band exhibits a clear temporal progression, with the band intensity increasing substantially from 2 to 6 h post-feeding. This progressive accumulation suggests a time-dependent incorporation of hemoglobin into the peritrophic matrix during the early phases of blood digestion. When examining the effect of proteolytic activity, the samples treated with exogenous trypsin (lanes 4–6) display a markedly reduced intensity of the 14 kDa band compared to the controls. This reduction is particularly evident across all time points, indicating that enhanced proteolytic activity significantly impairs hemoglobina association with the peritrophic matrix. The diminished band intensity suggests that trypsin actively degrades hemoglobin before it can establish stable interactions with the matrix. Conversely, When the proteolytic activity was suppressed using trypsin inhibitor (lanes 7–9), the 14 kDa band maintained a robust intensity throughout the experimental time course. The preservation of a strong band intensity under these conditions demonstrates that the inhibition of

proteolytic activity effectively protects hemoglobin from degradation, allowing for sustained association with the peritrophic matrix. These findings collectively demonstrate that the association of hemoglobin with the peritrophic matrix is dynamically regulated by proteolytic activity, with proteolysis serving as a key modulator of this interaction.

The bar graph (Figure S6) quantifies the intensity of the 14 kDa hemoglobin band across treatments, using plasma + hemoglobin as the reference (100%). The control blood samples show high intensities at early time points (92% at 2 h, 90% at 4 h, and 85% at 6 h). In contrast, the trypsin-treated samples exhibit significantly lower intensities (25% at 2 h, 20% at 4 h, and 18% at 6 h). Notably, the trypsin inhibitor-treated samples maintain high band intensities throughout the experiment (80% at 2 h, 95% at 4 h, and 100% at 6 h). This quantitative analysis confirms that the trypsin inhibitor effectively preserves the hemoglobina association with the peritrophic matrix, providing protection Against enzymatic degradation.

3.10. Analysis of Heme Protein Binding to *A. aegypti* Peritrophic Matrix by SDS-PAGE

The 15% SDS-PAGE analysis and the peritrophic matrix (PM) of *A. aegypti* (Figure 11) The gel displays a molecular weight marker (lane M) with proteins ranging from 14 to 94 kDa as reference standards. In lanes 1 and 2, where the PM samples from mosquitoes fed with plasma and plasma plus albumin were applied, respectively, very similar protein profiles with faint bands are observed, suggesting that albumin was degraded without associating with the PM. As a control, lane 3 shows the commercial albumin with an intense band at approximately 67 kDa. The commercial myoglobin (lane 4) exhibits a prominent band around 20 kDa, and this same pattern is observed in lane 5, where the PM samples from mosquitoes fed with plasma plus myoglobin were applied, indicating specific association of this protein with the PM. Similarly, the commercial

cytochrome C (lane 7) shows a characteristic band at approximately 14 kDa, which is also observed in lane 6, corresponding to the PM from mosquitoes fed with plasma plus cytochrome C. These results clearly demonstrate that heme-containing proteins, such as myoglobin and cytochrome C, are capable of specifically associating with the PM, unlike albumin, which does not exhibit this capability.

4. Discussion

The PM is a multifaceted structure critical to mosquito blood digestion, serving as both a physical barrier and a biochemical regulator. Its antioxidant role is particularly significant, as the PM binds a large proportion of free heme, thereby protecting the intestinal epithelium from oxidative damage. PM synthesis begins 2–6 h post-blood ingestion and is fully formed by 24 h, persisting for approximately 48 h before being excreted [23,33].

Our findings highlight the dynamic interaction between hemoglobin and the PM during blood digestion. Confocal microscopy revealed specific and organized binding of hemoglobin to chitin within the PM, with hemoglobin localized throughout the PM structure. This binding appears to occur via strong and stable hydrogen bonds, as confirmed by molecular docking analysis. The interactions involve key residues in the alpha and beta subunits of hemoglobin, forming bonds with chitin oligosaccharides (NAG)₄ at distances less than 4 Å, which are essential for maintaining the stability of the hemoglobin-chitin complex [34,35].

The electrophoretic analysis of PM proteins revealed several prominent bands, particularly at approximately 43, 30, and 14 kDa, which corresponded to hemoglobin subunits. Additionally, the tetrameric form of hemoglobin was also observed in the gels, albeit as a weaker band, suggesting its lower abundance compared to the subunits, each with a molecular weight of around 17 kDa [36,37]. These results suggest that hemoglobin association with the PM may provide structural stability similar to that conferred by peritrophins, key PM proteins that interact with chitin via chitin-binding domains [17,38].

The temporal regulation of hemoglobin-PM interaction further underscores the complexity of this relationship. Hemoglobin binds preferentially to the PM during the first hours post-blood feeding, a period characterized by low proteolytic activity. This

early interaction coincides with PM formation, ensuring that hemoglobin associated with the PM is protected from luminal proteolysis during the later stages of digestion. Additionally, literature reports showing the presence of proteolytic enzymes associated with the PM of mosquitoes [39,40] indicate the potential for localized hemoglobin hydrolysis directly at the PM surface. This spatial organization would establish an efficient system where the released heme could be immediately sequestered by binding sites within the PM, thereby reducing the free heme concentration in the midgut lumen and minimizing oxidative stress. As hemoglobin is hydrolyzed in the PM, additional hemoglobin could be dynamically recruited to the matrix in a controlled process of heme release and sequestration, creating a sustained mechanism for heme detoxification.

Affinity chromatography and molecular docking studies confirmed that hemoglobin binds directly to chitin, while heme alone lacks affinity for the PM, suggesting that the protein moiety drives this interaction. Interestingly, other heme-containing proteins, such as myoglobin and cytochrome C, also exhibited binding to the PM, likely mediated by peritrophins with heme-binding domains [22]. These findings support a dual mechanism of interaction: direct protein-chitin binding and mediation through heme-binding peritrophins. The peroxidase-like activity of hemoglobin further highlights the functional implications of their association with the PM. By stabilizing these proteins within its structure, the PM not only regulates heme release but also mitigates oxidative stress, maintaining gut homeostasis during digestion.

Another notable observation was the greenish coloration of the midgut 72 h post-feeding, indicative of biliverdin synthesis catalyzed by heme oxygenase, which breaks down heme into biliverdin, Fe, and carbon monoxide [41, 42]. This suggests that at later stages of digestion, when the PM begins to degrade, residual heme is processed by the intestinal epithelium.

These findings illustrate the intricate interplay between hemoglobin and the PM, with implications for mosquito physiology and vector control. The ability of hemoglobin to contribute to PM stability and function underscores its importance in mosquito digestion, while the selective binding mechanisms provide potential targets for disrupting mosquito survival. Further research should explore these molecular interactions to identify innovative strategies for mosquito control.

5. Conclusions

This study offers valuable insights into the structural and functional roles of the PM in *A. aegypti*. Far from being a simple passive barrier, the PM emerges as an active player in the digestion process, forming specific and organized interactions with hemoglobin. Through confocal microscopy, molecular docking, and biochemical analyses, we demonstrated that hemoglobin binds to the PM in a highly structured manner, driven by direct protein-chitin interactions and mechanisms mediated by peritrophins.

The differences in degradation patterns between luminal and PM-associated hemoglobin highlight the protective role of the PM, by protecting hemoglobin from luminal proteolysis while allowing for its localized and more coordinated degradation at the PM, thereby regulating the release of heme. The PM not only shields the gut from oxidative damage, but also maintains its structural integrity. This dual role underscores the PM's importance as a critical adaptation for blood-feeding mosquitoes.

Additionally, this study sheds light on the specificity of protein-chitin interactions within the PM. Hemoglobin's strong and selective binding to the PM points to a mechanism that could be leveraged for mosquito control. Disrupting these interactions or impairing PM formation could interfere with mosquito digestion and reduce their survival, offering promising avenues for combating mosquito-borne diseases.

Overall, our findings deepen the understanding of mosquito physiology and open new possibilities for innovative vector control strategies, paving the way for improved disease management and prevention efforts.

6. References

1. WHO—World Health Organization. *Mosquito-Borne Diseases*; WHO: Geneva, Switzerland, 2021. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> (accessed on 5 December 2023).
2. WHO—World Health Organization. *Dengue—Global Situation*; WHO: Geneva, Switzerland, 2023. Available online: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498> (accessed on 8 January 2023).
3. Soni, S.; Gill, V.J.S.; Anusheel Singh, J.; Chhabra, J.; Gill, G.J.S.; Bakshi, R. Dengue, chikungunya, and zika: The causes and threatsof emerging and re-emerging arboviral diseases. *Cureus* **2023**, *15*, e30633.
4. Clements, A.N. *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition, and Reproduction*; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 1992; Volume 1, p. 509.
5. Hegedus, D.; Erlandson, M.; Gillott, C.; Toprak, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.* **2009**, *54*, 285–302.
6. Cui, Y.; Niu, G.; Li, V.L.; Wang, X.; Li, J. Analysis of blood-induced *Anopheles gambiae* midgut proteins and sexual stage *Plasmodium falciparum* interaction reveals mosquito genes important for malaria transmission. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14316.
7. Lehane, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* **1997**, *42*, 525–550.
8. Zha, X.L.; Wang, H.; Sun, W.; Zhang, H.Y.; Wen, J.; Huang, X.Z.; Lu, C.; Shenm, Y.H. Characteristics of the peritrophic matrix of the silkworm, *Bom byx mori* and factors influencing its formation. *Insects* **2021**, *12*, 516.
9. Gabrieli, P.; Caccia, S.; Varotto-Boccazzi, I.; Arnoldi, I.; Barbieri, G.; Comandatore, F.; Epis, S. Mosquito trilogy: Microbiota, immunity and pathogens, and their implications for the control of disease transmission. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 630438.
10. Song, X.; Zhou, H.; Wang, J. Cell wall components of gut commensal bacteria stimulate peritrophic matrix formation in malária vector mosquitoes through activation of the IMD pathway. *PLoS Biol.* **2025**, *23*, e3002967.
11. Bolognesi, R.; Terra, W.R.; Ferreira, C. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency. Theoretical and experimental models. *J. Insect Physiol.* **2008**, *54*, 1413–1422.
12. Talyuli, O.A.C.; Oliveira, J.H.M.; Bottino-Rojas, V.; Silveira, G.O.; Alvarenga, P.H.; Kantor, A.M.; Paiva-Silva, G.O.; Barillas-Mury, C.; Oliveira, P.L. The *Aedes aegypti* peritrophic matrix controls arbovirus vector competence through HPx1, a heme-induced peroxidase. *PLoS Pathog.* **2023**, *19*, e1011121.
13. Abraham, E.G.; Jacobs-Lorena, M. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *34*, 667–671.

14. Rodgers, F.H.; Gendrin, M.; Wyer, C.A.S.; Christophides, G.K. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006391.
15. Wang, Y.; Cheng, J.; Luo, M.; Wu, J.; Guo, G. Identifying and characterizing a novel peritrophic matrix protein (MdPM-17) associated with antibacterial response from the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J. Insect Sci.* **2020**, *20*, 53.
16. Peters, W. Peritrophic membrane. In *Zoophysiology*; Bradshaw, S.D., Burggren, W., Heller, H.C., Ishii, S., Langer, H., Neuweiler, G., Randall, D.J., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1992; Volume 30, pp. 87–101.
17. Tellam, R.L. The peritrophic matrix. In *Biology of the Insect Midgut*, 1st ed.; Lehane, M.J., Billingsley, P.F., Eds.; Chapman & Hall: London, UK, 1996; pp. 86–114.
18. Zha, X.L.; Yu, X.B.; Zhang, H.Y.; Wang, H.; Huang, X.Z.; Shen, Y.H.; Lu, C. Identification of peritrophins and antiviral effect of Bm01504 against BmNPV in the silkworm, *Bom byx mori*. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7973.
19. Ahmed, M.H.; Ghatge, M.S.; Safo, M.K. Hemoglobin: Structure, function and allostery. *Subcell. Biochem.* **2020**, *94*, 345–382.
20. Mozzarelli, A.; Ronda, L.; Faggiano, S.; Bettati, S.; Bruno, S. Haemoglobin-based oxygen carriers: Research and reality towards an alternative to blood transfusions. *Blood Transfus.* **2010**, *8* (Suppl. S3), s59–s68.
21. Lukin, J.A.; Ho, C. The structure–function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1219–1230.
22. Devenport, M.; Alvarenga, H.P.; Shao, L.; Fujioka, H.; Bianconi, L.M.; Oliveira, L.P.; Jacobs-Lorena, M. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCI as a heme-binding protein. *Biochemistry* **2006**, *45*, 9540–9549.
23. Pascoa, V.L.; Oliveira, P.L.; Dansa-Petretski, M.; Silva, J.R.; Alvarenga, P.H.; Jacobs-Lorena, M.; Lemos, F.J.A. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *32*, 517–523.
24. Ponka, P. Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.* **1999**, *318*, 241–256.
25. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *280*, 1–8.
26. Ryter, S.W.; Tyrrell, R.M. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity—Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 289–309.
27. Romoser, W.S. The vector alimentary system. In *The Biology of Disease Vectors*, 1st ed.; Beaty, B.J., Marquardt, W.C., Eds.; University Press of Colorado: Louisville, CO, USA, 1996.

28. Noriega, F.G.; Wells, M.A. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **1999**, *45*, 613–620.
29. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Randall, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
30. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
31. Schagger, H.; Von Jagow, G. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **1987**, *166*, 368–379.
32. Francis, R.T., Jr.; Becker, R.R. Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. *Anal. Biochem.* **1984**, *136*, 509–514.
33. Okuda, K.; Souza Caroci, P.E.M.; Ribolla, A.G.; Bianchi, A.T.; Bijovsky, A.T. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue Cell* **2002**, *34*, 210–219.
34. Baker, E.N.; Hubbard, R.E. Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1984**, *44*, 97–179.
35. Steiner, T. The Hydrogen Bond in the Solid State. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 48–76.
36. Nagatomo, S.; Nagai, Y.; Aki, Y.; Sakurai, H.; Imai, K.; Mizusawa, N.; Ogura, T.; Kitagawa, T.; Nagai, M. An Origin of Cooperative Oxygen Binding of Human Adult Hemoglobin: Different Roles of the α and β Subunits in the $\alpha_2\beta_2$ Tetramer. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135080.
37. Nishi, H.; Inagi, R.; Kato, H.; Tanemoto, M.; Kojima, I.; Son, D.; Fujita, T.; Nangaku, M. Hemoglobin is expressed by mesangial cells and reduces oxidant stress. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *19*, 1500–1508.
38. Guney, G.; Cedden, D.; Hanniger, S.; Hegedus, D.D.; Heckel, D.G.; Toprak, U. Peritrophins are involved in the defense Against *Bacillus thuringiensis* and nucleopolyhedrovirus formulations in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2024**, *166*, 105217.
39. Dinglasan, R.R.; Alaganan, A.; Ghosh, A.K.; Saito, A.; van Kuppevelt, T.H.; Jacobs-Lorena, M. *Plasmodium falciparum* ookinetes require mosquito midgut chondroitin sulfate proteoglycans for cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15882–15887.
40. Whiten, S.R.; Ray, W.K.; Helm, R.F.; Adelman, Z.N. Characterization of the adult *Aedes aegypti* early midgut peritrophic matrix proteome using LC-MS. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194734.

41. Maines, M.D. Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical applications. *FASEB J.* **1988**, 2, 2557–2568.
42. Ohashi, T.; Mizutani, A.; Murakami, A.; Kojo, S.; Ishii, T.; Taketani, S. Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: Formation of fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Lett.* **2002**, 511, 21–27.

List of figures

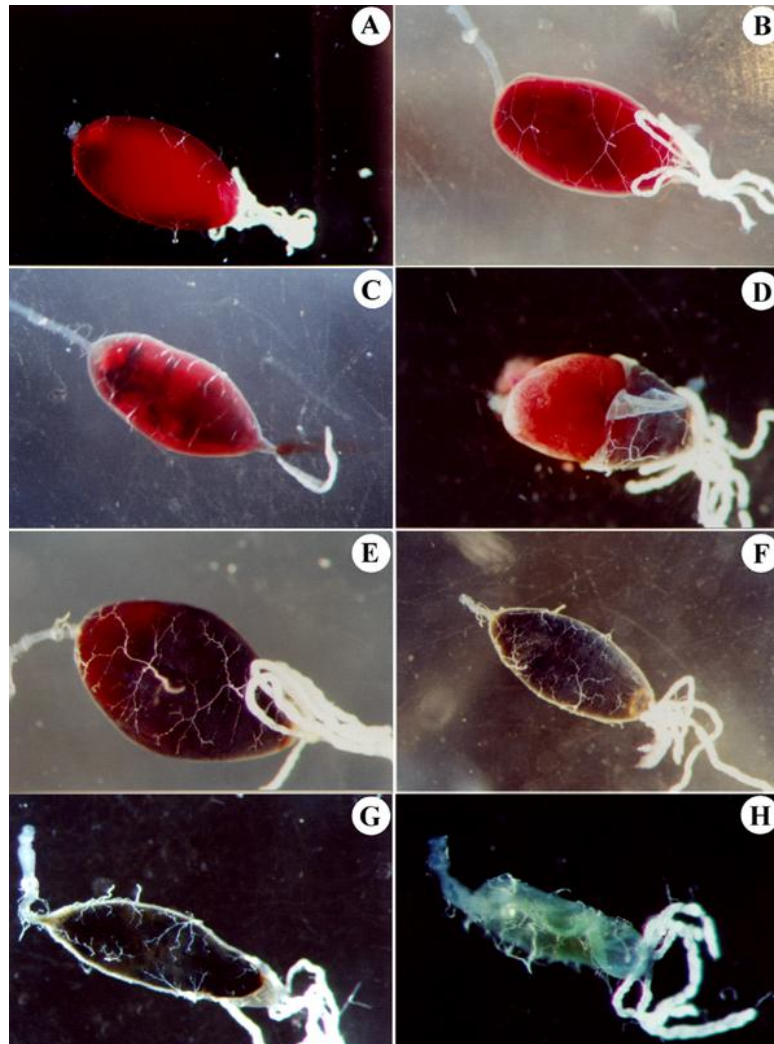


Figure 1. Temporal analysis of *A. aegypti* midgut morphology during blood digestion by optical microscopy.

Images show the progressive changes in the blood bolus at different time points after blood feeding: (A) 30 min, showing initial blood meal encapsulation; (B) 4 h and (C) 6 h, demonstrating complete blood bolus formation; (D) 16 h, with partially removed intestinal epithelium revealing the PM-enclosed blood bolus; (E) 22 h and (F) 30 h, showing progressive darkening and compaction of the blood bolus; and (G) 54 h and (H) 72 h, displaying advanced digestion stages with significant reduction in bolus size. Note the characteristic network-like structure of the PM visible throughout the digestion process. Magnifications: (A-D, F): 25x; (E, G): 40x; (H): 66x.

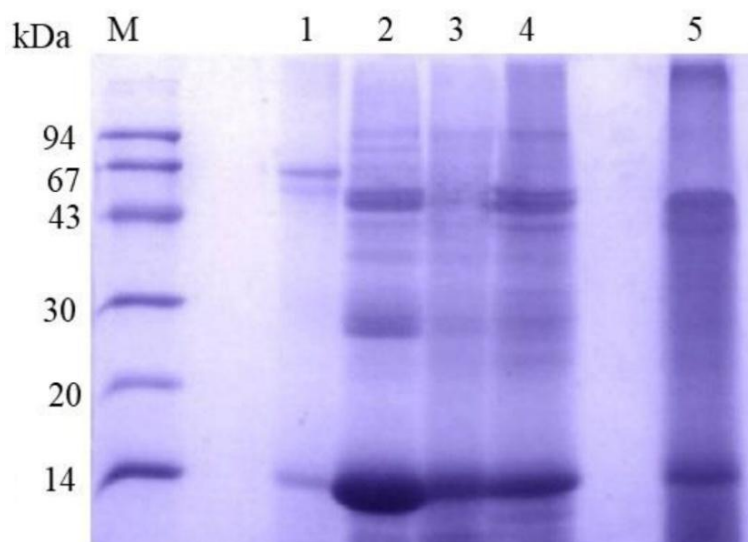


Figure 2. SDS-PAGE analysis of sequential protein extraction from *A. aegypti* peritrophic matrix (PM) using solutions with varying extraction efficiencies.

Lane M: Molecular mass markers (94, 67, 43, 30, 20, and 14 kDa). Extraction conditions: lane 1: water extraction; lane 2: Tris-HCl/NaCl buffer containing EDTA and PMSF; lane 3: Tris-HCl/NaCl buffer containing Triton X-100 and PMSF; lane 4: Tris-HCl/NaCl buffer containing urea and PMSF; lane 5: Laemmli sample buffer. Note the differential protein extraction patterns, particularly for proteins between 14-94 kDa, demonstrating varying extraction efficiencies of different buffer compositions. The 14 kDa band is notably present across different extraction methods, suggesting its consistent association with the PM.

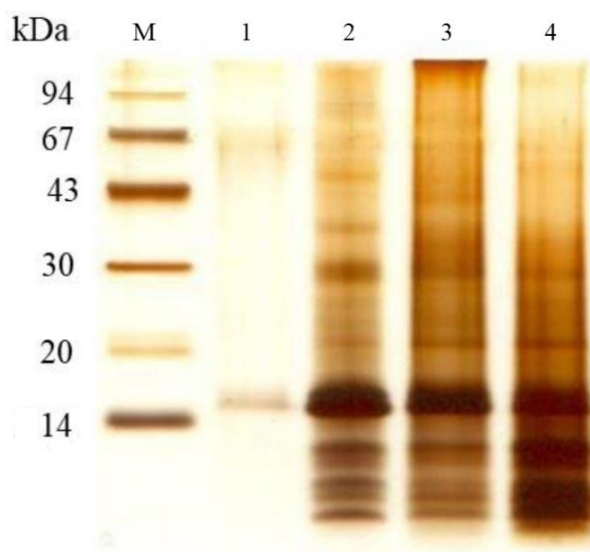


Figure 3. Tricine-SDS-PAGE analysis of sequential proteins extracted from peritrophic matrix of *A. aegypti* using solutions with varying extraction efficiencies.

The gel contained a total concentration of 10% acrylamide and bis-acrylamide (10%T) and a crosslinker ratio of 3% (3%C). The proteins were visualized using silver nitrate staining. Lane M: Molecular mass markers (94, 67, 43, 30, 20, and 14 kDa). Extraction conditions: lane 1: water extraction; lane 2: Tris-HCl/NaCl buffer containing EDTA and PMSF, showing enhanced protein extraction; lane 3: Tris-HCl/NaCl buffer containing urea and PMSF, demonstrating differential protein solubilization and lane 4: Laemmli sample buffer extraction. Note the distinct protein profiles obtained with each extraction method, particularly in the low molecular weight range, revealing the complexity of PM-associated proteins and the efficiency of different extraction protocols.

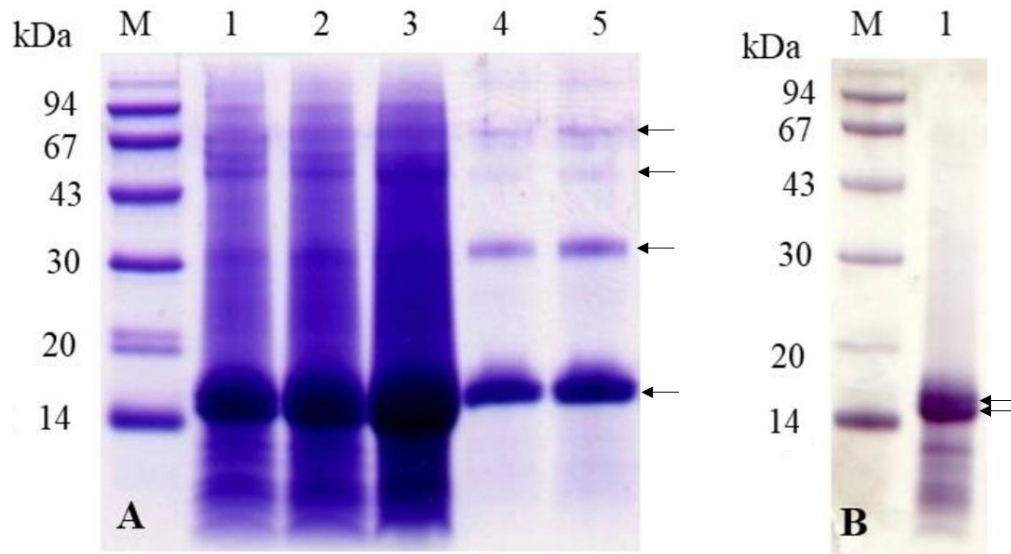


Figure 4. Analysis of *A. aegypti* peritrophic matrix (PM) proteins and commercial bovine hemoglobin by electrophoresis.

(A) Tricine-SDS-PAGE contained a total concentration of 10% acrylamide and bis-acrylamide (10%T) and a crosslinker ratio of 3% (3%C). The gel was stained with Coomassie blue showing protein profiles from different PM quantities and purified hemoglobin. Lane M: molecular mass markers (94, 67, 43, 30, 20, and 14 kDa); lanes 1-3: proteins extracted from 2, 4, and 8 PMs, respectively; and lanes 4-5: commercial bovine hemoglobin (5 µg and 10 µg). The arrows indicate, from top to bottom, the tetrameric, trimeric, dimeric, and monomeric forms of bovine hemoglobin. (B) SDS-PAGE analysis demonstrating the presence of protein dimers in PM extracts. Lane M: molecular mass markers; lane 1: protein extract from a single *A. aegypti* PM. The two arrows indicate the alpha and beta subunits of bovine hemoglobin.

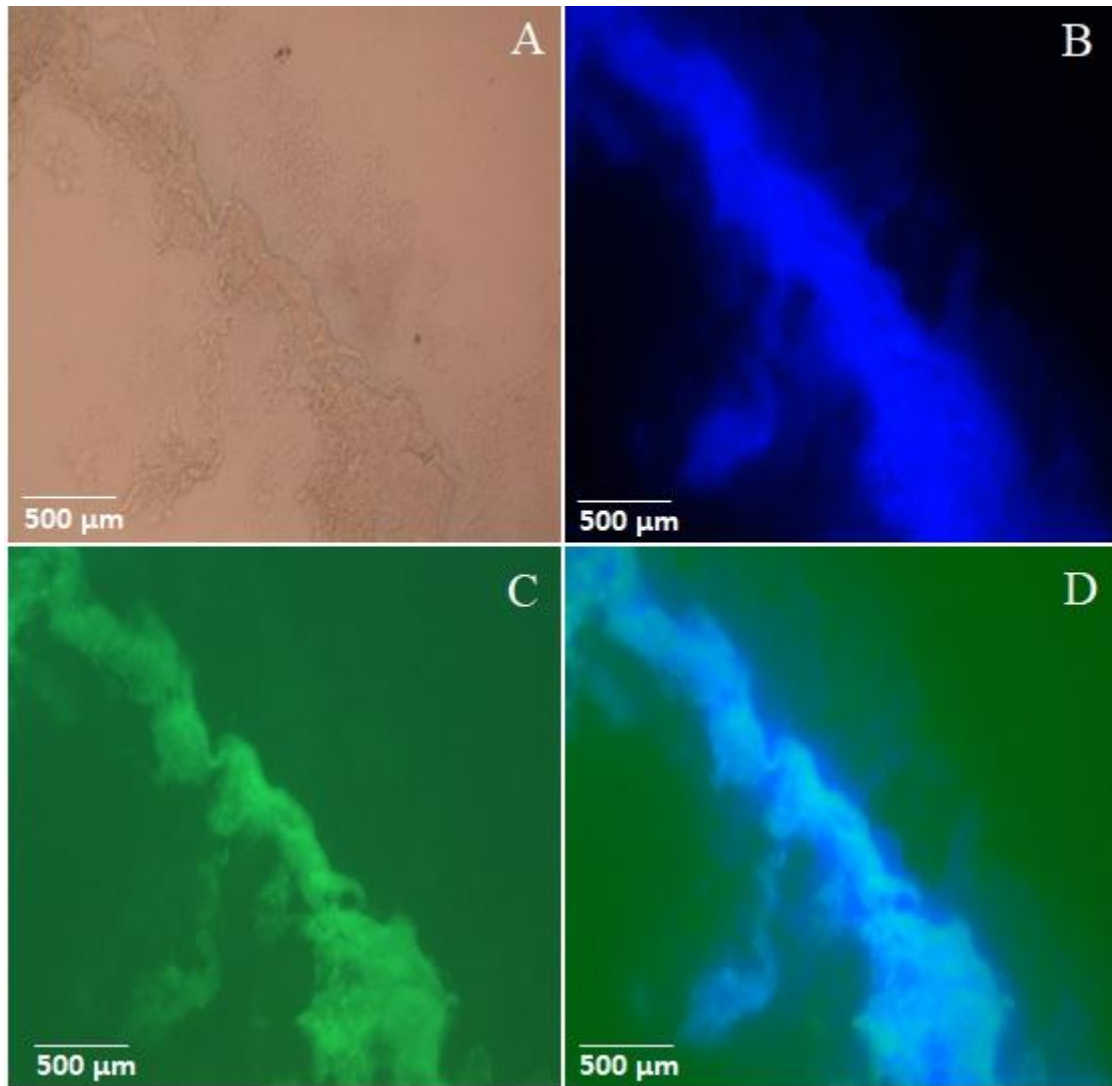


Figure 5. Visualization of hemoglobin-peritrophic matrix interaction in *A. aegypti* after 24h of artificial feeding (plasma + hemoglobin, 70 mg/mL) using epifluorescence microscopy.

- (A) Differential interference contrast (DIC) showing PM structure; (B) PM chitin network visualized by Calcofluor White staining (blue fluorescence); (C) immunolocalization of hemoglobin using Alexa Fluor-conjugated secondary antibody (green fluorescence); and (D) merged images showing co-localization of chitin and hemoglobin in the PM (ImageJ overlay). All images were captured at the same magnification (scale bar = 500 μ m). The fluorescence patterns demonstrate the specific association between hemoglobin and the PM chitin network during blood digestion.

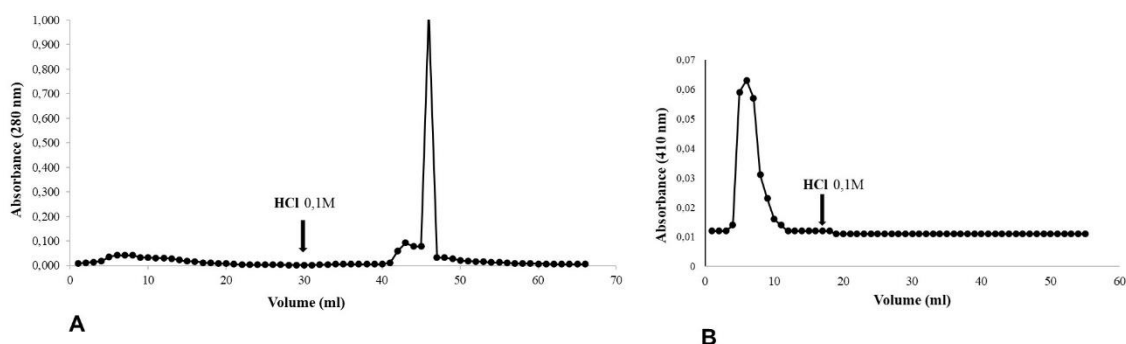


Figure 6. Analysis of chitin binding properties of hemoglobin and hemin using affinity chromatography.

(A) Chromatographic profile showing the interaction between hemoglobin and chitin matrix, monitored at 280 nm, demonstrating specific binding as evidenced by the elution peak after addition of 0.1 M HCl. (B) Chromatographic profile monitored at 410 nm showing lack of interaction between hemin and chitin matrix, as indicated by the absence of significant elution peak after HCl addition. Both experiments were performed using 0.1 M sodium acetate buffer (pH 6.0) for equilibration. Fractions of 1 mL were collected at one-minute intervals. The results demonstrate that while hemoglobin exhibits specific binding to the chitin matrix, hemin does not show affinity under the same experimental conditions.

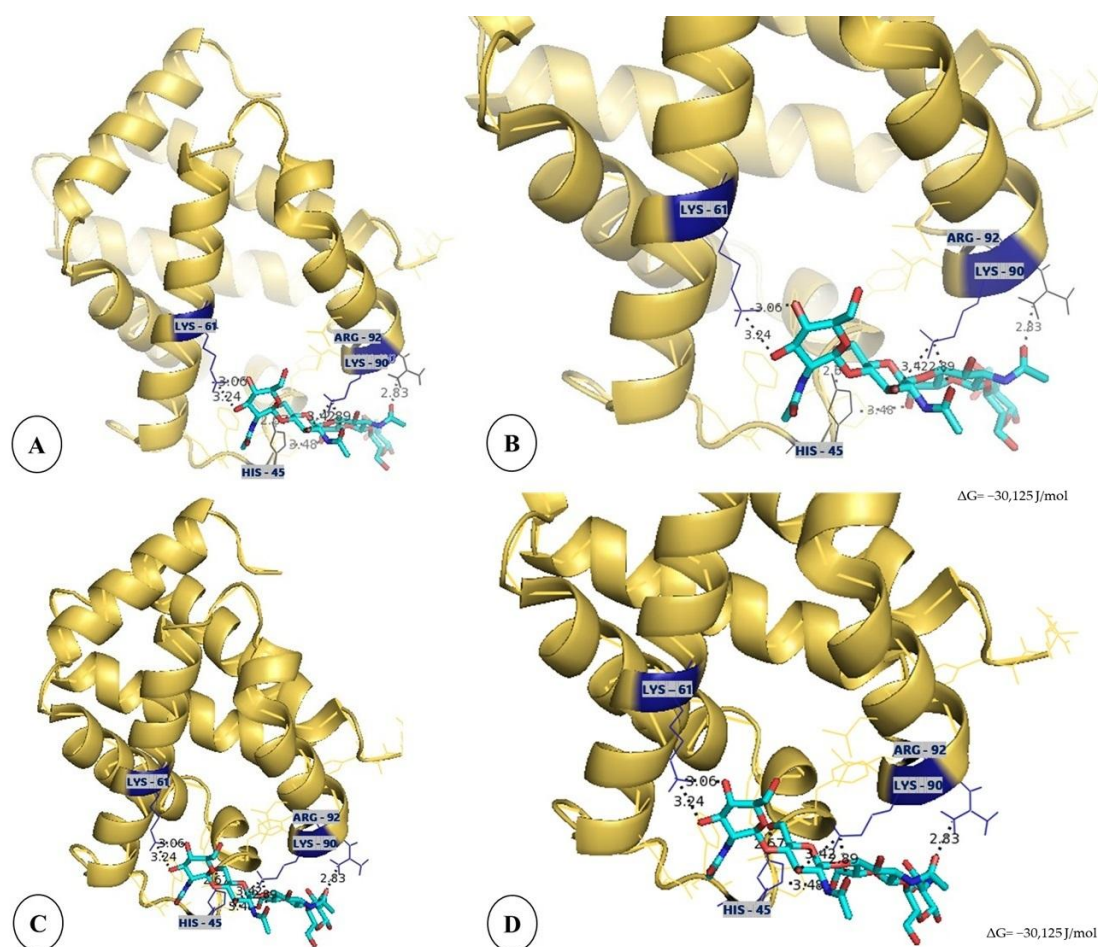


Figure 7. Molecular docking demonstrating the possible molecular interactions between bovine hemoglobina (golden color) and the oligosaccharide (NAG)₄ (blue-green color) using DockThor v.2 software.

(A) Three-dimensional structure of the alpha subunit of hemoglobin showing the bond with (NAG)₄. (B) Enlargement of the alpha subunit showing the amino acid residues involved in the interaction: lysine (LYS 61 and LYS 91), arginine (ARG 92) and histidine (HIS 45), with the formation of hydrogen bonds (distances < 4 Å). (C) Three-dimensional structure of the beta subunit of hemoglobin showing the interaction with (NAG)₄. (D) Enlargement of the beta subunit highlighting the binding residues, the same ones identified in the alpha subunit, confirming similar interactions with $\Delta G = -30,125\text{J/mol}$.

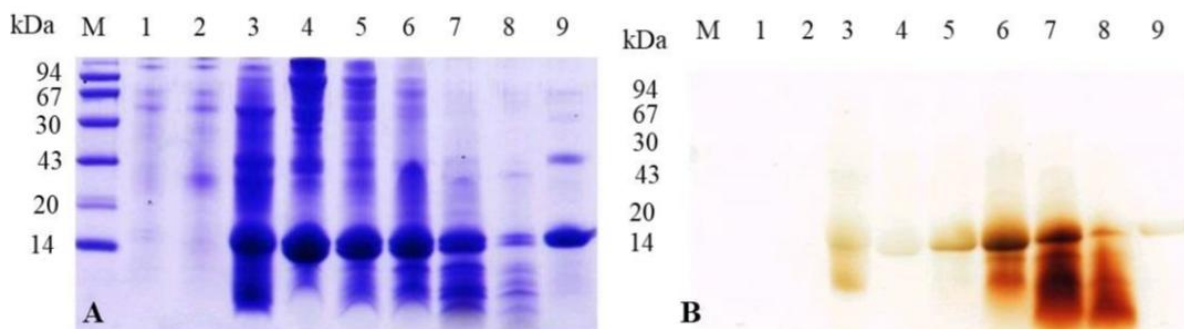


Figure 8. Analysis of hemoglobin binding and peroxidase activity in *A. aegypti* peritrophic matrix during blood digestion.

(A) Coomassie-stained SDS-PAGE showing protein profiles and (B) DMB-stained gel revealing peroxidase activity of PM-associated proteins. Lane M: molecular mass markers (94, 67, 43, 30, 20, and 14 kDa); lanes 1-9: PM samples from mosquitoes fed with: plasma+albumin (1), plasma+hemin (2), plasma+hemoglobin (3), blood samples collected at different time points after feeding – 6 h (4), 12 h (5), 24 h (6), 36 h (7), 48 h (8), and commercial bovine hemoglobin (10 µg) as reference (9). Note the distinct 14 kDa hemoglobin band patterns across different feeding conditions and time points, and the corresponding peroxidase activity revealed by DMB staining. The temporal analysis demonstrates the progressive changes in both protein content and enzymatic activity during the digestive process.

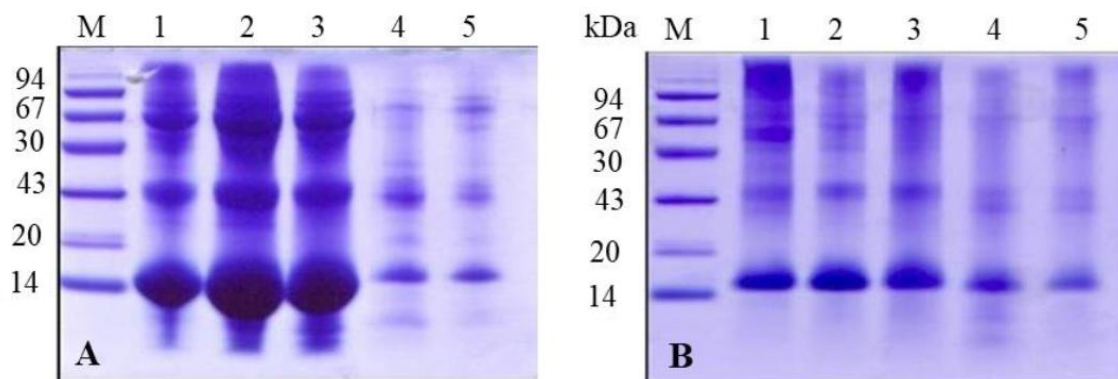


Figure 9. Comparative analysis of hemoglobin degradation in luminal content and peritrophic matrix during blood digestion by SDS-PAGE (15%).

(A) Protein profile of luminal hemoglobin and (B) PM-associated hemoglobin showing temporal changes in protein content. Lane M: molecular mass markers (94, 67, 43, 30, 20, and 14.4 kDa); lanes 1-5: samples collected at different time points after blood feeding – 6 h (1), 12 h (2), 24 h (3), 36 h (4), and 48 h (5). Note the differential degradation patterns between luminal and PM-associated hemoglobin, particularly the 14 kDa band intensity changes over time.

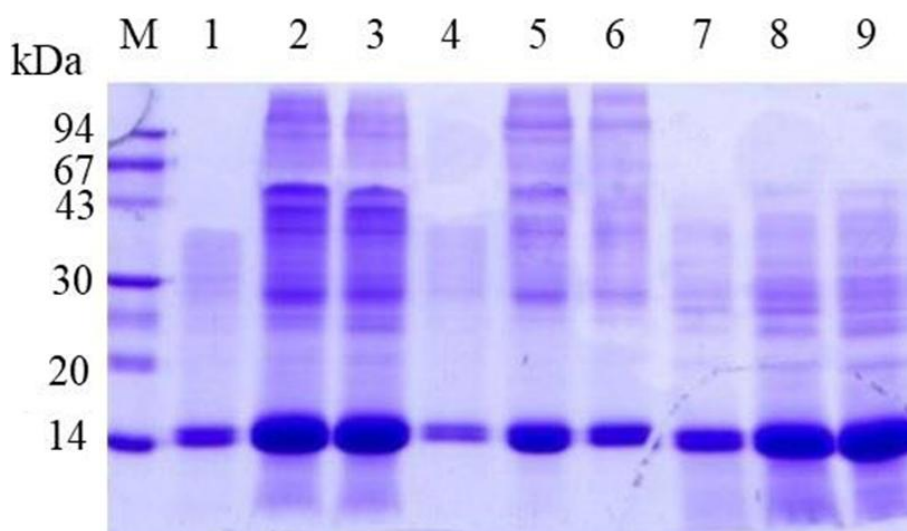


Figure 10. Temporal analysis of proteolytic effects on hemoglobin binding to *Aedes aegypti* peritrophic matrix. Proteins were separated by 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue.

Lane M: molecular mass standards (94, 67, 43, 30, 20, and 14 kDa). Time-course analysis of peritrophic matrix protein profiles from mosquitoes fed with blood alone (lanes 1–3; 2 h, 4 h, and 6 h post-feeding), blood supplemented with exogenous trypsin (lanes 4–6; 2 h, 4 h, and 6 h post-feeding), or blood containing trypsin inhibitor (lanes 7–9; 2 h, 4 h, and 6 h post-feeding). The electrophoretic profile demonstrates differential hemoglobin association with the peritrophic matrix under varying proteolytic conditions, with prominent 14 kDa bands showing enhanced preservation in trypsin-inhibited samples and reduced intensity in trypsin-treated samples compared to controls.

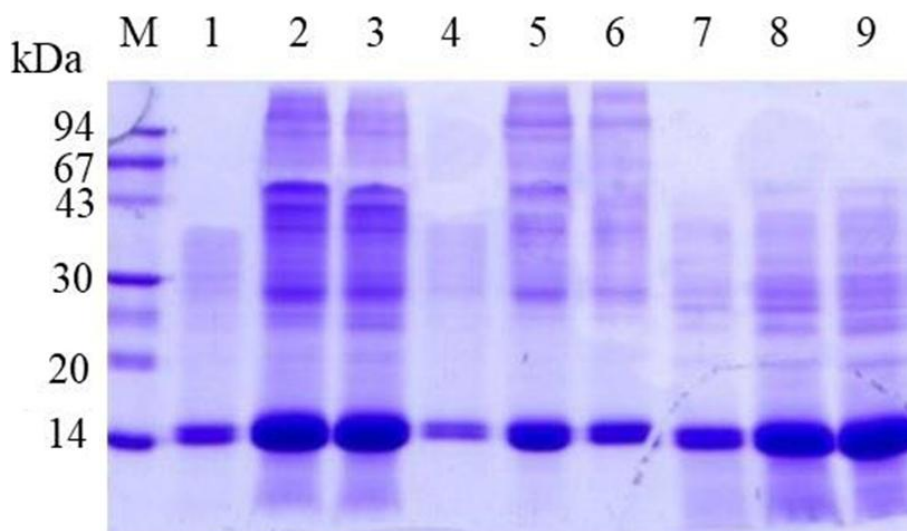


Figure 11. Protein binding analysis of heme and non-heme proteins to *A. aegypti* peritrophic matrix by SDS-PAGE. Proteins were separated on 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue.

Lane M: Molecular mass markers (94, 67, 43, 30, 20, and 14 kDa). Peritrophic matrix protein profiles from mosquitoes fed with plasma alone (lane 1), plasma supplemented with albumin (lane 2), purified commercial albumin (lane 3), commercial myoglobin (lane 4), plasma supplemented with myoglobin (lane 5), plasma supplemented with cytochrome C (lane 6), and commercial cytochrome C (lane 7). The electrophoretic profile demonstrates selective binding of heme proteins (myoglobin and cytochrome C) to the peritrophic matrix, while non-heme proteins like albumin show no specific association.

Supplementary material

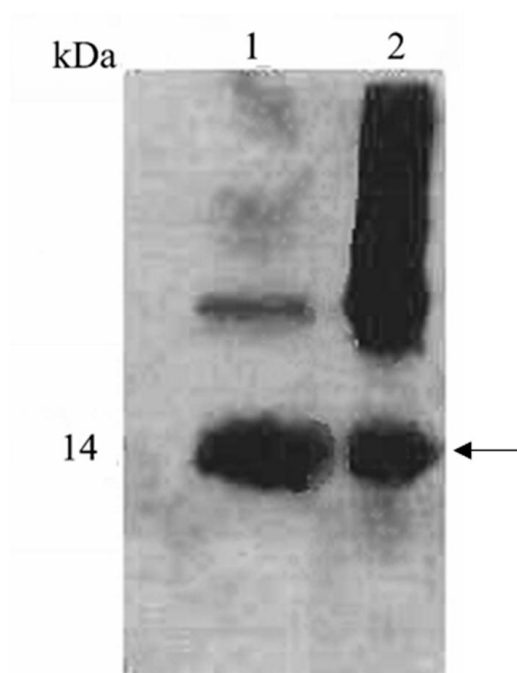


Figure S 1. Western blotting of proteins extracted from adult *A. aegypti* PM and revealed with an antibody against human hemoglobina.

Lane 1, proteins extracted from PM of blood-fed mosquitoes; lane 2, commercial bovine hemoglobin (10 μ g). The arrow indicates Hb monomers.

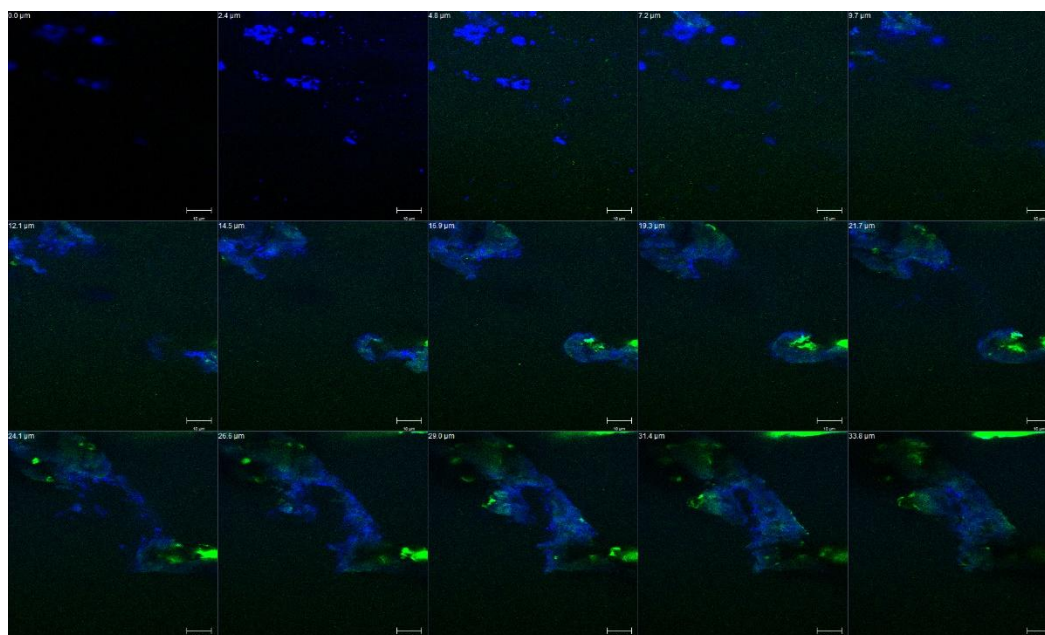


Figure S 2. Confocal fluorescence microscopy sequential optical sections showing the spatial distribution of hemoglobin and chitin (24h blood feeding).

Z-stack confocal microscopy analysis showing the spatial distribution of hemoglobin and chitin in *A. aegypti* peritrophic matrix (PM) after 24 hours of blood feeding with sheep blood. Sequential optical sections (0.3 μ m intervals) demonstrate the three-dimensional organization of the PM structure. Blue fluorescence indicates chitin network labeled with Calcofluor White, and green fluorescence shows immunolocalized hemoglobin detected using Alexa Fluor-conjugated goat anti-rabbit IgG. Images were acquired using ZEISS confocal microscope and processed with ZEISS Zen Lite software. Scale bars = 5

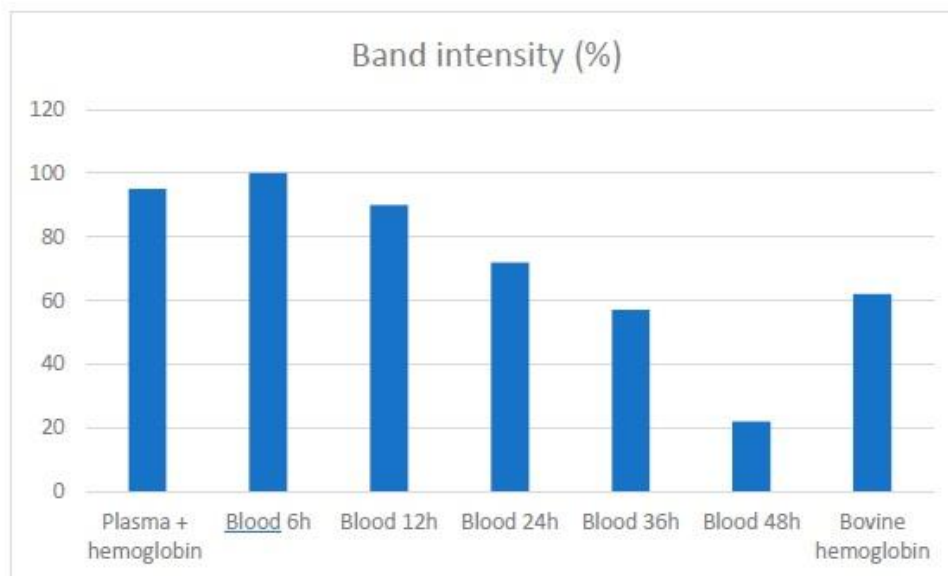
μm . The sequential z-stack analysis provides a comprehensive three dimensional visualization of the peritrophic matrix architecture, demonstrating how hemoglobin molecules integrate within the chitin network. By examining consecutive optical sections, we can observe the intricate spatial distribution of both components throughout different PM layers.



Figure S 3. Visualization of peritrophic matrix (PM) in *A. aegypti* midgut 24 hours after artificial feeding (plasma + albumin, 70 mg/mL) using epifluorescence microscopy.

(A) Differential interference contrast (DIC) showing PM structure; (B) PM chitin network visualized by Calcofluor White staining (blue fluorescence); (C) No specific fluorescence detected using anti-human hemoglobin antibody and Alexa Fluor-conjugated secondary antibody, demonstrating absence of hemoglobin binding to the PM under these feeding conditions. All images were captured at the same magnification (scale bar = 500 μm). The lack of green fluorescence in panel C indicates that hemoglobin does not associate with the PM chitin network when mosquitoes are fed an artificial meal lacking hemoglobin.

A



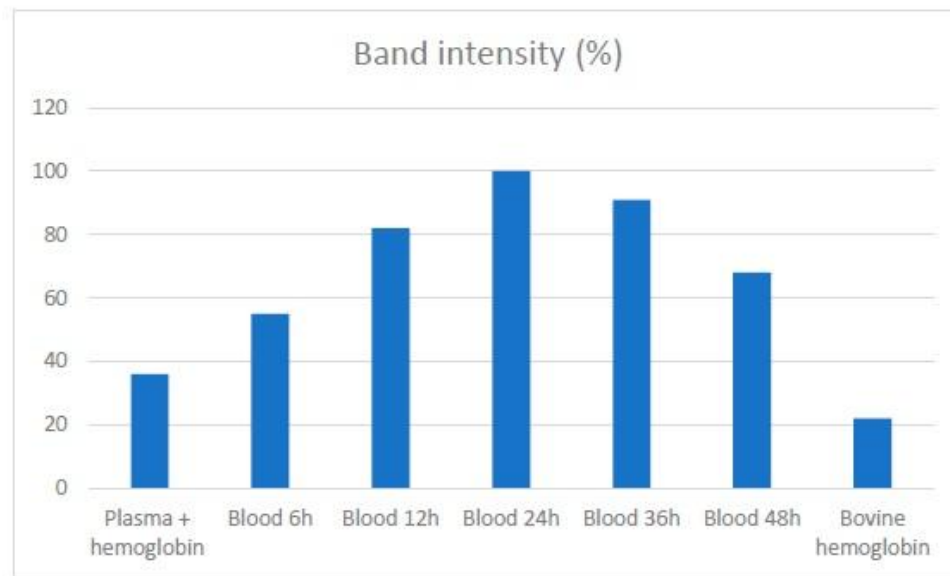
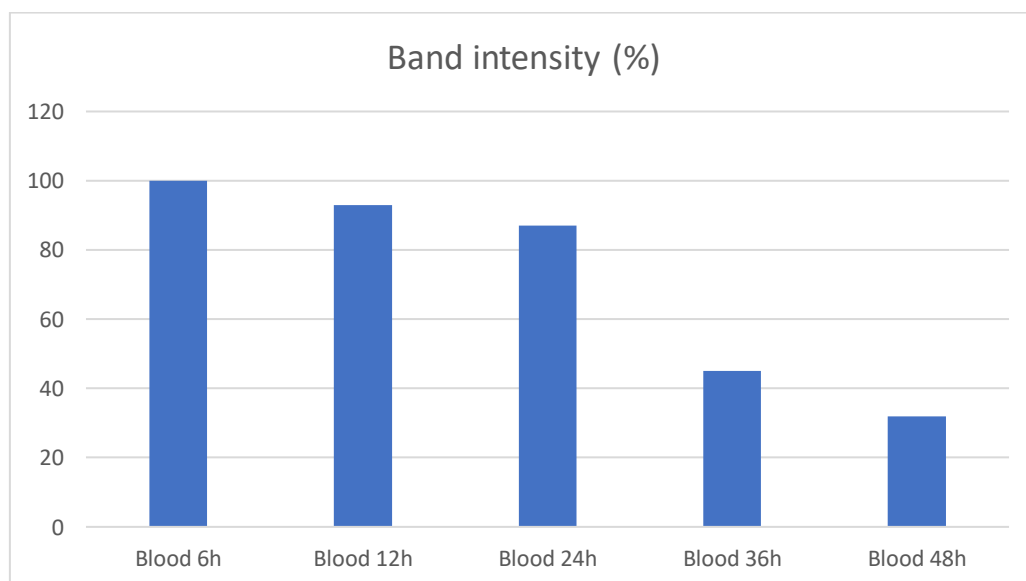
B

Figure S 4. Densitometric analysis of hemoglobin bands associated with *A. aegypti* peritrophic matrix

(A) Band intensity analysis of Coomassie-stained gel and (B) DMB-stained gel showing peroxidase activity. Values are expressed as percentage relative to plasma + hemoglobin (100%). Samples include plasma+hemoglobin (reference), blood samples collected at different time points (6 h, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h after feeding), and commercial bovine hemoglobin. The graphs show a progressive decrease in both protein content and peroxidase activity throughout the digestive process.

A

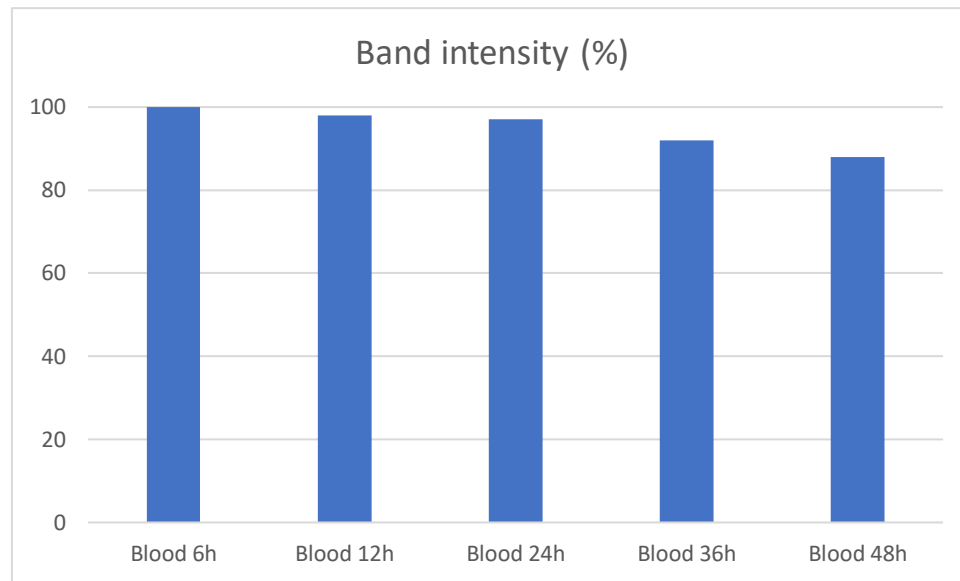


Figure S 5. Densitometric analysis of luminal and PM-associated hemoglobin during blood digestion in *A. aegypti*.

(A) Band intensity of luminal hemoglobin showing rapid degradation after 24 h, with values dropping from 100% (6 h) to approximately 32% (48 h). (B) Band intensity of PM-associated hemoglobin demonstrating gradual decrease over time, maintaining approximately 88% of initial intensity at 48 h. Values are expressed as percentage relative to 6 h samples (100%). Measurements were obtained from SDS-PAGE analysis of samples collected at 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h after blood feeding.

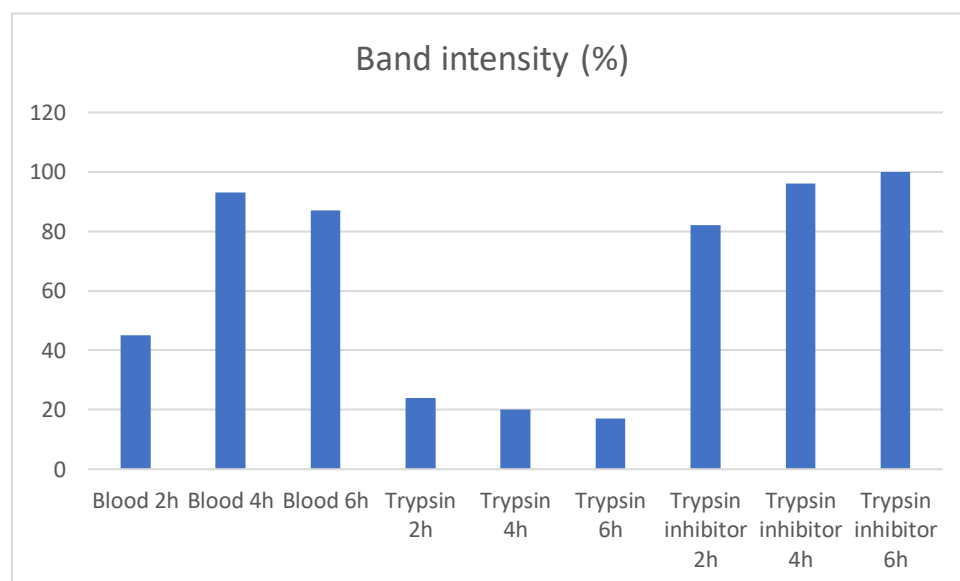


Figure S 6. Densitometric analysis of hemoglobina (14 kDa) associated with peritrophic matrix under different treatments.

Band intensities are expressed as percentage relative to trypsin inhibitor 6 h (100%). Samples include blood-fed controls (2 h, 4 h, and 6 h), trypsin-treated samples (2 h, 4 h, and 6 h), and trypsin inhibitor-treated samples (2 h, 4 h, and 6 h). The graph demonstrates reduced hemoglobin association in trypsin-treated samples and enhanced association in trypsin inhibitor-treated samples compared to blood-fed controls.

Capítulo II- Proteômica de larvas e mosquitos *A. aegypti* expostos ao grupo prostético heme

1. Introdução

O estresse oxidativo (EO) é um fenômeno biológico amplamente estudado devido à sua relevância em diversos organismos. Em insetos, esse processo assume particular importância, devido ao seu constante contato com estressores ambientais e metabólicos. Mosquitos, tal como *A. aegypti*, apresentam desafios únicos relacionados ao EO, especialmente devido à hematofagia e à exposição a inseticidas. Essas condições favorecem a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e causam pressões seletivas que tem, como consequência, a seleção de adaptações fisiológicas e bioquímicas (Oliveira *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015).

A necessidade de potenciais alvos e de estratégias mais eficazes para o controle de vetores tem motivado a utilização de técnicas avançadas de biologia molecular. Nesse contexto a proteômica tem se destacado como uma ferramenta essencial seleção de potenciais alvos para controle. Essa metodologia permite o mapeamento detalhado de proteínas e suas funções celulares, que pode revelar os mecanismos de resistência a inseticidas, respostas ao EO e adaptações metabólicas. Estudos proteômicos têm identificado potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de novos inseticidas e estratégias de manejo integrado (Fernandes *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 201).

Esta revisão explora as interações entre EO, a fisiologia dos insetos e mecanismos antioxidantes em mosquitos e o papel do heme no metabolismo e na geração de EO. Ela também revisa os principais avanços na aplicação da proteômica no estudo de mosquitos, evidenciando suas implicações para o controle de vetores e, como consequência, a redução das doenças transmitidas por insetos.

1.1. Estresse Oxidativo em Insetos

O EO ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade do organismo de neutralizá-las por meio de mecanismos antioxidantes (Pizzino *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2017). As EROs incluem radicais livres, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$), que podem resultar tanto de processos metabólicos normais quanto de respostas a estressores ambientais, como radiação e toxinas (Schieber e Chandel, 2014; Champion e Xu, 2018). Quando há acúmulo excessivo de EROs, estruturas celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, podem sofrer danos, o que pode levar a disfunções ou morte celular (An *et al.*, 2024).

Os insetos, devido à sua capacidade de colonizar vários nichos ecológicos, estão expostos a vários estressores ambientais em uma variedade de habitats. Assim, os insetos, como outros organismos, estão sujeitos ao EO após a exposição a agentes estressores tais como os herbicidas e inseticidas (Ahmad, 1995; Kodrík *et al.*, 2015) e também após a alimentação (Bi e Felton, 1995; Souza *et al.*, 1997). Além disso, flutuações térmicas de baixa temperatura e exposição a UV também promovem a formação de ERO e levam ao EO em insetos (Oliveira *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2009).

Para combater os efeitos das EROS, os insetos desenvolveram um conjunto de mecanismos de defesa antioxidante que envolvem componentes enzimáticos e não enzimáticos (Felton e Summers, 1995). Entre os componentes enzimáticos, destacam-se a superóxido dismutase presente no citosol e nas mitocôndrias, a catalase presente nos peroxissomos, a ascorbato peroxidase, a glutathione S-transferase peroxidase e o sistema tioredoxina/tioreductase (Chaitanya *et al.*, 2016).

Além dos sistemas clássicos de enzimas antioxidantes, várias moléculas pequenas podem ser sintetizadas pelos insetos que também desempenham um papel importante na eliminação de EROs; entre eles estão os carotenoides, α -tocoferol, ácido ascórbico e glutathione (GSH). Além disso, os insetos possuem moléculas solúveis em água tais como ácido úrico, carboidratos e polióis e proteínas de ligação ao ferro tais como a ferritina e a transferrina, que têm funções antioxidantes essenciais (Chaitanya *et al.*, 2016).

1.2. Estresse Oxidativo e os Impactos na Biologia dos Mosquitos

O estresse oxidativo (EO) desempenha um papel crucial na fisiologia, longevidade e competência vetorial dos mosquitos, sendo amplificado por fatores como pesticidas e infecções. Em *Anopheles gambiae*, o estado redox afeta diretamente a fecundidade e a resistência a inseticidas. O aumento do EO, induzido por compostos como paraquat (PQ) ou pela inibição de NADPH com 6-aminonicotinamida (6AN), prejudica a produção de ovos e aumenta os danos oxidativos. A suplementação com antioxidantes, como o licopeno, mitiga esses efeitos adversos, confirmando a relevância do EO. Além disso, a pré-exposição a 6AN aumenta a suscetibilidade de mosquitos resistentes ao DDT, indicando o potencial da manipulação do estado redox como estratégia de controle vetorial (Champion e Xu, 2018).

O impacto do EO também se reflete na longevidade dos mosquitos, que está diretamente ligada à competência vetorial. Em mosquitos resistentes a inseticidas, a superatividade de enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase e catalase,

contrabalança os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo a sobrevivência e eficácia vetorial (Oliver e Brooke, 2016). Em contraste, *Culex pipiens* apresenta redução na longevidade e sobrevivência durante o inverno devido aos custos metabólicos associados à resistência a inseticidas (Rivero *et al.*, 2010).

A relação entre resistência a inseticidas e competência vetorial é complexa e multifatorial. Em *A. gambiae* s.l., a resistência a piretróides aumenta a prevalência de infecções por *Plasmodium falciparum*, com maior número de oocistos e esporozoítos, parcialmente devido à superexpressão da lipoproteína lipophorin (Lp) (Adams *et al.*, 2023). Similarmente, o alelo de resistência no locus *kdr* em *Anopheles coluzzii* e *A. gambiae* S eleva a suscetibilidade ao *P. falciparum* em diferentes estágios do ciclo do parasito (Sokhna *et al.*, 2013).

Estudos com *Aedes albopictus* mostram que a evolução da resistência à deltametrina envolve custos genéticos iniciais que reduzem a aptidão reprodutiva e a competência vetorial para o vírus Dengue 2. No entanto, mutações compensatórias rapidamente restauram esses parâmetros, destacando a necessidade de rotacionar e inovar no uso de inseticidas (Gu *et al.*, 2023). A infecção pelo vírus chikungunya em células *A. aegypti*-derivadas (Aag2) revelou que o EO regula a replicação viral. Durante a infecção, há um aumento inicial de EROs, seguido por ativação de genes antioxidantes, e as EROs foram identificadas como reguladores chave da replicação viral, mediada pela via Imd e o fator Rel2 (Mehta *et al.*, 2024). Por fim, a alimentação múltipla com sangue foi identificada como uma adaptação que reduz o EO e aumenta a longevidade de mosquitos em ambientes tratados com inseticidas (Oliver e Brooke, 2016).

Conclui-se que o EO é um fator central na biologia dos mosquitos, mediando interações complexas entre longevidade, resistência a inseticidas e capacidade de transmissão de patógenos. Entender essas interações e os custos metabólicos associados é essencial para desenvolver estratégias de controle vetorial eficazes.

1.3. Adaptações Antioxidantes de Insetos Hematófagos

Os insetos hematófagos desenvolveram estratégias altamente especializadas para lidar com os desafios impostos pela ingestão de sangue, especialmente aqueles relacionados ao heme e ao EO. O heme, um grupo prostético essencial em organismos aeróbicos, desempenha papéis críticos em reações metabólicas e energéticas, como na transferência de elétrons e no fornecimento de oxigênio. No entanto, quando livre, é uma

molécula altamente tóxica devido ao seu potencial oxidativo, capaz de oxidar lipídios, proteínas e causar danos ao DNA (Immenschuh *et al.*, 2017).

Durante a digestão do sangue, grandes quantidades de heme são liberadas no intestino médio, gerando EROs em excesso, o que representa um desafio biológico significativo. Para mitigar os danos causados por essas EROs, mosquitos como *A. aegypti* desenvolveram defesas antioxidantes robustas. Enzimas como catalase, superóxido dismutase (SOD) e peroxidases neutralizam o excesso de EROs, protegendo as células e mantendo a homeostase celular (Graça-Souza *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2017). Adicionalmente, a produção de ácido xanturênico, que quela o heme e o ferro, previne danos às células do trato digestivo (Lima *et al.*, 2012). A digestão sanguínea também induz alterações metabólicas, como a fusão mitocondrial, que reduz a geração de EROs nas células musculares (Gonçalves *et al.*, 2009).

O heme modula a expressão de genes relacionados à imunidade, metabolismo energético e ciclo celular em *A. aegypti*, afetando diretamente a microbiota intestinal e a replicação de patógenos como o vírus da dengue (Oliveira *et al.*, 2011). Essa regulação multifacetada reforça o papel do heme como um modulador central na adaptação dos mosquitos à hematofagia e à transmissão de patógenos.

Para evitar a toxicidade do heme, os insetos hematófagos utilizam mecanismos específicos de excreção e conversão. Por exemplo, em *Rhodnius prolixus*, o heme é convertido em hemozoína, uma forma cristalina inerte (Stiebler *et al.*, 2010). Em *A. aegypti*, a matriz peritrófica, uma camada extracelular do intestino médio, limita a absorção de heme, reduzindo seu impacto tóxico e regulando sua disponibilidade (Páscoa *et al.*, 2002).

As adaptações antioxidantes, embora essenciais para a sobrevivência e competência vetorial, também representam alvos potenciais para o controle de vetores. Interromper essas defesas poderia aumentar a vulnerabilidade dos mosquitos ao EO reduzindo sua longevidade e eficiência como transmissores de doenças. A compreensão desses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de controle de vetores, especialmente em um contexto de resistência crescente a inseticidas.

1.4. Avanço da Proteômica e o estudo do mosquito

Desenvolvida no final dos anos 1990, a proteômica é agora reconhecida como um dos pilares da biologia de sistemas. As estratégias proteômicas, que caracterizam a abundância, estabilidade e estado de modificação das proteínas (as moléculas funcionais da célula), despertam grande interesse para aprimorar nossa compreensão sobre como as células funcionam e se comunicam. A proteômica é amplamente utilizada para o estudo de diferentes organismos, desde bactérias e plantas até animais e humanos, permitindo explorar as complexidades do proteoma em cada espécie. Estudos proteômicos têm sido aplicados em diversos campos, incluindo microbiologia, botânica, ciências veterinárias e medicina humana, fornecendo *insights* valiosos sobre processos biológicos, mecanismos de doenças e respostas a estresses ambientais (Aebersold e Mann, 2003; Cravatt *et al.*, 2007).

Inicialmente, a análise proteômica baseava-se em técnicas como espectrometria de massas e eletroforese em gel bidimensional. No entanto, novas abordagens têm ampliado consideravelmente as capacidades dessa área. Um exemplo é a proteômica *shotgun*, que utiliza cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Essa técnica permite a análise de misturas complexas, possibilitando a identificação de um grande número de proteínas em uma única análise, com alta sensibilidade e precisão (Abidin *et al.*, 2021). Métodos de proteômica quantitativa, como SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture), iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) e label-free quantification, permitem a comparação quantitativa precisa de proteomas entre diferentes condições experimentais. A proteômica direcionada, incluindo técnicas como SRM (Selected Reaction Monitoring) e PRM (Parallel Reaction Monitoring), possibilita a quantificação precisa de proteínas específicas em amostras complexas (Ronsein *et al.*, 2015). A proteômica top-down, que analisa proteínas intactas, permite a identificação de isoformas e modificações pós-traducionais com maior precisão (Po e Eyers, 2023). O imageamento por espectrometria de massas (IMS) permite a visualização da distribuição espacial de proteínas em tecidos, fornecendo informações valiosas sobre a localização de proteínas específicas (Lim *et al.*, 2023). Por fim, os avanços recentes na proteômica de célula única estão permitindo a análise do proteoma de células individuais, revelando heterogeneidade em populações celulares (Végyári *et al.*, 2022; Matzinger *et al.*, 2023).

A proteômica de mosquitos é um campo de pesquisa em rápida expansão, dedicado à análise e catalogação da expressão de proteínas em diversas espécies, tecidos,

tipos celulares e estágios fisiológicos. Estudos na área têm revelado processos importantes em larvas e adultos, como mudanças na composição proteica da hemolinfa, intestino médio, matriz peritrófica, córion (casca do ovo), bem como em proteínas salivares e ovarianas, especialmente após a ingestão de sangue (Popova-Butler e Dean, 2009; Cancino-Rodezno *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Whiten *et al.*, 2018). Avanços na pesquisa de proteômica em mosquitos vetores têm revelado respostas proteômicas a estressores ambientais e patógenos, bem como mecanismos de resistência a inseticidas, oferecendo *insights* críticos para estratégias de controle de mosquitos (Shettima *et al.*, 2023; Tan *et al.*, 2023). Assim, a proteômica desponta como uma ferramenta essencial para identificar alterações moleculares fundamentais, o que tem implicações diretas no desenvolvimento de novas abordagens de controle vetorial e intervenções mais eficazes, incluindo o monitoramento da resistência a inseticidas e o desenvolvimento de novos métodos de controle.

A aplicação de técnicas de proteômica ao estudo de *A. aegypti* tem revelado proteínas e vias metabólicas potencialmente úteis para o controle desse vetor. Além das abordagens que investigam a resposta do mosquito ao EO, estudos recentes sugerem que o uso de compostos naturais pode também induzir alterações no perfil proteico do mosquito, contribuindo para a descoberta de alvos específicos para novos inseticidas. Tan *et al.*, (2023) investigaram o impacto do extrato de acetato de etila de *Streptomyces sp.* KSF103 em larvas de *A. aegypti*. A pesquisa identificou proteínas com expressão aumentada, como ATP sintase e frutose-bisfosfato aldolase (FBA), relacionadas ao metabolismo e organização celular. Análises de *docking* molecular sugerem a FBA como potencial alvo para novos inseticidas.

Além das abordagens com compostos naturais e estressores químicos, o uso de nanopartículas tem se mostrado promissor para o controle do *A. aegypti*. Por exemplo, Chimkhan *et al.*, (2022) demonstraram que nanopartículas de Ag/AgCl, sintetizadas a partir de metabólitos de *Bacillus thuringiensis*, induzem disfunções mitocondriais, danos ao DNA e apoptose em larvas de *A. aegypti*, fornecendo uma base molecular para estratégias de controle vetorial. Paralelamente, Shettima *et al.*, (2023) utilizaram análise proteômica quantitativa para identificar proteínas diferencialmente expressas em mosquitos resistentes à permetrina e temefós na Malásia. Estas proteínas, associadas a vias metabólicas e fosforilação oxidativa, representam potenciais alvos moleculares para monitorar e prever resistência a inseticidas.

Por sua vez, o estudo de Geiser *et al.*, (2022) expande o conhecimento sobre o impacto da alimentação com sangue na expressão de proteínas relacionadas ao ferro durante a oogênese em *A. aegypti*. Utilizando análise proteômica shotgun e técnicas de etiquetagem por massa em tandem, o estudo identificou proteínas que desempenham papel crítico no metabolismo de ferro nos ovários do mosquito, incluindo uma subunidade única da cadeia leve da ferritina. Essas descobertas não apenas evidenciam o papel do metabolismo de metais na reprodução do mosquito, mas também indicam novos alvos moleculares que podem ser explorados para interferir na capacidade reprodutiva dos mosquitos.

Para entender melhor como o estresse oxidativo afeta mosquitos vetores, Tarimo *et al.*, (2018) examinaram a resposta proteômica de *A. gambiae* ao paraquat, um agente indutor de estresse oxidativo, no intestino médio. O estudo demonstrou que o intestino do mosquito responde ao estresse oxidativo via ativação de proteínas associadas ao estresse do retículo endoplasmático (ER). Essa resposta proteômica sugere que compostos similares ao paraquat poderiam ser explorados como uma abordagem para interromper o desenvolvimento de parasitas como o *P. falciparum* no mosquito vetor da malária.

Já no contexto da resistência a inseticidas, o estudo de Shettima *et al.*, (2023) analisaram a resistência de *A. aegypti* aos inseticidas permetrina e temefós, identificando proteínas diferencialmente expressas. Em adultos resistentes à permetrina, foram reguladas positivamente a ATPase $\beta 2$ dependente de sódio/potássio e negativamente a troponina I, enolase fosfatase E1 e glucosidase 2β . Em larvas resistentes ao temefós, as proteínas reguladas positivamente incluíram a proteína contendo domínio H15, proteína ribossomal 60S e proteína PB, enquanto a cadeia β da tubulina foi regulada negativamente.

2. Objetivo Geral

Investigar os efeitos do estresse oxidativo, induzido pelo heme, nos perfis proteômicos de larvas e mosquitos adultos de *A. aegypti*.

2.1. Objetivos Específicos

1. Analisar as diferenças nos perfis proteômicos entre larvas e mosquitos adultos de *A. aegypti* expostos ao heme.
2. Identificar as proteínas diferencialmente expressas em larvas e adultos após o tratamento com heme.
3. Categorizar funcionalmente as proteínas afetadas pelo tratamento com heme em diferentes estágios de desenvolvimento do mosquito.
4. Investigar as respostas estágio-específicas ao estresse oxidativo induzido pelo heme em *A. aegypti*.
5. Avaliar o impacto do heme nos processos celulares e metabólicos de larvas e mosquitos adultos.
6. Explorar potenciais mecanismos de adaptação e resposta ao estresse oxidativo em *A. aegypti*.
7. Identificar possíveis alvos moleculares para o desenvolvimento de novas estratégias de controle vetorial.

3. Materiais e métodos

3.1. Mosquitos e manutenção de colônias

Os insetos foram provenientes de uma colônia de *A. aegypti* (cepa Rockefeller) mantida no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. As larvas foram nutridas com ração comercial para gatos e criadas em bandejas à temperatura ambiente. Os mosquitos adultos foram alojados a 27°C, com umidade relativa de 70%, sob fotoperíodo de 12 horas, e receberam solução de sacarose a 10%. Para estimular a produção de ovos, fêmeas de 3 a 5 dias de idade foram alimentadas artificialmente com sangue de ovelha (aprovado CEUA/CBB/UENF nº 011/2023).

3.2. Alimentação de mosquitos

Para alimentação artificial, plasma sanguíneo de carneiro (aprovado pela CEUA/CBB/UENF, protocolo nº 011/2023) suplementado com 10 mM de heme foi oferecido aos mosquitos usando um dispositivo de alimentação por membrana. Este sistema consiste em uma membrana artificial esticada na base de um cilindro de vidro com camisa de água mantido a 37 °C . Para determinar os parâmetros experimentais apropriados para à análise proteômica, um ensaio de toxicidade de hemina foi realizado com larvas de 4º ínstar (L4). As larvas foram expostas a diferentes concentrações de hemina comercial (5mM, 10 mM, 15 mM e 20 mM). As larvas do grupo controle foram expostas a água destilada. A sobrevivência larval foi monitorada por 24 h, 48 h e 72 h,). Foram utilizadas 90 larvas por grupo, totalizando 450 larvas para todos os experimentos. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para traçar as curvas de sobrevivência e o tempo mediano de sobrevivência (S50) e a análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism v8.00, Inc (GraphPad Software, EUA). Com base nas curvas de sobrevivência resultantes (Figura S1), 10 mM de hemina e um tempo de exposição de 24 horas foram selecionados. O ponto de tempo de 24 horas foi escolhido para capturar o pico da resposta inicial ao estresse, conforme indicado pela maior mudança na sobrevivência dentro deste período. A concentração de 10 mM de hemina permitiu a indução de estresse sem causar mortalidade excessiva, facilitando a observação de adaptações proteômicas relacionadas ao estresse oxidativo. Finalmente, 10 mM de hemina demonstrou ser os níveis médios de hemina que os mosquitos ingerem durante a alimentação sanguínea. Este ponto de tempo

e concentração foram usados em larvas e adultos para permitir uma comparação direta entre os dois estágios de desenvolvimento

3.3. Proteômica

3.3.1. Processamento das amostras

Trinta amostras de larvas (*whole body*) e adultos (*whole body*) de *A. aegypti* tratadas com hemina 10 mM foram colocadas em eppendorfs. As amostras foram maceradas com 500 µL de Tris-HCl 20 mM PH 7,5 com uréia 4M e sonicada no Sonic Dismembrator (Fisher Scientific) com 8 ciclos de 7 segundos de ultrassom, centrifugadas a 20.817 g (14.000 rpm) por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para tubos de 2ml da axygen e quantificados. Após o processo de liofilização, as amostras foram enviadas para o Núcleo de Espectometria de massas e Ciências Ômicas (NEMO) do Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento acadêmico/Instituto de Química (LADETEC/IQ), que realizou os serviços de proteômica e bioinformática, de acordo com a metodologia descrita abaixo.

Inicialmente, 100 µg de proteínas foram extraídas e submetidas a redução com ditioneitol (10 mM), seguida de alquilação com iodoacetamida (40 mM). A digestão enzimática foi realizada com tripsina (0,2 µg/µL, Promega) em um Thermomixer, a 37 °C, durante a noite. Posteriormente, as amostras foram purificadas utilizando colunas de extração SpinColumn C18 e resina Poros R2. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.3.2. Cromatografia Líquida

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema Easy 1000 nano LC (Thermo Scientific), equipado com uma coluna EASY-Spray PepMap C18 (25 cm de comprimento, 75 µm de diâmetro interno, partículas de 2 µm, poros de 100 Å). A pré-coluna utilizada foi a Acclaim PepMap C18 (2 cm de comprimento, 75 µm de diâmetro interno, partículas de 3 µm, poros de 100 Å). As fases móveis consistiram em: Fase A (aquosa): 95% água, 5% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico e Fase B (orgânica): 95% acetonitrila, 5% água, 0,1% ácido fórmico.

O gradiente de eluição foi realizado a um fluxo de 300 nL/min, com as seguintes condições: 5% de fase B no início, aumentando para 23% em 57 minutos, 45% em 77 minutos e 98% em 82 minutos, permanecendo nesta concentração até 90 minutos.

3.3.3. Espectrometria de Massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro Q Exactive Plus (Thermo Scientific), com analisador Orbitrap e modo de aquisição dependente de dados (DDA). O instrumento foi calibrado em 22/01/2024, apresentando acurácia de 0,19 ppm/0,33 ppm. Os parâmetros de aquisição utilizados foram:

- Full scan (MS1): resolução de 70.000, faixa m/z de 375 a 1650, AGC de $3,00 \times 10^6$, tempo de ativação de 50 ms.
- Análise de fragmentos (MSn): resolução de 17.500, AGC de $1,00 \times 10^6$, seleção dos 20 íons mais abundantes, janela de isolamento de 1,4 m/z, energia de colisão (HCD) de 30, sinal mínimo de $1,00 \times 10^5$ e tempo de ativação de 100 ms.
- Exclusão dinâmica: 40 s com janela de 1,2 m/z.

3.3.4. Análise de Bioinformática

Os dados obtidos foram processados no software Proteome Discoverer 2.1, utilizando a base de dados *Aedes aegypti* do UniProt. A identificação de peptídeos foi realizada com o algoritmo SequestHT, considerando tolerância de massa de 10 ppm para íons precursores e 0,1 Da para fragmentos. A quantificação baseou-se na intensidade do sinal MS1.

As modificações dinâmicas incluíram oxidação de metionina e acetilação N-terminal, enquanto a carbamidometilação de cisteínas foi considerada uma modificação fixa. O FDR (False Discovery Rate) foi ajustado para 1% tanto na identificação de peptídeos quanto de proteínas.

Para garantir a qualidade dos resultados após o processamento dos dados, apenas as proteínas presentes nas três sequências foram aceitas para análise de acumulação diferencial ou ausentes nas três sequências para o caso de proteínas únicas. As proteínas foram consideradas acumuladas para cima se o valor de log2 fold change (FC) fosse $>0,60$ e para baixo se o valor de log2 FC fosse $< -0,60$, de acordo com o teste t de Student (bicaudal, $p < 0,05$). A análise de enriquecimento funcional foi realizada usando o software OmicsBox 1.2.4 (<https://www.biobam.com/omicsbox>) e Metascape (Zhou *et al.*, 2019).

4. Resultados

A análise proteômica é uma ferramenta poderosa para investigar a expressão diferencial de proteínas em organismos sob diferentes condições experimentais. No presente estudo, foi realizado um levantamento proteômico para avaliar o impacto do tratamento com heme nos perfis proteicos de larvas e mosquitos adultos de *A. aegypti*. Para garantir a qualidade dos dados, apenas as proteínas presentes consistentemente nas três replicatas biológicas foram consideradas para a análise de acumulação diferencial. As proteínas foram classificadas como acumuladas para cima ($\log_2$ fold change $> 0,60$) ou para baixo ($\log_2$ fold change $< -0,60$) com base em um teste *t* de Student (bicaudal, $p < 0,05$). No total, foram identificadas 2127 proteínas, revelando diferenças significativas nos perfis proteômicos entre larvas e mosquitos adultos tratados. O gráfico de Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 1) mostrou um padrão de agrupamento bem definido, com as amostras de larvas controle e tratadas localizadas em quadrantes distintos, enquanto os adultos controles e tratados apresentaram maior proximidade entre si, mas permaneceram separados dos grupos de larvas. Esses resultados sugerem respostas específicas ao estresse oxidativo dependentes do estágio de desenvolvimento, destacando a complexidade das adaptações fisiológicas em *A. aegypti*. A proximidade entre réplicas dentro de cada grupo experimental indica boa reprodutibilidade dos dados, demonstrando a confiabilidade do experimento e a robustez das análises proteômicas realizadas. A separação clara entre os grupos experimentais (Figura 1) reflete diferenças marcantes nos perfis proteômicos de larvas e adultos. O tratamento com heme a 10 mM teve um impacto mais pronunciado nas larvas, como evidenciado pela maior dispersão das amostras tratadas em comparação aos grupos de controle e a separação mais distinta em comparação aos mosquitos adultos.

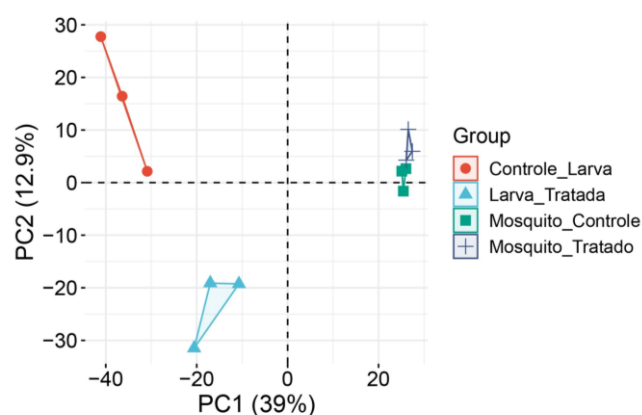


Figura 1. Gráfico de Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil proteômico de larvas e adultos tratados com 10 mM de heme e seus respectivos controles.

O gráfico exibe a distribuição dos grupos experimentais em função dos componentes principais PC1 (39% da variância explicada) e PC2 (12,9% da variância explicada). Cada ponto representa uma amostra biológica, com cores e símbolos indicando os grupos: larvas controle (azul), larvas tratadas com heme (vermelho), mosquitos adultos controle (verde) e mosquitos adultos tratados com heme (laranja). A separação entre os grupos sugere alterações no perfil proteômico em resposta ao tratamento com heme.

O gráfico Volcano (Figura 2) apresenta dados comparativos sobre a expressão proteica em larvas de *A. aegypti* e mosquitos adultos tratados com 10 mM de heme em comparação com seus respectivos grupos controle, destacando mudanças na expressão proteica. A Figura 2A mostra uma predominância de proteínas reguladas negativamente (círculos azuis) em comparação com proteínas reguladas positivamente (círculos vermelhos) em larvas tratadas, enquanto a maioria das proteínas permaneceu inalterada (círculos cinza). Esse padrão sugere seletividade nos processos celulares afetados pelo tratamento. Em contraste, a Figura 2B revela uma resposta proteômica mais moderada e equilibrada em adultos em comparação com larvas. Embora um número significativo de proteínas tenha sido regulado positivamente (círculos vermelhos), as mudanças na expressão foram menos extremas. A maioria das proteínas permaneceu inalterada (círculos cinza) e nenhuma proteína foi regulada negativamente, indicando um menor impacto do tratamento em mosquitos adultos.

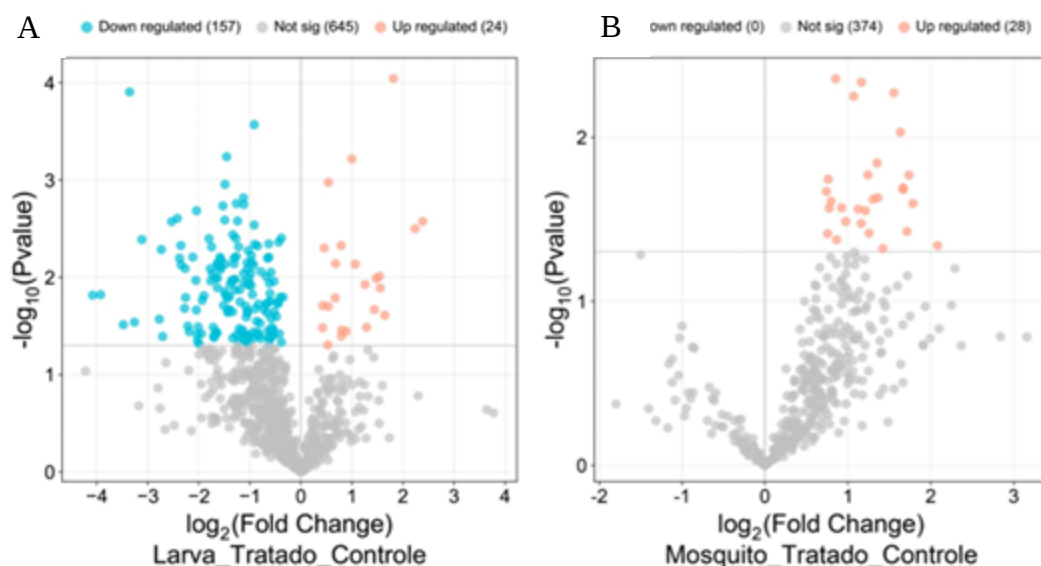


Figura 2. Análise do perfil proteômico de larvas de *A. aegypti* tratadas com 10 mM de heme.

O gráfico Volcano apresenta a distribuição de proteínas diferencialmente expressas em larvas tratadas com heme, com valores de alteração de dobra e significância estatística (valor de p). Proteínas com alteração de dobra positiva são representadas por círculos vermelhos (proteínas reguladas positivamente), enquanto

proteínas com alteração de dobra negativa são representadas por círculos azuis (proteínas reguladas negativamente). Proteínas sem alterações significativas são representadas por círculos pretos. A análise revela uma predominância de proteínas reguladas negativamente, sugerindo uma resposta adaptativa celular ao estresse oxidativo induzido pelo heme.

A figura 3 (Mapa de calor) ilustra a expressão proteica diferencial em larvas de *A. aegypti* e mosquitos adultos. Cada linha representa uma proteína, enquanto as colunas distinguem quatro condições: larvas controle, larvas tratadas, adultos controles e adultos tratados. As cores variam de azul (expressão reduzida) a vermelho (expressão aumentada), com o branco indicando níveis intermediários. O mapa de calor revela que os padrões de expressão proteica diferem consideravelmente entre os dois estágios de desenvolvimento, independentemente do tratamento. Além disso, as larvas exibem mudanças mais pronunciadas na expressão proteica em comparação aos adultos (Figura 3A). Uma análise detalhada de duas regiões específicas do mapa de calor, onde a expressão proteica larval é distintamente maior (Figura 3B), revela 49 proteínas. Essas proteínas foram classificadas em grupos funcionais usando o banco de dados UniProt (Tabela 1). Esta tabela destaca proteínas com expressão significativa em larvas de *A. aegypti*, organizadas por função biológica, enfatizando os principais processos metabólicos e celulares cruciais para o estágio larval. A diversidade funcional inclui categorias como metabolismo (aminoácidos, carboidratos, lipídios, nucleotídeos e xenobióticos), processamento de proteínas e RNA, resposta ao estresse, estrutura celular, transporte e regulação metabólica. Este perfil metabólico indica intensa atividade biossintética e energética, essencial para o rápido crescimento larval. A presença de proteínas de resposta ao estresse e metabolismo xenobiótico sugerem adaptações ao ambiente aquático, enquanto proteínas estruturais e de transporte apontam para remodelação celular ativa. Além disso, proteínas regulatórias e de sinalização indicam controle preciso do desenvolvimento.

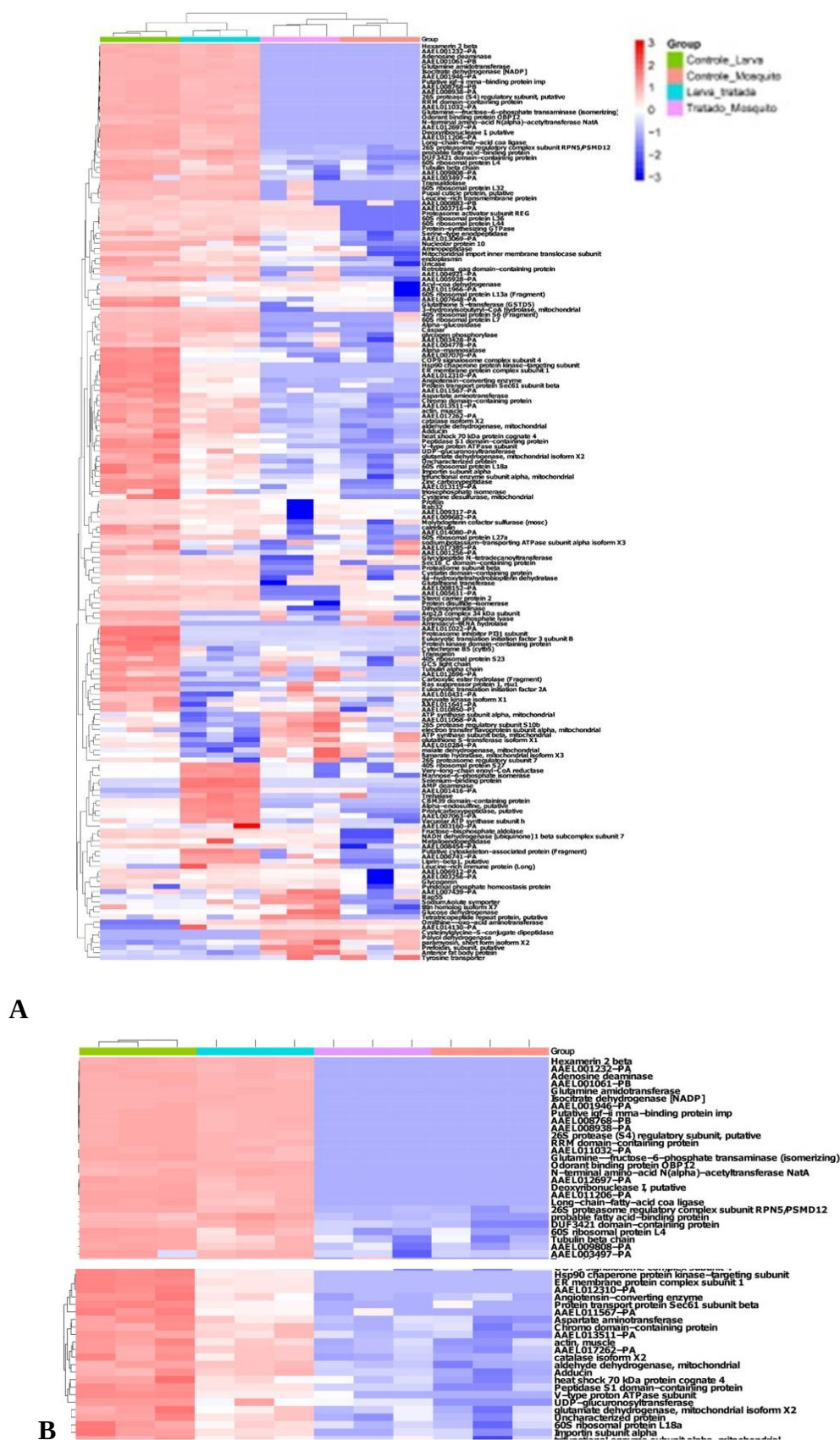


Figura 3. Heatmap (mapa de calor) da expressão diferencial de proteínas em larvas e mosquitos adultos.

A - Mapa de calor (Heatmap) dos padrões de expressão proteica de larvas e adultos (controle e tratados com heme 10 mM) de larvas e adultos de *A. aegypti*. Tons de vermelho indicam maior expressão proteica, enquanto tons de azul representam menor expressão. A intensidade das cores reflete a variação da expressão das proteínas identificadas. B – Regiões do mapa de calor nas quais a expressão proteica larval (em vermelho) é mais significativa do que a expressão proteica do adulto.

Tabela 1. Relação das proteínas, e suas respectivas categorias funcionais, das regiões do heatmap que mostram uma expressão proteica mais expressivas em larvas.

Categoria Funcional	Proteínas
Metabolismo de aminoácidos	Glutamine amidotransferase Aspartate aminotransferase Glutamate dehydrogenase, mitochondrial isoform X2
Metabolismo de carboidratos	Isocitrate dehydrogenase [NADP] Glutamine--fructose-6-phosphate transaminase
Metabolismo de lipídeos	Long-chain-fatty-acid coa ligase
Metabolismo de nucleotídeos	Adenosine deaminase
Metabolismo de xenobióticos	UDP-glucuronosyltransferase
Metabolismo oxidativo	Catalase isoform X2 Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
Regulação metabólica	Angiotensin-converting enzyme
Armazenamento e transporte	Hexamerin 2 beta
Transporte e ligação	Odorant binding protein OBP12 Probable fatty acid-binding protein
Processamento de proteínas e degradação	26S protease (S4) regulatory
Outras funções	26S proteasome regulatory complex subunit RPN5/PSMD12 Peptidase S1 domain-containing protein
Processamento de rna e síntese proteica	Putative igf-ii mRNA-binding protein imp RRM domain-containing protein N-terminal amino-acid N(alpha)-acetyltransferase NatA
Chaperonas e resposta ao estresse	Hsp90 chaperone protein kinase-targeting subunit Heat shock 70 kDa protein cognate 4

Transporte e proteínas de membrana	ER membrane protein complex subunit 1 Protein transport protein Sec61 subunit beta V-type proton ATPase subunit V Importin subunit alpha
Estrutura celular	Tubulin beta chain Actin, muscle Adducin
Síntese proteica	60S ribosomal protein L4 60S ribosomal protein L18a
Metabolismo de dna	Deoxyribonuclease I
Função desconhecida	DUF3421 domain-containing protein Cupin domain-containing protein Uncharacterized protein

A tabela S2 (Dados Suplementares) lista um conjunto de 18 proteínas identificadas de larvas de *A. aegypti* que foram significativamente mais expressas após o tratamento com heme 10 mM. Os valores de “fold change” variam de 2,38 para a proteína eukaryotic translation initiation factor 4 gamma até 0,67 para a proteína myb-like protein AA. Entre as proteínas mais expressas, destacam-se o eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, com o maior aumento de expressão (2,39 vezes), seguido pelo Putative IGF-II mRNA-binding protein IMP (fold change de 2,24) e pela Microtubule-associated protein Jupiter (fold change de 1,81). Entre as menos expressas, destacam-se a adducin (fold change de 0,79), a paramyosin (fold change de 0,68) e a myb-like protein AA (fold change de 0,67). A análise funcional das proteínas listadas na tabela 2, revelou que o tratamento com heme alterou, de forma expressiva, diversos processos celulares, que foram agrupados em seis categorias funcionais (Tabela 2). Duas delas se destacam: a categoria Estrutural e Citoesqueleto, que abrange cinco proteínas, como a microtubule-associated protein jupiter, cuticle protein 12.5 e myosin-2 essential light chain isoform X1; e a categoria Processamento de DNA/RNA, que inclui seis proteínas, como eukaryotic translation initiation factor 4 gamma e probable elongation factor 1-beta. A predominância de proteínas up-reguladas associadas ao citoesqueleto e à regulação gênica sugere que o tratamento com heme afeta a organização celular e a expressão de genes das larvas tratadas. Além disso, a presença de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo,

como a superoxide dismutase [Mn] e a TLD domain-containing protein mustard, indica que elas podem ter um papel potencial na defesa contra danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio (ROS).

Tabela 2. Categorias funcionais das proteínas de larvas de *A. aegypti* com expressão aumentada após tratamento com heme. 10 mM.

Categoria Funcional	Proteínas
Estrutural e Citoesqueleto	Microtubule-associated protein Jupiter Cuticle protein 12.5 Myosin-2 essential light chain isoform X1 Adducin Paramyosin, short form isoform X2
Processamento de DNA/RNA	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma Putative igf-ii mrna-binding protein imp RRM domain-containing protein Probable elongation factor 1-beta 60S ribosomal protein L36 Myb-like protein AA
Metabolismo Energético	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
Transporte e Ligação	Fibronectin type-III domain-containing protein Probable fatty acid-binding protein
Dobramento de Proteínas	Prefoldin, subunit, putative
Outras Funções	FAS-associated factor 1 isoform TLD domain-containing protein mustard Secreted protein

A tabela 3, por sua vez, lista as 19 proteínas, e seus grupos funcionais respectivos, expressas exclusivamente nas larvas de *A. aegypti* tratadas com heme 10 mM. Essa tabela mostra que esse agente pró-oxidante induziu uma resposta celular complexa, envolvendo alterações significativas em diversas funções celulares (Tabela 3). Foram identificadas

mudanças no metabolismo energético e mitocondrial, destacando proteínas como a subunidade Mic19 do complexo MICOS, essencial para a homeostase mitocondrial e a integridade das cristas mitocondriais, sugerindo uma resposta adaptativa ao estresse energético. A presença de proteínas relacionadas à proteólise, como o regulador do proteassoma RPN5/PSMD12, aponta para um aumento na degradação de proteínas danificadas, possivelmente causado pelo estresse oxidativo. Além disso, proteínas envolvidas na síntese e regulação proteica, no metabolismo de lipídeos e carboidratos, na sinalização celular e no tráfego de vesículas, como Rab32 e proteínas quinases, indicam ajustes celulares importantes para lidar com o tratamento estressante. A identificação de várias proteínas não caracterizadas reforça a complexidade da resposta e sugere mecanismos ainda não compreendidos. Esses resultados fornecem informações valiosas sobre a adaptação das larvas ao tratamento com heme e podem guiar futuras pesquisas para estratégias de controle vetorial.

Tabela 3. Proteínas de *A. aegypti* que foram expressas unicamente, e agrupadas por seu grupo funcional, nas larvas com tratadas com heme 10 mM.

Categoria Funcional	Proteínas
Metabolismo Energético e Mitocondrial	MICOS complex subunit Mic19 cytochrome b-c1 complex subunit 9 V-type proton ATPase
Metabolismo de Carboidratos	Glycogenin
Tráfego de Vesículas e Membranas	Rab32 ER membrane protein complex subunit 1
Proteólise e Modificação de Proteínas	26S proteasome regulatory complex subunit RPN5/PSMD12 Metalloendopeptidase Aminoacyl-tRNA hydrolase Peptidase S1 domain-containing protein
Síntese e Regulação Proteica	Eukaryotic translation initiation factor 2A COP9 signalosome complex subunit 4
Metabolismo de Nucleotídeos	AMP deaminase

Metabolismo de Lipídeos	Sphingosine phosphate lyase Very-long-chain enoyl-CoA reductase
Sinalização Celular	Protein kinase domain-containing protein Alpha-endosulfine, putative
Proteínas de Membrana	Leucine-rich transmembrane protein
Proteínas com Domínios Específicos	CBM39 domain-containing protein

A tabela S3 (Dados Suplementares) mostra que o tratamento com heme 10 mM resultou na redução da expressão de 129 proteínas em larvas de *A. aegypti*, com valores de Fold change variando de -4,08 a -0,60. Entre as proteínas menos expressas estão as proteínas não identificadas AAEL009317-PA (fold change de -4,08), AAEL009682-PA (fold change de -3,92) e AAEL012883-PA (fold change de -3,49). Esse número bem maior de proteínas com expressão reduzida, em relação às aquelas com expressão aumentada (18 proteínas) pode refletir uma redução geral na atividade metabólica das larvas tratadas com heme. A análise funcional das proteínas listadas na tabela 2, revelou que o tratamento com heme alterou, de forma expressiva, diversos processos celulares, que foram agrupados em seis categorias funcionais (Tabela 4). As principais alterações incluem uma redução no metabolismo energético e de carboidratos, indicando menor produção de energia e processamento metabólico. A diminuição na expressão de proteínas ribossômicas e fatores de elongação sugere uma redução na síntese proteica, enquanto alterações em proteínas estruturais, como actina e tubulina, indicam alteração no citoesqueleto. Além disso, a inibição da expressão de proteínas de resposta ao estresse, como Heat shock cognate 70 e Heat shock protein 83, de enzimas antioxidantes, como catalase e glutathione transferase, e de proteínas relacionadas ao transporte de elétrons, como NADH dehydrogenase e succinate dehydrogenase, indicam que, possivelmente, a capacidade das larvas de lidar com estressores oxidativos está sendo muito afetada.

Tabela 4. Categorias funcionais das proteínas de larvas de *A. aegypti* com expressão diminuída após tratamento com heme 10 mM.

Categoria Funcional	Proteínas
---------------------	-----------

Metabolismo de Carboidratos	Alpha-mannosidase Alpha-glucosidase ATP-dependent 6-phosphofructokinase Glucose dehydrogenase Fructose-bisphosphate aldolase glycogen debranching enzyme isoform X1 Mannose-6-phosphate isomerase Polyol dehydrogenase Pyruvate kinase Transaldolase Glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing) glycogen phosphorylase
Metabolismo energético	ATP-citrate synthase Acyl-coa dehydrogenase Mitochondrial ATP synthase F chain Catalase ATP synthase subunit g, mitochondrial NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial Vacuolar ATP synthase subunit h ATP synthase subunit alpha, mitochondrial Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial Isocitrate dehydrogenase [NADP] Malate dehydrogenase Glutamate dehydrogenase (NAD(P)(+)) Cytochrome c oxidase polypeptide Va ATP synthase subunit beta fumarate hydratase, mitochondrial isoform X3 ATP synthase subunit d, mitochondrial trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial
Proteases e peptidasas	Serine-type endopeptidase Cysteinylglycine-S-conjugate dipeptidase Angiotensin-converting enzyme 26S protease (S4) regulatory subunit, putative Aminopeptidase 26S proteasome regulatory subunit 7 26S protease regulatory subunit S10b Proteasome subunit beta Carboxylic ester hydrolase (Fragment) Proteasome activator subunit REG Peptidase S1 domain-containing protein

Estrutural e citoesqueleto	Pupal cuticle protein, putative actin, muscle Tubulin beta chain Tropomodulin Profilin
Processamento de DNA/RNA	40S ribosomal protein S23 60S ribosomal protein L32 60S ribosomal protein L13a (Fragment) Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B 40S ribosomal protein S8 elongation factor 1-gamma 40S ribosomal protein S17 60S ribosomal protein L27a 60S ribosomal protein L18a 40S ribosomal protein S4 60S ribosomal protein L44 60S ribosomal protein L7 40S ribosomal protein S6 (Fragment) 60S ribosomal protein L9 60S ribosomal protein L4 60S acidic ribosomal protein P0
Resposta ao estresse	Calreticulin Heat shock cognate 70 Heat shock protein 83
Metabolismo de aminoácidos	Dihydropyrimidinase 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase Ornithine--oxo-acid aminotransferase Aspartate aminotransferase
Transporte de elétrons	probable medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
Modificação de proteínas	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase Protein disulfide-isomerase
Metabolismo de nucleotídeos	Adenosine deaminase Nucleoside diphosphate kinase
Detoxificação	Glutathione transferase
Transporte	sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha isoform X3

Outras funções	Cystatin domain-containing protein GCS light chain Molybdopterin cofactor sulfurase (mosc) Aldehyde dehydrogenase (NAD(+)) Glutamine amidotransferase Selenium-binding protein Uricase Chromo domain-containing protein Importin subunit alpha Protein-synthesizing GTPase Retrotrans_gag domain-containing protein Staphylococcal nuclease domain-containing protein Hexamerin 2 beta Odorant binding protein OBP12 fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2 isoform X1 UPF0389 protein CG9231 DUF3421 domain-containing protein rab GDP dissociation inhibitor alpha methenyltetrahydrofolate synthase domain-containing protein
----------------	--

A tabela 5 lista as 20 proteínas de *A. aegypti* expressas exclusivamente nas larvas controle, agrupadas por categorias funcionais, mostrando o efeito inibitório do tratamento com heme em diferentes vias metabólicas das larvas do mosquito. Entre as alterações, destacam-se impactos na organização do citoesqueleto (Tubulin alpha chain, Arp2/3 complex 34 kDa subunit e Transgelin), no metabolismo de aminoácidos (delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase e Cysteine desulfurase, mitochondrial), carboidratos (Glycogenin, Glucose dehydrogenase e Trehalase), e na degradação proteica (Prolylcarboxypeptidase, putative, Aminopeptidase e Zinc carboxypeptidase). Mudanças também foram observadas no transporte de elétrons, metabolismo de cofatores, sinalização celular, função mitocondrial, modificação pós-traducional de proteínas, resposta imune e metabolismo de xenobióticos. A presença de proteínas reguladoras, como o inibidor do proteassoma PI31, e a redução na expressão de proteínas essenciais indicam perturbações celulares significativas nas larvas sob o efeito da heme.

Tabela 5. Proteínas de *A. aegypti* e seus grupos funcionais que foram expressas unicamente, agrupadas por seu grupo funcional, nas larvas controle.

Categoria funcional	Proteínas
---------------------	-----------

Estrutural e citoesqueleto	Tubulin alpha chain
	Arp2/3 complex 34 kDa subunit
	Transgelin
Metabolismo de aminoácidos	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase
	Cysteine desulfurase, mitochondrial
Proteases e peptidases	Prolylcarboxypeptidase, putative
	Aminopeptidase
	Zinc carboxypeptidase
Metabolismo de carboidratos	Glycogenin
	Glucose dehydrogenase
	Trehalase
Transporte de elétrons	Cytochrome B5 (cytb5)
Metabolismo de cofatores	4a-hydroxytetrahydrobiopterin dehydratase
Processamento de dna/rna	Deoxyribonuclease I, putative
Sinalização celular	Ras suppressor protein 1, rsu1
Metabolismo energético	mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40
Modificação de proteínas	N-terminal amino-acid N(alpha)-acetyltransferase NatA
Resposta imune	Leucine-rich immune protein (Long)
Metabolismo de xenobióticos	UDP-glucuronosyltransferase
Regulação de proteínas	Proteasome inhibitor PI31 subunit

A tabela S4 (Dados Suplementares) lista um conjunto de 23 proteínas identificadas de larvas de mosquitos adultos de *A. aegypti* que foram significativamente mais expressas após o tratamento com heme 10 mM. Os valores de “fold change” variam de 2,08 para a proteína não identificada AAEL013511-PA (proteína hipotética conservada) até 0,74 para a *triosephosphate isomerase*. Entre as proteínas mais altamente expressas, destacam-se AAEL013511-PA, AAEL017262-PA, *Endoplasmin* e High Mobility Group Protein D, com fold change significativo. Entre as proteínas menos diferencialmente expressas, destacam-se a *voltage-dependent anion-selective channel-like* (fold change de 0,77), a spectrin alpha chain isoform X1 (fold change de 0,76), a titin homolog isoform X7 (fold change de 0,75) e a *triosephosphate isomerase* (fold change de 0,74). Analisando as categorias funcionais das proteínas up-reguladas da tabela S3, observa-se uma resposta complexa do mosquito ao tratamento com o heme (Tabela 6). A categoria funcional mais representativa é a das proteínas estruturais e do citoesqueleto, com destaque para proteínas de cutícula e do citoesqueleto (8 proteínas, como a Gelsolin, cuticle protein 12.5 e spectrin alpha chain isoform X1), indicando remodelações estruturais possivelmente ligadas à proteção e ao manejo do estresse oxidativo. Em seguida, estão as proteínas associadas ao metabolismo energético (7 proteínas, como *succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit mitochondrial*, *electron transfer flavoprotein subunit alpha mitochondrial* e *ATP synthase subunit alpha mitochondrial*), sugerindo um aumento da produção de energia para enfrentar o estresse metabólico. A categoria de metabolismo e detoxificação destaca a enzima detoxificante *aldehyde dehydrogenase mitochondrial*. As proteínas relacionadas ao transporte e canais, como transportadores mitocondriais e canais dependentes de voltagem, apontam para adaptações no tráfego molecular visando à homeostase celular. Além disso, proteínas envolvidas no processamento de RNA e dobramento proteico, como Rap55 e endoplasmina, sugerem ajustes na regulação gênica e manutenção de proteínas. Por fim, a presença de seis proteínas não caracterizadas evidencia a complexidade da resposta ao heme e possíveis mecanismos adaptativos ainda desconhecidos.

Tabela 6. Categorias funcionais das proteínas de adultos *A. aegypti* com expressão aumentada após tratamento com hemina 10 mM.

Categoria funcional	Proteínas
---------------------	-----------

Estrutural e citoesqueleto	high mobility group protein D larval/pupal cuticle protein H1C thymosin beta gelsolin cuticle protein 12.5 cuticle protein 2 spectrin alpha chain isoform X1 titin homolog isoform X7
Metabolismo energético	succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7 electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial ATP synthase subunit alpha, mitochondrial ATP synthase subunit d, mitochondrial triosephosphate isomerase
Metabolismo e detoxificação	Acetyl-CoA deacylase aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
Transporte e canais	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit voltage-dependent anion-selective channel-like
Processamento de rna	Rap55
Chaperonas	endoplasmin

A análise das 16 proteínas expressas exclusivamente em adultos de *A. aegypti* tratados com heme 10 mM revelou alterações em diferentes vias metabólicas (Tabela 7). A alteração do metabolismo mitocondrial (*methylglutaconyl-CoA hydratase*, *presequence protease* e *mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40*) indica que houve uma reorganização energética e adaptação ao estresse oxidativo. Por sua vez, a regulação da estrutura da célula foi evidenciada pela expressão das proteínas *prohibitin*, *putative cytoskeleton-associated protein* e *hornerin*, sugerindo alterações na organização celular. Mudança no metabolismo de lipídeos (*carnitine O-acetyltransferase*) reforça mudanças no metabolismo energético. A presença das *protein*

DEK isoform X1 e *nucleolar protein 10* pode indicar alteração na regulação gênica. Entre as proteínas mais relevantes na resposta ao estresse oxidativo estão *glutathione transferase*, *prohibitin* e as proteínas mitocondriais mencionadas. Esses achados fornecem pistas sobre os mecanismos moleculares de adaptação de *A. aegypti* ao estresse oxidativo induzidos pelo heme.

Tabela 7. Proteínas de *A. aegypti* que foram expressas unicamente, agrupadas por seu grupo funcional, nos adultos tratados com hemina 10 mM.

Categoria funcional	Proteínas
Metabolismo mitocondrial	methyglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial Presequence protease, mitochondrial mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40
Regulação da estrutura celular	Prohibitin, putative Putative cytoskeleton-associated protein (Fragment)
Proteínas estruturais	hornerin
Metabolismo de lipídeos	carnitine O-acetyltransferase
Regulação gênica	protein DEK isoform X1
Metabolismo e armazenamento	Anterior fat body protein
Detoxificação	Glutathione transferase
Transporte de proteínas	Sec16_C domain-containing protein
Processamento de rna	Nucleolar protein 10
Metabolismo de vitaminas	Pyridoxal phosphate homeostasis protein
Transporte de aminoácidos	Tyrosine transporter
Adesão celular	Sodium/solute symporter Liprin-beta1, putative

A análise das proteínas expressas exclusivamente em adultos de *A. aegypti* do grupo controle mostra que o heme pouco atuou na inibição dos processos celulares nos adultos tratados (Tabela 8). A presença da proteína *Sterol carrier protein 2 (SCP-2)* no grupo controle, que está envolvida no metabolismo e transporte de lipídeos, sugere que a

heme pode alterar a composição da membrana celular. Por sua vez, a *Protein transport protein Sec61 subunit beta* é crucial para o transporte de proteínas ao retículo endoplasmático, e sua ausência nos tratados indica possíveis impactos no tráfego proteico. A expressão exclusiva dessas proteínas no grupo adulto controle sugere que elas são parte do metabolismo basal normal dos mosquitos adultos, mas sua expressão pelo tratamento com heme 10 mM.

Tabela 8. Proteínas de *A. aegypti* que foram expressas unicamente, agrupadas por seu grupo funcional, nos adultos controle.

Categoria funcional	Proteínas
Metabolismo e transporte de lipídeos	Sterol carrier protein 2
Transporte de proteínas	Protein transport protein Sec61 subunit beta

Entre todas as proteínas que foram diferencialmente expressas e únicas em larvas e adultos tratados com heme, a figura 4 apresenta um conjunto restrito de 5 proteínas diferencialmente expressas e coincidentes (*cuticle protein*, subunidades mitocondriais de ATP sintase (d e alfa), endoplasmina e succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit) e uma proteína com expressão única, ou seja, ausente nos grupos controles (mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40), nas larvas e adultos tratados com heme. Esse pequeno conjunto de proteínas se insere dentro de quatro grupos funcionais (Estrutural, Metabolismo Energético, Chaperonas e Transporte Mitocondrial). A maioria das proteínas apresenta uma inversão no padrão de expressão entre larvas e adultos, sugerindo uma reorganização significativa durante a metamorfose. A proteína cuticular, única a manter um aumento de expressão em ambos os estágios, parece ter um papel crítico na proteção contra os efeitos do heme. A proteína de transporte mitocondrial, marcada como "única" nos dois estágios, reforça a singularidade de sua expressão. A coincidência limitada dessas proteínas aponta para mecanismos moleculares conservados que asseguram adaptações estágio-específicas, enfatizando a plasticidade do mosquito na resposta ao heme. Esses resultados evidenciam elementos-chave na adaptação metabólica e estrutural de *A. aegypti* ao longo de seu ciclo de vida.

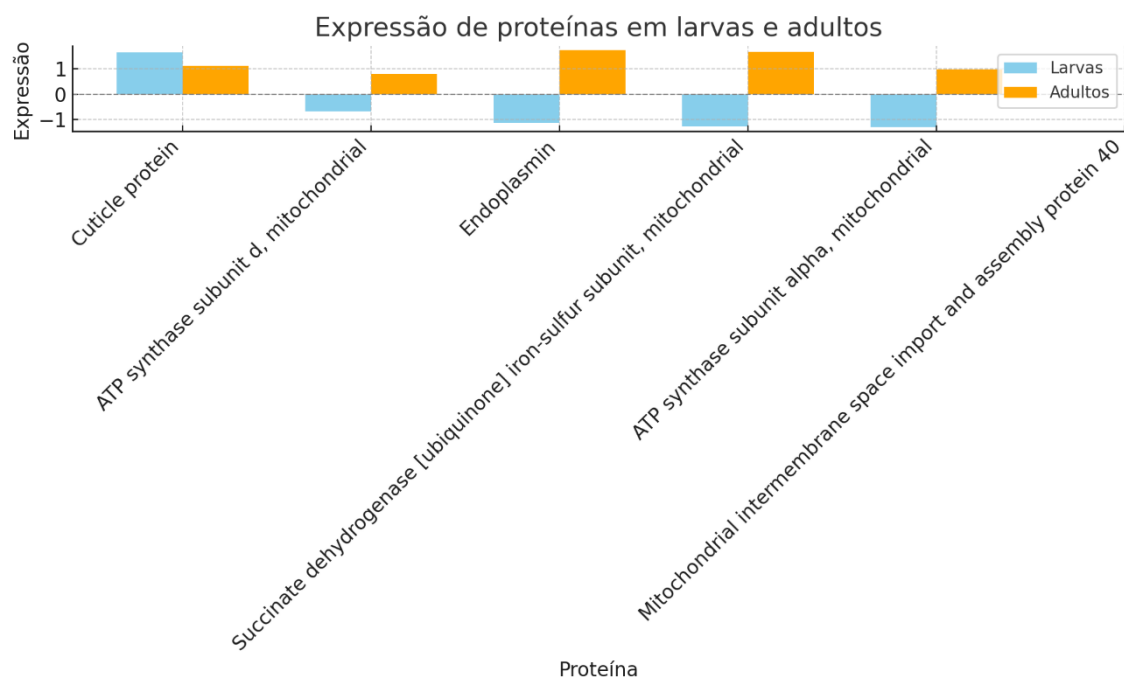


Figura 4. Proteínas coincidentes de larvas e adultos de *A. aegypti* tratados com heme 10 mM.
 Expressão diferencial = Fold change; barra azul = larvas; barra laranja = adultos; ausência de barra = proteína expressa unicamente em larvas e adultos.

5. Discussão

O presente estudo revelou diferenças significativas nos perfis proteômicos de larvas e mosquitos adultos de *A. aegypti* em resposta ao tratamento com heme, fornecendo uma compreensão valiosa a respeito das adaptações moleculares ao estresse oxidativo em diferentes estágios de desenvolvimento. A Análise de Componentes Principais (PCA) demonstrou uma clara separação entre os perfis proteômicos de larvas e adultos, com as larvas exibindo uma resposta mais pronunciada ao tratamento com heme. Esta diferença pode ser atribuída às distintas necessidades fisiológicas e ambientais de cada estágio de desenvolvimento. As larvas, que vivem em ambiente aquático e passam por rápido crescimento, demonstram ser mais sensíveis ao estresse oxidativo induzido pelo heme.

O gráfico Volcano evidenciou uma predominância de proteínas down-reguladas em larvas tratadas com heme, enquanto os adultos apresentaram uma resposta mais equilibrada. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que os mosquitos adultos já estão adaptados a lidar com altos níveis de heme devido à sua dieta hematófaga. Estudos anteriores demonstraram que mosquitos adultos possuem mecanismos robustos para detoxificação do heme proveniente da alimentação sanguínea (Graça-Souza *et al.*, 2006).

O gráfico de mapa de calor reforçou a observação de que as larvas apresentam mudanças mais acentuadas na expressão proteica em comparação aos adultos. A análise detalhada das regiões com expressão proteica larval superior revelou 49 proteínas com funções diversas, incluindo metabolismo, processamento de proteínas e RNA, resposta ao estresse, estrutura celular e transporte. Esta diversidade funcional pode refletir as demandas energéticas e de crescimento características do estágio larval, enquanto a presença de proteínas de resposta ao estresse e adaptação sugere mecanismos adaptativos para lidar com os desafios ambientais.

Nas larvas, as alterações mais significativas na expressão proteica incluíram o aumento na expressão de proteínas estruturais e do citoesqueleto, como a *microtubule-associated protein Jupiter* e *cuticle protein 12.5*. Isso pode indicar uma resposta adaptativa para manter a integridade celular sob condições de estresse oxidativo. O aumento da síntese de proteínas envolvidas no processamento de DNA/RNA, como o *eukaryotic translation initiation factor 4 gamma*, sugere um aumento na síntese proteica, possivelmente para produzir proteínas de defesa contra o estresse oxidativo. Curiosamente, observou-se uma inibição da síntese de enzimas antioxidantes clássicas como catalase e glutathione transferase nas larvas tratadas com heme. Isso contrasta com

estudos anteriores que relataram aumento na expressão dessas enzimas em resposta ao estresse oxidativo em insetos (Benoit *et al.*, 2011). Essa aparente contradição pode indicar uma sobrecarga dos sistemas antioxidantes ou uma estratégia alternativa de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelo heme em larvas.

Nos adultos, a resposta ao tratamento com heme foi menos pronunciada, com um número menor de proteínas diferencialmente expressas. Várias proteínas de resposta ao estresse, como *Endoplasmin* e *High Mobility Group Protein D*, foram reguladas positivamente, indicando uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Isso está de acordo com estudos que demonstraram a importância dessas proteínas na resposta ao estresse em mosquitos (Tarimo *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2022).

Entre as vias metabólicas mais afetadas nas larvas destaca-se a do metabolismo energético, com redução da expressão de enzimas glicolíticas e mitocondriais. Isso sugere uma estratégia de conservação de energia em resposta ao estresse oxidativo. Nos adultos, observou-se um aumento na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, indicando uma estratégia diferente de lidar com o estresse oxidativo.

As estratégias de resposta ao estresse oxidativo parecem diferir entre larvas e adultos. As larvas aparentam adotar uma estratégia de uma regulação negativa geral do metabolismo e, por outro lado, um aumento da expressão de proteínas estruturais e de processamento de DNA/RNA. Os adultos, por outro lado, parecem aumentar a expressão de proteínas de resposta ao estresse, do metabolismo energético e ultraestrutural.

Várias proteínas identificadas neste estudo podem ser consideradas como alvos potenciais para o controle do *A. aegypti*. Nas larvas, proteínas estruturais e do citoesqueleto com expressão aumentada, como a *microtubule-associated protein Jupiter* e de resposta ao estresse oxidativo como a *Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial*, poderiam ser alvos para comprometer a viabilidade larval. Nos adultos, proteínas de resposta ao estresse que foram reguladas positivamente, como *Endoplasmin* e *High Mobility Group Protein D*; e a enzima de detoxificação *aldehyde dehydrogenase*, poderiam ser alvos para aumentar a suscetibilidade a estressores ambientais ou químicos.

Várias estratégias de controle poderiam ser utilizadas baseadas nesses alvos proteicos, como por exemplo: o desenvolvimento de inibidores específicos para as proteínas estruturais up-reguladas em larvas; a criação de compostos que interferem com as proteínas de resposta ao estresse em adultos; a modulação de vias metabólicas afetadas pelo tratamento com heme; e o desenvolvimento de agentes que exacerbam o estresse oxidativo, explorando as diferenças nas respostas entre larvas e adultos.

Por fim, este estudo fornece uma visão abrangente das alterações proteômicas em larvas e adultos de *A. aegypti* em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo heme. As respostas estágio-específicas e as adaptações observadas em várias vias metabólicas e celulares destacam a complexidade da resposta ao estresse em mosquitos e oferecem novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de controle vetorial.

6. Conclusões

O presente trabalho forneceu uma análise dos perfis proteômicos de larvas e mosquitos adultos de *A. aegypti* em resposta ao tratamento com heme (10 mM), revelando 2127 proteínas e destacando alterações significativas na expressão proteica em ambos os estágios de desenvolvimento.

O estágio larval apresentou uma expressão elevada de proteínas com diferentes funções, como metabolismo, processamento de proteínas e RNA, resposta ao estresse, estrutura celular e transporte, refletindo uma resposta adaptativa para manter a integridade celular sob condições de estresse oxidativo provocado pela presença do heme. O mosquito adulto não apresentou expressão de nenhuma proteína down regulada, demonstrando ter uma resposta mais equilibrada e adaptada para lidar com altos níveis de heme devido à sua dieta hematófaga.

Esses resultados demonstram que o estresse oxidativo induzido pelo tratamento com heme afeta de forma distinta os diferentes estágios de desenvolvimento de *A. aegypti*, sugerindo que os mecanismos moleculares de adaptação ao estresse são modulados de acordo com o estágio de vida do mosquito. Essa compreensão amplia nosso conhecimento sobre as respostas fisiológicas do mosquito a condições adversas e oferece novas estratégias para o desenvolvimento de abordagens de controle vetorial mais eficazes, que podem ser ajustadas para maximizar o impacto em diferentes fases do ciclo de vida do vetor.

Por fim, este estudo abre caminho para investigações futuras que busquem elucidar os mecanismos moleculares subjacentes às alterações proteômicas observadas e explorar a funcionalidade das proteínas diferencialmente expressas. Tais pesquisas poderão contribuir para uma compreensão ainda mais detalhada dos processos biológicos de *A. aegypti* e impulsionar a criação de novas estratégias para mitigar a transmissão de doenças transmitidas por mosquitos.

Referências

- ABIDIN, S. A. Z.; OTHMAN, I.; NAIDU, R. Shotgun Proteomics and Mass Spectrometry as a Tool for Protein Identification and Profiling of Bio-Carrier-Based Therapeutics on Human Cancer Cells. *Methods in Molecular Biology*, v. 2211, p. 233-240, 2021. DOI: 10.1007/978-1-0716-0943-9_16. PMID: 33336281.
- ADAMS, K. L.; Selland, E. K., Willett, B. C., Carew, J. W., Vidoudez, C., Singh, N., & Catteruccia, F. Selection for insecticide resistance can promote *Plasmodium falciparum* infection in *Anopheles*. *PLoS Pathogens*, v. 19, n. 6, p. e1011448, 2023. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011448. PMID: 37339122; PMCID: PMC10313043.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- AHMAD, S. Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 29, p. 135-157, 1995.
- AHMED, S.; Sajjadian, S. M., & Kim, Y. HMGB1-like dorsal switch protein 1 triggers a damage signal in mosquito gut to activate dual oxidase via eicosanoids. *Journal of Innate Immunity*, v. 14, p. 657-672, 2022. DOI: 10.1159/000524561.
- AN, X.; YU, W.; LIU, J.; Tang, D., Yang, L., & Chen, X. Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death & Disease*, v. 15, p. 556, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06939-5>.
- BENOIT, J. B.; Lopez-Martinez, G., Patrick, K. R., Phillips, Z. P., Krause, T. B., & Denlinger, D. L. Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 19, p. 8026-8029, 2011.
- BI, J. L.; FELTON, G. W. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology*, v. 21, p. 1511-1530, 1995.
- CANCINO-RODEZNO, A.; Cancino-Rodezno, A., Lozano, L., Oppert, C., Castro, J. I., Lanz-Mendoza, H., Encarnación, S., EVANS, A. E.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; JURAT-FUENTES, J.; Bravo, A. Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. e37034, 2012.
- CHAITANYA, R. K.; SHASHANK, K.; SRIDEVI, P. Oxidative stress in invertebrate systems. *Free Radicals and Diseases*, v. 19, p. 51-68, 2016.
- CHAMPION, C. J.; XU, J. Redox state affects fecundity and insecticide susceptibility in *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports*, v. 8, p. 13054, 2018.
- CHIMKHAN, N; Thammasittirong, S. N. R., Roytrakul, S., Krobthong, S., & Thammasittirong, A. Proteomic response of *Aedes aegypti* larvae to silver/silver chloride nanoparticles synthesized using *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* metabolites. *Insects*, v. 13, n. 7, p. 641, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects13070641>.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES, J. R. III. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*, v. 450, p. 991-1000, 2007.

FELTON, G. W.; SUMMERS, C. B. Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 29, p. 187-197, 1995.

GEISER, D. L.; THAI, T. N., LOVE, M. B., & WINZERLING, J. J. Iron and ferritin deposition in the ovarian tissues of the yellow fever mosquito (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Science*, v. 19, n. 5, p. 1-9, 2019. DOI: 10.1093/jisesa/iez089.

GONÇALVES, R. L.; MACHADO, A. C. L., PAIVA-SILVA, G. O., SORGINE, M. H., MOMOLI, M. M., OLIVEIRA, J. H. M., SANTOS, M. V. A.; OLIVEIRA, A. G. P.; OLIVEIRA, M. F. Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of *Aedes aegypti* mosquito. *PLoS ONE*, v. 4, n. 11, p. e7854, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007854. PMID: 19924237; PMCID: PMC2773413.

GRAÇA-SOUZA, A. V.; MAYA-MONTEIRO, C., PAIVA-SILVA, G. O., BRAZ, G. R., PAES, M. C., SORGINE, M. H., OLIEVIRA, M. F.; OLIVEIRA, P. L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 4, p. 322-335, 2006. DOI: 10.1016/j.ibmb.2006.01.009. PMID: 16551546.

GU, W.; HU, K., ZHOU, J., XIE, Z., ZHAO, Y., ZHAO, S., ... & CHEN, X. G. The dynamics of deltamethrin resistance evolution in *Aedes albopictus* has an impact on fitness and dengue virus type-2 vectorial capacity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 17, n. 9, p. e0011635, 2023.

IMMENSCHUH, S.; VIJAYAN, V.; JANCIAUSKIENE, S.; GUELER, F. Heme as a target for therapeutic interventions. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, p. 146, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00146. PMID: 28420988; PMCID: PMC5378770.

ISHAK, I. H., LAU, B., ABU HASAN, H., MISWAN, N., & OTHMAN, N. Comparative proteomic analysis of permethrin and temephos resistant *Aedes aegypti* larvae and adults. *Scientific Reports*, v. 13, p. 1-15, 2023.

KODRÍK, D.; BEDNÁŘOVÁ, A.; ZEMANOVÁ, M.; KRISHNAN, N. Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 25788-25816, 2015. DOI: 10.3390/ijms161025788.

LIM, M. J.; YAGNIK, G.; HENKEL, C.; FROST, S. F.; BIEN, T.; ROTHSCCHILD, K. J. MALDI HiPLEX-IHC: multiomic and multimodal imaging of targeted intact proteins in tissues. *Frontiers in Chemistry*, v. 11, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1182404>. ISSN: 2296-2646.

LIMA, V. L. A.; LIMA, V. L., DIAS, F., NUNES, R. D., PEREIRA, L. O., SANTOS, T. S., CHIARINI, L. B., RAMOS, T. D.; SILVA-MENDES, B. J.; PERALES, J.; VALENTE, R. H. V.; OLIVEIRA, P. L. The antioxidant role of xanthurenic acid in the *Aedes aegypti* midgut during digestion of a blood meal. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6, p. e38349, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038349>.

Matzinger, M., Mayer, R. L., & Mechtler, K. (2023). Label-free single cell proteomics utilizing ultrafast LC and MS instrumentation: A valuable complementary technique to

- multiplexing. *Proteomics*, 23, e2200162. MEHTA, D.; CHAUDHARY, S.; SUNIL, S. Oxidative stress governs mosquito innate immune signalling to reduce chikungunya virus infection in *Aedes*-derived cells. *Journal of General Virology*, v. 105, n. 3, 2024. DOI: 10.1099/jgv.0.001966. PMID: 38488850.
- MENG, J.-Y.; ZHANG, C.-Y.; ZHU, F.; WANG, X.-P.; LEI, C.-L. Ultraviolet light-induced oxidative stress: Effects on the antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults. *Journal of Insect Physiology*, v. 55, p. 588-592, 2009.
- OLIVEIRA, J. H. M., GONÇALVES, R. L., LARA, F. A., DIAS, F. A., GANDARA, A. C. P., MENNA-BARRETO, R. F., EDWARDS, M. C.; LAURINDO, F. R.M.; SILVA-NETP, M.A.C.; SORGINE, M. H. F.; & OLIVEIRA, P. L. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 3, p. e1001320, 2011. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001320. Erratum in: *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 2, 2013. DOI: 10.1371/annotation/34fed6f4-4096-4980-bf2f-b918e14f5ff5. PMID: 21445237; PMCID: PMC3060171.
- OLIVEIRA, J. H. M., TALYULI, O. A., GONCALVES, R. L., PAIVA-SILVA, G. O., SORGINE, M. H. F., ALVARENGA, P. H., & OLIVEIRA, P. L. Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of dengue but not Zika. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 4, p. e0005525, 2017.
- OLIVEIRA, L.; WILLIAMS, C. M.; HERVANT, F.; OLIVEIRA, B. J.; RENAULT, D. Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 158, p. 229–234, 2011.
- OLIVER, S. V.; BROOKE, B. D. The role of oxidative stress in the longevity and insecticide resistance phenotype of the major malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *PLoS ONE*, v. 11, n. 3, p. e0151049, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0151049. PMID: 26964046; PMCID: PMC4786153.
- PASCOA, V., OLIVEIRA, P. L., DANSA-PETRETSKI, M., SILVA, J. R., ALVARENGA, P. H., JACOBS-LORENA, M., & LEMOS, F. J. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, p. 517-523, 2002.
- PETRETSKI, J. H., DEMASI, M., BECHARA, E. J. H., & OLIVEIRA, P. L. Urate protects a blood-sucking insect against heme-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 22, p. 209–214, 1997.
- PIZZINO, G., IRRERA, N., CUCINOTTA, M., PALLIO, G., MANNINO, F., ARCORACI, V., SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative stress: harm and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, p. 8416763, 2017. DOI: 10.1155/2017/8416763. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28819546; PMCID: PMC5551541.
- PO, A.; EYERS, C. E. Top-Down Proteomics and the Challenges of True Proteoform Characterization. *Journal of Proteome Research*, v. 22, n. 12, p. 3663-3675, 2023. DOI: 10.1021/acs.jproteome.3c00416. Epub 2023 Nov 8.

- POPOVA-BUTLER, A.; DEAN, D. H. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *Journal of Insect Physiology*, v. 55, n. 3, p. 264–272, 2009. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.12.008.
- RIVERO, A.; VÉZILIER, J.; WEILL, M.; READ, A. F.; GANDON, S. Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 8, p. e1001000, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001000>.
- Ronsein, G. E., Pamir, N., von Haller, P. D., Kim, D. S., Oda, M. N., Jarvik, G. P., VAISAR, T.; Heinecke, J. W. Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. *Journal of Proteomics*, v. 113, p. 388–399, 2015. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.10.017.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, v. 24, n. 10, p. 1-5, 2014. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034. PMID: 24845678; PMCID: PMC4055301.
- SOKHNA, C., NDIATH, M. O., & ROGIER, C. The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, n. 10, p. 902-907, 2013. DOI: 10.1111/1469-0691.12314.
- STIEBLER, R., TIMM, B. L., OLIVEIRA, P. L., HEARNE, G. R., EGAN, T. J., & OLIVEIRA, M. F. On the physico-chemical and physiological requirements of hemozoin formation promoted by perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 40, n. 3, p. 284-292, 2010.
- TAN, K. S.; AZMAN, A. S., HASSANDARVISH, P., AMELIA-YAP, Z. H., TAN, T. K., & LOW, V. L. Protein profiling of *Aedes aegypti* treated with *Streptomyces* sp. KSF103 ethyl acetate extract reveals potential insecticidal targets and metabolic pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 2, p. 12398, 2023.
- TARIMO, B. B. LAW, H. C. H., TAO, D., PASTRANA-MENA, R., KANZOK, S. M., BUZA, J. J., & DINGLASAN, R. R. Paraquat-mediated oxidative stress in *Anopheles gambiae* mosquitoes is regulated by an endoplasmic reticulum (ER) stress response. *Proteomes*, v. 6, n. 4, p. 47, 2018. DOI: 10.3390/proteomes6040047.
- VEGVARI, A.; RODRIGUEZ, J. E., & ZUBAREV, R. A. Single-cell chemical proteomics: Quantitative assessment of target engagement and drug effects at single-cell resolution. *Nature Communications*, 2022.
- WANG, W.; Lv, Y., Fang, F., Hong, S., Guo, Q., Hu, S., ... ZOU, F.; SHI, L.; LEI, Z.; ZHOU, D.; ZHANG, D.; SUN, Y.; MA, L.; Zhu, C. Identification of proteins associated with pyrethroid resistance by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis in *Culex pipiens pallens*. *Parasites & Vectors*, v. 8, p. 95, 2015.
- WHITEN, S. R.; RAY, W. K., HELM, R. F., & ADELMAN, Z. N. CHARACTERIZATION of the adult *Aedes aegypti* early midgut peritrophic matrix proteome using LC-MS. *PLoS ONE*, v. 13, n. 3, p. e0194734, 2018.

Dados Suplementares

Gráfico S 1. Efeito do tratamento com hemina na sobrevivência de larvas de mosquitos.

As larvas foram expostas a diferentes concentrações de hemina (5 mM, 10 mM, 20 mM e 25 mM) e a sobrevivência foi monitorada por 72 horas. O grupo controle foi mantido apenas em água. Os pontos de dados representam a porcentagem média de sobrevivência, e as barras de erro indicam o erro padrão da média.

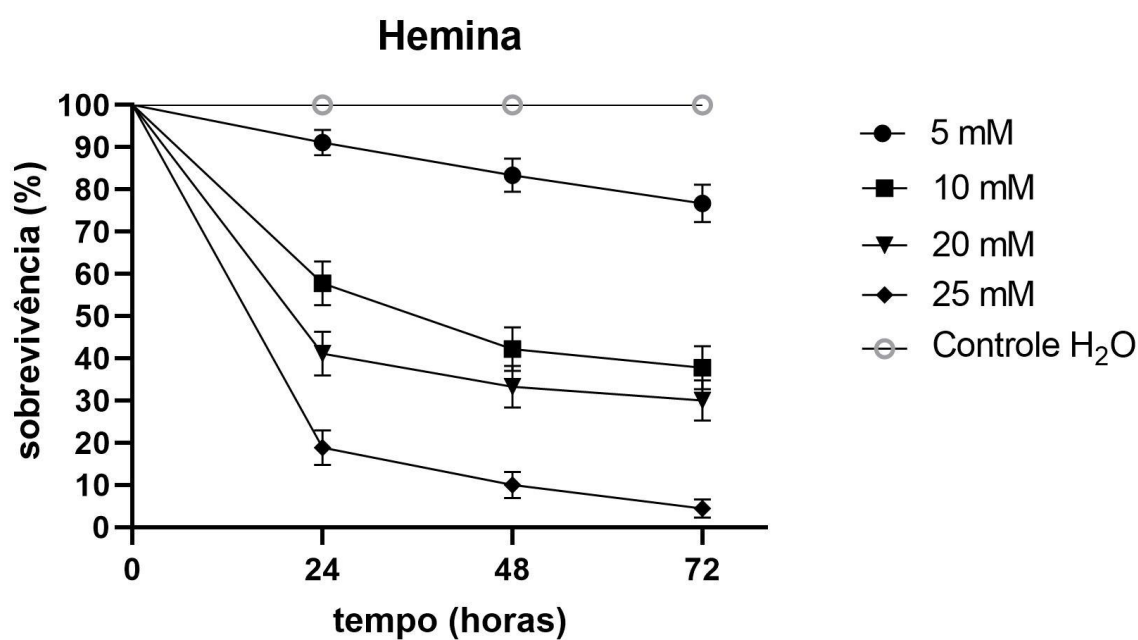


Tabela S 2. Proteínas de larvas de *A. aegypti* que foram mais expressas após tratamento com heme 10 mM.

PROTEÍNA	FOLD CHANGE
EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4 GAMMA	2,386318682
PUTATIVE IGF-II MRNA-BINDING PROTEIN IMP	2,236846594
MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN JUPITER	1,813586876
CUTICLE PROTEIN 12.5	1,645516687
RRM DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	1,556393349
PROBABLE ELONGATION FACTOR 1-BETA	1,539773727

FIBRONECTIN TYPE-III DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	1,478047297
FAS-ASSOCIATED FACTOR 1 ISOFORM	1,442943496
MYOSIN-2 ESSENTIAL LIGHT CHAIN ISOFORM X1	1,288244969
TLD DOMAIN-CONTAINING PROTEIN MUSTARD	1,257797757
60S RIBOSOMAL PROTEIN L36	1,063193826
SECRETED PROTEIN	1
PREFOLDIN, SUBUNIT, PUTATIVE	0,887525271
PROBABLE FATTY ACID-BINDING PROTEIN	0,798366139
SUPEROXIDE DISMUTASE [MN], MITOCHONDRIAL	0,792999629
ADDUCIN	0,788495895
PARAMYOSIN, SHORT FORM ISOFORM X2	0,680540161
MYB-LIKE PROTEIN AA	0,671674134

Tabela S 3. Proteínas de larvas de *A. aegypti* que foram menos expressas após tratamento com heme 10 mM.

PROTEÍNA	FOLD CHANGE
AAEL009317-PA	-4,07965
AAEL009682-PA	-3,92283
AAEL012883-PA	-3,47947
ALPHA-MANNOSIDASE	-3,35628
SERINE-TYPE ENODPEPTIDASE	-3,26246
ATP-CITRATE SYNTHASE	-3,11524
AAEL001061-PB	-2,77392
PUPAL CUTICLE PROTEIN, PUTATIVE	-2,73312

ACYL-COA DEHYDROGENASE	-2,70799
AAEL017385-PA	-2,5325
AAEL011032-PA	-2,42049
DIHYDROPYRIMIDINASE	-2,37721
CYSTEINYLGLYCINE-S-CONJUGATE DIPEPTIDASE	-2,35141
ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME	-2,3484
26S PROTEASE (S4) REGULATORY SUBUNIT, PUTATIVE	-2,27707
AAEL010850-PI	-2,26869
ALPHA-GLUCOSIDASE1	-2,25831
ACTIN, MUSCLE	-2,21459
MITOCHONDRIAL ATP SYNTHASE F CHAIN	-2,18442
ATP-DEPENDENT 6-PHOSPHOFRUCTOKINASE	-2,11806
CALRETICULIN	-2,05782
CYSTATIN DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	-2,04836
40S RIBOSOMAL PROTEIN S23	-2,04363
AMINOPEPTIDASE1	-2,0335
AAEL003256-PA	-2,0282
GLUCOSE DEHYDROGENASE	-2,01267
AAEL005611-PA	-1,99196
CATALASE	-1,94555
26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT 7	-1,93357
TUBULIN BETA CHAIN	-1,89895
GCS LIGHT CHAIN	-1,80039
60S RIBOSOMAL PROTEIN L32	-1,77277
26S PROTEASE REGULATORY SUBUNIT S10B	-1,76553
AAEL004778-PA	-1,74904
PROTEASOME SUBUNIT BETA	-1,73427

AAEL001946-PA	-1,71772
FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE	-1,7101
GLYCOGEN DEBRANCHING ENZYME ISOFORM X1	-1,69997
ADENOSINE DEAMINASE	-1,67386
AMINOPEPTIDASE	-1,66034
MOLYBDOPTERIN COFACTOR SULFURASE (MOSC)	-1,64284
GLUTATHIONE TRANSFERASE	-1,63961
ALDEHYDE DEHYDROGENASE (NAD(+))	-1,6368
3-HYDROXYISOBUTYRATE DEHYDROGENASE	-1,63529
AAEL009808-PA	-1,63421
60S RIBOSOMAL PROTEIN L13A (FRAGMENT)	-1,58496
PROBABLE MEDIUM-CHAIN SPECIFIC ACYL- COA DEHYDROGENASE, MITOCHONDRIAL	-1,57657
POLYOL DEHYDROGENASE	-1,56828
MANNOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE	-1,56799
ALPHA-GLUCOSIDASE	-1,52675
GLUTAMINE AMIDOTRANSFERASE	-1,51457
ATP SYNTHASE SUBUNIT G, MITOCHONDRIAL	-1,49596
NADH DEHYDROGENASE [UBIQUINONE] IRON-SULFUR PROTEIN 6, MITOCHONDRIAL	-1,48981
UNCHARACTERIZED PROTEIN	-1,48771
GLYCYLPEPTIDE N- TETRADECANOYLTRANSFERASE	-1,47897
ORNITHINE--OXO-ACID AMINOTRANSFERASE	-1,47626
EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT B	-1,45431
AAEL011641-PA	-1,4303

CARBOXYLIC ESTER HYDROLASE (FRAGMENT)	-1,42968
AAEL008768-PB	-1,40465
3-HYDROXYISOBUTYRYL-COA HYDROLASE, MITOCHONDRIAL	-1,39766
SELENIUM-BINDING PROTEIN	-1,38466
AAEL008152-PA	-1,36082
NADH DEHYDROGENASE [UBIQUINONE] IRON-SULFUR PROTEIN 3, MITOCHONDRIAL	-1,3388
VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT H	-1,33433
AAEL011206-PA	-1,33145
AAEL008454-PA	-1,3151
URICASE	-1,30933
40S RIBOSOMAL PROTEIN S8	-1,30812
ATP SYNTHASE SUBUNIT ALPHA, MITOCHONDRIAL	-1,29603
ELONGATION FACTOR 1-GAMMA	-1,29187
SUCCINATE DEHYDROGENASE [UBIQUINONE] IRON-SULFUR SUBUNIT, MITOCHONDRIAL	-1,27399
UNCHARACTERIZED PROTEIN1	-1,26408
CHROMO DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	-1,26383
NADH DEHYDROGENASE [UBIQUINONE] 1 ALPHA SUBCOMPLEX SUBUNIT 10, MITOCHONDRIAL	-1,25906
TROPOMODULIN	-1,24056
IMPORTIN SUBUNIT ALPHA	-1,21917
HEAT SHOCK COGNATE 70	-1,21299
PROTEIN-SYNTHEZING GTPASE	-1,20645
AAEL001256-PA	-1,1976
RETROTRANS_GAG DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	-1,19265

PROTEASOME ACTIVATOR SUBUNIT REG	-1,16542
STAPHYLOCOCCAL NUCLEASE DOMAIN- CONTAINING PROTEIN	-1,13924
HEAT SHOCK PROTEIN 83	-1,12398
40S RIBOSOMAL PROTEIN S17	-1,12399
ISOCITRATE DEHYDROGENASE [NADP]1	-1,11974
UNCHARACTERIZED PROTEIN LOC5576001	-1,11894
AAEL010284-PA	-1,11681
NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE	-1,08168
ASPARTATE AMINOTRANSFERASE	-1,06986
MALATE DEHYDROGENASE	-1,05927
AAEL009257-PA	-1,05482
GLUTAMATE DEHYDROGENASE (NAD(P)(+))	-1,05153
AAEL007023-PA	-1,05063
PEPTIDASE S1 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	-1,04821
60S RIBOSOMAL PROTEIN L27A	-1,04762
HEXAMERIN 2 BETA	-1,04401
UNCHARACTERIZED PROTEIN7	-1,04026
UNCHARACTERIZED PROTEIN6	-1,03125
AAEL012697-PA	-1,02934
60S RIBOSOMAL PROTEIN L18A	-1,01707
CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VA	-1,00827
ODORANT BINDING PROTEIN OBP12	-1,00643
AAEL014080-PA	-0,98063
ATP SYNTHASE SUBUNIT BETA	-0,97654
AAEL013069-PA	-0,97212
AAEL004921-PA	-0,9674
AAEL006912-PA	-0,94811

UNCHARACTERIZED PROTEIN LOC23687573 ISOFORM X1	-0,93525
PYRUVATE KINASE	-0,92471
TRANSALDOLASE	-0,92296
FUMARATE HYDRATASE, MITOCHONDRIAL ISOFORM X3	-0,91475
FUMARYLACETOACETATE HYDROLASE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 ISOFORM X1	-0,91448
40S RIBOSOMAL PROTEIN S4	-0,89691
AAEL003716-PA	-0,84851
60S RIBOSOMAL PROTEIN L44	-0,84683
AAEL007648-PA	-0,84684
ISOCITRATE DEHYDROGENASE [NADP]	-0,83399
60S RIBOSOMAL PROTEIN L7	-0,82166
UNCHARACTERIZED PROTEIN5	-0,80006
GLUTAMINE--FRUCTOSE-6-PHOSPHATE TRANSAMINASE (ISOMERIZING)	-0,79141
PROFILIN	-0,78277
SODIUM/POTASSIUM-TRANSPORTING ATPASE SUBUNIT ALPHA ISOFORM X3	-0,72624
40S RIBOSOMAL PROTEIN S6 (FRAGMENT)	-0,6845
UPF0389 PROTEIN CG9231	-0,67557
ATP SYNTHASE SUBUNIT D, MITOCHONDRIAL	-0,66395
UNCHARACTERIZED PROTEIN4	-0,65355
GLYCOGEN PHOSPHORYLASE	-0,64909
DUF3421 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	-0,64853
60S RIBOSOMAL PROTEIN L9	-0,64599
TRIFUNCTIONAL ENZYME SUBUNIT ALPHA, MITOCHONDRIAL	-0,63005

60S RIBOSOMAL PROTEIN L4	-0,62803
PROTEIN DISULFIDE-ISOMERASE	-0,62719
60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P0	-0,61534
RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR ALPHA	-0,60572
METHENYL TETRAHYDROFOLATE SYNTHASE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	-0,60164

Tabela S 4. Proteínas de adultos de *A. aegypti* que foram mais expressas após tratamento com heme 10 mM.

PROTEÍNA	FOLD CHANGE
AAEL013511-PA	2,082258
AAEL017262-PA	1,784368
ENDOPLASMIN	1,736966
HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN D	1,713028
UNCHARACTERIZED PROTEIN LOC5568139	1,666263
SUCCINATE DEHYDROGENASE [UBIQUINONE] IRON-SULFUR SUBUNIT, MITOCHONDRIAL	1,666263
LARVAL/PUPAL CUTICLE PROTEIN H1C	1,63429
ACETYL-COA DEACYLASE	1,555127
NADH DEHYDROGENASE [UBIQUINONE] 1 BETA SUBCOMPLEX SUBUNIT 7	1,361456
MITOCHONDRIAL IMPORT INNER MEMBRANE TRANSLOCASE SUBUNIT	1,352302
ELECTRON TRANSFER FLAVOPROTEIN SUBUNIT ALPHA, MITOCHONDRIAL	1,303264
THYMOSIN BETA	1,255839
LOW QUALITY PROTEIN: UNCHARACTERIZED PROTEIN LOC5576344	1,242494
RAP55	1,21205
GELSOLIN	1,163499
NADH DEHYDROGENASE [UBIQUINONE] FLAVOPROTEIN 2, MITOCHONDRIAL	1,160773
CUTICLE PROTEIN 12.5	1,125531
UNCHARACTERIZED PROTEIN LOC5578392 ISOFORM X1	1,070389
ATP SYNTHASE SUBUNIT ALPHA, MITOCHONDRIAL	0,974313
ALDEHYDE DEHYDROGENASE, MITOCHONDRIAL	0,924449
CUTICLE PROTEIN 2	0,864345
AAEL011068-PA	0,852443
ATP SYNTHASE SUBUNIT D, MITOCHONDRIAL	0,796747
VOLTAGE-DEPENDENT ANION-SELECTIVE CHANNEL-LIKE SPECTRIN ALPHA CHAIN ISOFORM X1	0,774933
TITIN HOMOLOG ISOFORM X7	0,756074

TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE0,741932
