



Peritrophic Membrane Formation in Adult *Aedes aegypti* after Blood Feeding

Supattra Suwanmanee¹, Urai Chaisri¹, Natthanej Luplertlop²

¹ Department of Tropical Pathology, ² Department of Tropical Hygiene, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Abstract

The peritrophic membrane (PM) is an acellular sheath that lines the digestive tract, separating the ingested food bolus from the midgut epithelium. It plays important roles in protecting the midgut epithelium from mechanical damage and insults from pathogens, and in facilitating food digestion. The purpose of this study was to examine the involvement of the PM in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes after blood feeding.

Ae. aegypti mosquitoes were fed with sucrose and blood, and collected at 0.5, 1, and 6 h post-oral feeding, respectively. Then, they were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer containing 5% sucrose pH 7.4 at 4°C, and prepared for study under a light microscope.

PM was not produced when the mosquitoes received sucrose or fasted. Contrary to the blood feeding group, the PM clearly formed at 6 h post-feeding. It was concluded that PM construction was related to the ingestion of blood by the mosquitoes.

Keywords: peritrophic membrane, *Aedes aegypti*, structure

บทนำ

ยุงลายเป็นพาหะที่สำคัญในการแพร่กระจายเชื้อไวรัสไข้เลือดออกหรือไวรัสเดงกี ยุงลายมีหลายชนิดที่สามารถแพร่เชื้อไวรัสชนิดนี้ได้แก่ยุง *Aedes aegypti* ถือว่ามีความสำคัญทางด้านระบาดวิทยาของโรคไข้เลือดออก เนื่องจากเป็นยุงที่อยู่ใกล้ชิดกับคนมาก โดยยุงลายตัวเมียจะดูดเลือดจากผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัสอยู่ในกระแสเลือด (ระยะที่มีไข้สูง) เข้าไป ใช้เวลาประมาณ 8-10 วัน เชื้อไวรัสในกระเพาะอาหารจะเพิ่มจำนวนและฝังตัวอยู่บริเวณผนังกระเพาะอาหารของยุง หลังจากนั้นจึงจะเข้าสู่ต่อมน้ำลาย เติบโตพร้อมที่จะปล่อยเชื้อไวรัสให้กับคนที่ถูกกัดครั้งต่อไป [1]

ในทางเดินอาหารของสัตว์จำพวกแมลง พบว่ามีการสร้างเยื่อชนิดหนึ่งเรียกว่า peritrophic membrane (หรือเรียกว่า

peritrophic matrix) (PM) ซึ่งเป็นเยื่อบางๆ ที่อยู่ระหว่าง food bolus และ midgut epithelium [2-4] องค์ประกอบของ PM ประกอบด้วย ไคติน โปรตีน และ โปรติโอไกลแคน [5] ทำหน้าที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อชนิดต่างๆ เข้าสู่ตัวยุง จึงจัดว่าเป็น first mechanical defense นอกจากนี้ยังทำหน้าที่หล่อลื่นให้อาหารผ่านไปทางเดินอาหารได้ง่าย ป้องกันการบวมและแตกของ midgut หลังจากการกินอาหารที่มีน้ำหนักโมเลกุลและแรงดันออสโมติกสูง รวมทั้งควบคุมอัตราการย่อยอาหารโดยป้องกันไม่ให้เอนไซม์ย่อยอาหารเร็วหรือช้าเกินไป [6-9] PM ที่ถูกสร้างจาก midgut ของยุงมีสองชนิด ได้แก่ PM ชนิดที่ 1 จะสร้างขึ้นในยุงตัวเต็มวัยเพศเมีย และ PM ชนิดที่ 2 จะสร้างในระยะที่เป็นลูกน้ำ ส่วนในยุงเพศผู้จะไม่มีการสร้าง PM [3,10]

เนื่องจาก PM มีหน้าที่สำคัญต่อยุง และการศึกษาเกี่ยวกับ PM ในยุง *Ae. aegypti* ยังมีน้อย คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับการสร้างและลักษณะทางฮิสโตโลยีของ PM ในยุงชนิดนี้ว่ามีการสร้างที่ระยะเวลาใด และมีความสัมพันธ์กับอาหารที่ยุงกินหรือไม่

Correspondence:

Natthanej Luplertlop,

E-mail: <tmnll@mahidol.ac.th>

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. เพาะเลี้ยงยุง *Ae. aegypti* (white-eyed Liverpool strain) ในห้องปฏิบัติการภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อเลี้ยงจนถึงระยะตัวโตเต็มวัย อายุประมาณ 3-4 วัน จึงเลือกยุงเพศเมียจำนวน 110 ตัว มาใช้ในการทดลอง

2. ก่อนทำการทดลอง อดอาหารยุงนาน 2 วัน แล้วเก็บตัวอย่างยุงจำนวน 20 ตัว ไว้เป็นกลุ่มควบคุมจากนั้นแบ่งยุงออกเป็น 2 กลุ่ม ให้อาหารยุงด้วยวิธี oral feeding โดย กลุ่มที่ 1 ให้กินน้ำตาลาน (10% sucrose) และ กลุ่มที่ 2 ให้กินเลือดหนูตะเภา (สำนักสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล) วิธีให้อาหารยุงแต่ละกลุ่มทำโดยหยดอาหารยุงบนตาข่ายที่ใช้ปิดฝากล่องที่ใช้เลี้ยงยุง โดยให้ยุงกินอาหารเป็นเวลา 45 นาที แล้วจึงเก็บตัวอย่างยุงแต่ละกลุ่มหลังจาก oral feeding นาน 0.5, 1, และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำยุงแต่ละกลุ่มมาทำการตัดส่วนปีกและขาออก นำตัวอย่างยุงมา fix ทั้งตัวใน 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer containing 5% sucrose, pH 7.4 อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง เพื่อรักษาสภาพของตัวอย่างก่อนที่จะทำการศึกษาโดยการย้อมสี PAS และ toluidine blue ต่อไป (รายละเอียดการเก็บตัวอย่างยุงแต่ละกลุ่มแสดงในตารางที่ 1)

3. เตรียมตัวอย่างยุงเพื่อศึกษาด้วย light microscope (LM)

3.1 การย้อมสี PAS (Periodic Acid Schiff) ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ เช่น ไกลโคเจน ไกลโคโปรตีน และโปรตีนไกลเคน เป็นต้น [11] การทดลองนี้ต้องการศึกษา PM ซึ่งมีโปรตีนไกลเคนเป็นองค์ประกอบ จึงใช้สี PAS ในการย้อม โดยหลังจากที่ยุงผ่านขั้นตอนการ fix ใน 2.5% glutaraldehyde แล้ว ให้เตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนดังนี้

- 1) dehydration เพื่อขจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้ ethanol ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูงสุด (70, 80, 95, 100%)
- 2) clearing โดยแช่ตัวอย่างใน dioxane
- 3) infiltration โดยแช่ตัวอย่างในส่วนผสมของ dioxane และ paraffin ในอัตราส่วน 1:1 และต่อมาแช่ใน paraffin
- 4) embedding โดยการฝังตัวอย่างใน paraffin หลังจากนั้นจึงนำ block paraffin ที่ได้มาตัดให้มีความหนา 5-7 μm นำแผ่นชิ้นเนื้อที่ตัดได้วางบนสไลด์แก้ว แล้วนำไปย้อมสี PAS [11]

3.2 การย้อมสี toluidine blue หลังจาก fix ตัวอย่างใน 2.5% glutaraldehyde แล้วล้างด้วย buffer ให้ทำการ fix ตัวอย่างอีกครั้งด้วย 1% osmium tetroxide ก่อนที่จะเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนดังนี้

- 1) dehydration ด้วย ethanol ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูงสุด (30, 50, 70, 90, 100%)
- 2) clearing โดยแช่ตัวอย่างใน propylene oxide (PO)
- 3) infiltration โดยแช่ตัวอย่างในส่วนผสมของ PO และ EPON (สารผสมพลาสติก) ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 ตามลำดับ สุดท้ายให้แช่ใน EPON
- 4) embedding โดยการฝังตัวอย่างใน EPON ต่อมานำไปอบในตู้อบจนกระทั่ง block ตัวอย่างแข็ง แล้วตัดให้มีความหนา 0.5-1 μm วางแผ่นชิ้นเนื้อที่ตัดได้บนสไลด์แก้ว แล้วย้อมด้วย 1% toluidine blue

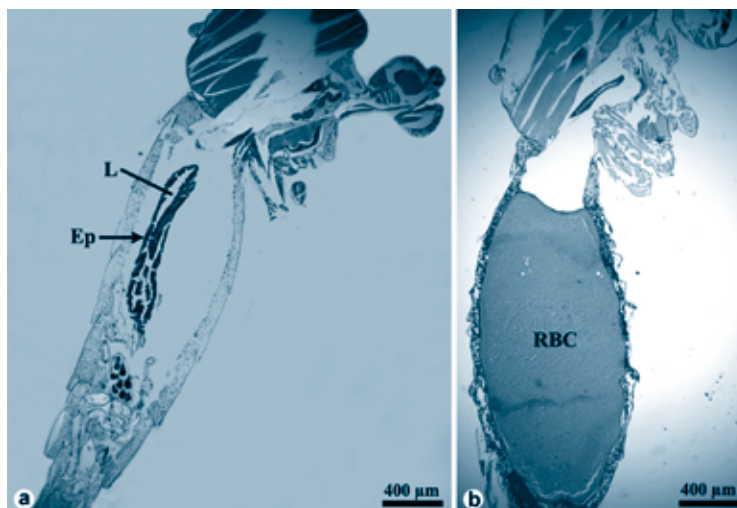
ตารางที่ 1 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างยุง *Ae. aegypti* แต่ละกลุ่มในการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่อดอาหาร (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ให้กินน้ำตาลาน (กลุ่มที่ 1) และกลุ่มที่ให้กินเลือด (กลุ่มที่ 2) ที่เวลา 0.5, 1, และ 6 ชั่วโมง

	จำนวนยุงที่เก็บ (ตัว)	ย้อม PAS (ตัว)	ย้อม toluidine blue (ตัว)
กลุ่มควบคุม	20	10	10
กลุ่มที่ 1			
0.5 ชม.	10	5	5
1 ชม.	10	5	5
6 ชม.	10	5	5
กลุ่มที่ 2			
0.5 ชม.	20	10	10
1 ชม.	20	10	10
6 ชม.	20	10	10

ผลการศึกษา

การศึกษาโดยการย้อมสี PAS พบว่าในยุงกลุ่มที่อดอาหาร (กลุ่มควบคุม) ส่วนของ midgut จะเห็น lumen ที่ว่างเปล่า (รูปที่ 1a) ในขณะที่ยุงกลุ่มที่ให้กินเลือด (กลุ่มที่ 2) ของทุกช่วงเวลา คือ 0.5, 1 และ 6 ชั่วโมง พบว่าส่วน lumen ของ midgut ซึ่งมีเลือดอยู่ภายในจะขยายออก (รูปที่ 1b, รูปแสดงเฉพาะที่ 6 ชั่วโมง)

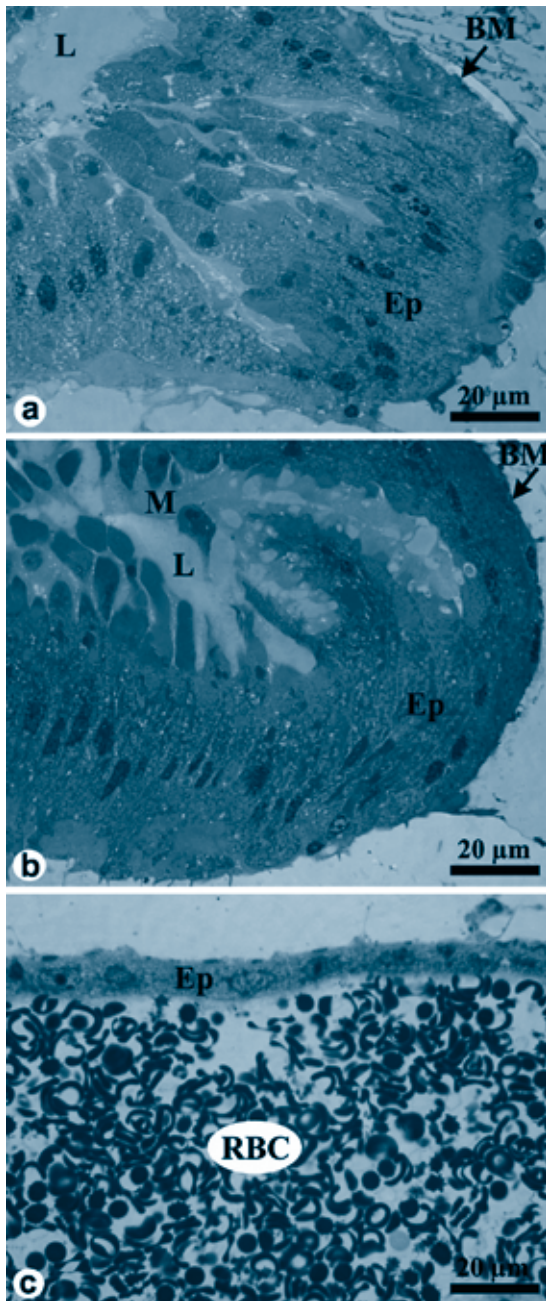
ผลจากการย้อมด้วย toluidine blue ไม่พบว่ามีโครงสร้าง PM ทั้งในยุงกลุ่มที่อดอาหาร (รูปที่ 2a) และกลุ่มที่ให้กินน้ำหวาน (กลุ่มที่ 1) (รูปที่ 2b) ในยุงทั้งสองกลุ่มนี้พบว่า epithelial cells ที่ lining midgut เป็นเซลล์ชั้นเดียวชนิด columnar เซลล์เหล่านี้จะวางอยู่บน basement membrane ส่วนปลายของเซลล์จะมี microvilli จำนวนมากขึ้นเข้าสู่ lumen (รูปที่ 2a,b)



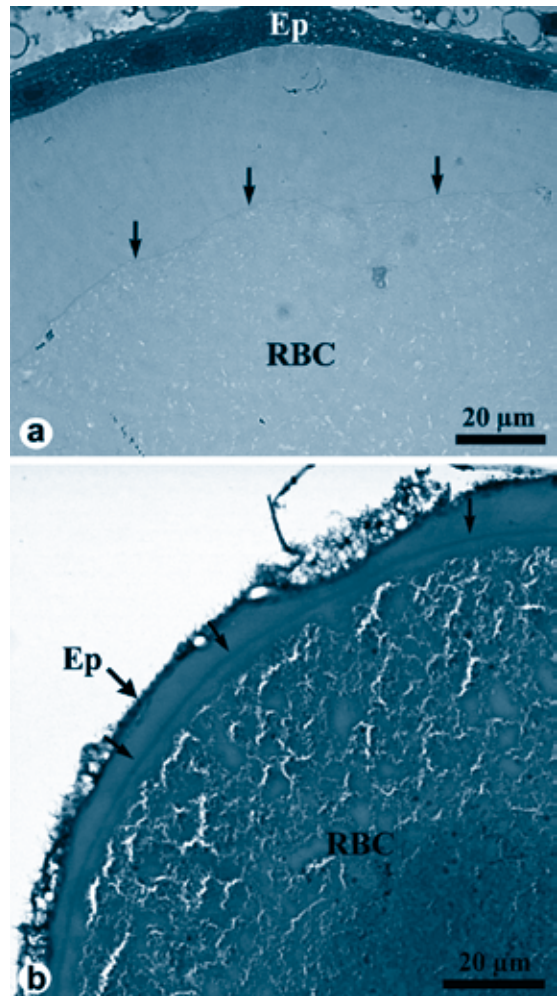
รูปที่ 1 รูปจาก light microscope ย้อมด้วย PAS แสดง longitudinal sections ของยุง *Ae. aegypti* เพศเมีย พบว่าใน midgut ของยุงกลุ่มที่อดอาหารจะเห็น lumen ที่ว่างเปล่า (a) ในยุงกลุ่มที่ให้กินเลือด ส่วนของ lumen ซึ่งมีเลือดอยู่ภายในจะขยายออก (b). Ep = epithelium, L = lumen, RBC = red blood cells.

ตารางที่ 2 การศึกษาโดยการย้อมสี PAS และ toluidine blue แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการสร้างของ PM กับอาหารที่ยุง *Ae. aegypti* กิน โดยเปรียบเทียบในยุงกลุ่มที่ให้กินน้ำหวาน (กลุ่มที่ 1), ให้กินเลือด (กลุ่มที่ 2) ที่เวลา 0.5, 1, และ 6 ชั่วโมง กับยุงกลุ่มที่อดอาหาร (กลุ่มควบคุม)

	การสร้าง PM	
	ย้อม PAS	ย้อม toluidine blue
กลุ่มควบคุม	-	-
กลุ่มที่ 1		
0.5 ชม.	-	-
1 ชม.	-	-
6 ชม.	-	-
กลุ่มที่ 2		
0.5 ชม.	-	-
1 ชม.	-	-
6 ชม.	+	+



รูปที่ 2 รูปจาก light microscope แสดง cross sections ของ midgut ยุง *Ae. aegypti* เพศเมีย ย้อมด้วย toluidine blue ในยุงที่อดอาหาร (a) ยุงที่ให้น้ำหวาน (b) และยุงที่ให้กินเลือดที่เวลา 1 ชั่วโมง (c) ไม่พบว่ามี การสร้าง PM ในทั้ง 3 กลุ่ม. BM = basement membrane, Ep = epithelium, L = lumen, M = microvilli, RBC = red blood cells.



รูปที่ 3 รูปจาก light microscope ย้อมด้วย toluidine blue (a) และ PAS (b) ของ midgut ยุง *Ae. aegypti* เพศเมีย หลังจากกินเลือดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะปรากฏ PM เป็นเส้นบาง ๆ (ลูกศรชี้) อยู่ล้อมรอบ lysed RBC. Ep = epithelium, RBC = red blood cells.

ในยุงกลุ่มที่ให้กินเลือด พบว่า epithelium ที่ lining midgut ประกอบด้วยเซลล์ชั้นเดียวชนิด cuboid ซึ่งในการศึกษานี้พบลักษณะเป็น low cuboid มี microvilli อยู่ในส่วนปลาย (รูปที่ 2c) จากการทดลองที่ให้ยุงกินเลือดเป็นเวลา 0.5 และ 1 ชั่วโมง ไม่พบว่ามี การสร้าง PM (รูปที่ 2c, รูปแสดงเฉพาะที่ 1 ชั่วโมง) แต่จะพบว่าเริ่มมีการสร้าง PM ขึ้นหลังจากยุงกินเลือดไปแล้ว 6 ชั่วโมง เมื่อย้อมด้วย toluidine blue จะเห็น PM ปรากฏเป็นเส้นบาง ๆ ติดสีน้ำตาลอ่อน อยู่ระหว่าง food bolus และ midgut epithelium (รูปที่ 3a) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการย้อมด้วย PAS ที่พบ PM ที่เวลา

6 ชั่วโมง เช่นกัน โดยจะเห็นลักษณะของ PM เป็นเส้นบางๆ ติดสีชมพู (รูปที่ 3b) และในเวลาที่จะเริ่มเห็นลักษณะของเม็ดเลือดแดงที่มีการย่อยสลาย (รูปที่ 3a,b)

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการสร้างของ PM กับอาหารที่ยุง *Ae. aegypti* กิน แสดงในตารางที่ 2

วิจารณ์ผลการศึกษา

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาลักษณะฮิสโตโลยีของ PM ใน midgut ของยุง *Ae. aegypti* พบว่าการสร้าง PM ในยุงชนิดนี้ จะถูกกระตุ้นโดยเลือดที่ยุงกินเป็นอาหาร เนื่องจากยุงกลุ่มที่ให้กินน้ำหวานและยุงที่อดอาหารไม่พบว่ามีการสร้าง PM ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานของนักวิจัยหลายๆ กลุ่ม ได้แก่ Perrone and Spielman [12], Jacobs-Lorena and Oo [2], Tellam *et al* [3] และ Shao *et al* [4] ที่พบว่าเมื่อยุงกินเลือดจะมีการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีนและโคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของ PM [13-17] หากมีการสังเคราะห์โปรตีนเพียงอย่างเดียว แต่การสังเคราะห์โคตินถูกรบกวนก็จะไม่มีการสร้าง PM [5,18] ในทำนองเดียวกันการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนก็มีผลรบกวนการสร้าง PM เช่นกัน [19,20] จากผลการวิจัยนี้พบว่ายุง *Ae. aegypti* ที่กินเลือดเป็นอาหาร จะมีการสร้าง PM ที่ 6 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาโดย Freyvogel and Staubli [21] และ Perrone and Spielman [12]

ยุงมีการสร้าง PM เป็น defense mechanism ในการป้องกันการติดเชื้อต่างๆ เข้าสู่ตัวยุง โดยประสิทธิภาพในการเป็น barrier ของ PM นั้นขึ้นอยู่กับเวลาในการสร้างว่าจะสร้างได้เร็วกว่าระยะเวลาที่เชื้อโรคใช้ในการ invade เข้าสู่ midgut หรือไม่ มีรายงานผลการศึกษาในยุง *Culex quinquefasciatus* ว่า *Litomosoides chagasi* microfilariae สามารถ penetrate ผ่าน PM เข้าสู่ midgut epithelium ได้ในระยะแรกที่เริ่มสร้าง PM แต่เมื่อ PM มีการพัฒนาอย่างสมบูรณ์แล้ว microfilariae จะไม่สามารถผ่านเข้าไปยัง midgut ได้อีกต่อไป [22] และระดับการปนเปื้อนของเชื้อโรคในอาหารที่แมลงกินเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสร้าง PM โดยแมลงที่กินอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคจำนวนมากจะสร้าง PM ในขณะที่แมลงที่กินอาหารที่ค่อนข้าง sterile หรือมีการปนเปื้อนเชื้อโรคน้อยจะไม่พบ PM [8] การ invade ของเชื้อโรคเข้าสู่ midgut หลังจาก PM สร้างขึ้นโดยสมบูรณ์แล้ว อาจเกิดจากความสามารถของเชื้อโรคในการสร้างสารบางชนิดที่มีคุณสมบัติไปทำลายโครงสร้างของ PM ตามการศึกษาของ Vinetz *et al* [23] และ Giansanti *et al* [24] พบว่าเชื้อ *Plasmodium* สามารถ invade midgut ของยุงที่มีการสร้าง PM ที่สมบูรณ์แล้ว โดย parasite จะหลั่ง chitinases และ proteases ไปทำลายโครงสร้างของ PM ทำให้ PM ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้อีกต่อไป

สรุปผลการวิจัยนี้พบว่า ระยะเวลาในการสร้างของ PM มีความสัมพันธ์กับอาหารที่ยุงกินเข้าไป โดยยุง *Ae. aegypti* จะ

สร้าง PM ใน midgut เมื่อยุงได้กินเลือดเป็นอาหาร การสร้าง PM เป็น defense mechanism อย่างหนึ่งของยุงเพื่อป้องกันการติดเชื้อต่างๆ การทราบระยะเวลาการสร้าง PM จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการวิจัยในขั้นต่อไปเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไวรัสในยุงมีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ PM อย่างไร และเชื้อไวรัสใช้เวลาเท่าใดจึงจะผ่าน PM เข้าไปเพิ่มจำนวนใน midgut ของยุง *Ae. aegypti*

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ประจำปีงบประมาณ 2549 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชากีฏวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงยุง *Ae. aegypti*

เอกสารอ้างอิง

1. Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ. Natural cycles of vector borne pathogens. In: Marquardt WC, Beaty BJ, editors. Biology of disease vectors. Boulder: University Press of Colorado; 1996. p. 51-72.
2. Jacobs-Lorena M, Oo MM. The peritrophic matrix of insects. In: Beaty BJ, Marquardt WC, editors. The biology of disease vectors. Colorado: University Press of Colorado; 1996. p. 318-32.
3. Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins. Insect Biochem Mol Biol. 1999;29:87-101.
4. Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. Arch Insect Biochem Physiol. 2001;47:119-25.
5. Wang P, Granados RR. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. Arch Insect Biochem Physiol. 2001;47:110-8.
6. Zhuzhikov DP. Function of the peritrophic membrane in *Musca domestica* L. and *Calliphora erythrocephala* Meig. J Insect Physiol. 1964;10:273-8.
7. Terra WR. Evolution of digestive systems of insects. Annu Rev Entomol. 1990;35:181-200.
8. Lehan MJ. Peritrophic matrix structure and function. Annu Rev Entomol. 1997;42:525-50.
9. Villalon JM, Ghosh A, Jacobs-Lorena M. The

- peritrophic matrix limits the rate of digestion in adult *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Insect Physiol.* 2003;49:891-5.
10. Tellam R. The peritrophic matrix. In: Lehane MJ, Billingsley PF, editors. *The insect midgut*. London: Chapman & Hall; 1996.
11. Luna LG. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Book Company; 1968. p. 158-60.
12. Perrone JB, Spielman A. Time and site of assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Tissue Res.* 1988;252:473-8.
13. Bertram DS, Bird RG. Studies on mosquito-borne viruses in their vectors 1: the normal fine structure of the midgut epithelium of the adult female *Aedes aegypti* (L.) and the functional significance of its modifications following a blood meal. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1961;55:404-23.
14. Staubli W, Freyvogel TA, Suter J. Structural modifications of the endoplasmic reticulum of midgut epithelial cells of mosquitoes in relation to blood intake. *J Microsc.* 1966;5:189-204.
15. Peters W. Peritrophic membranes. In: Bradshaw SD, Burggren W, Heller HC, Ishii S, Langer H, Neuweiler G, et al, editors. *Zoophysiology*. Berlin: Springer-Verlag; 1992. p. 1-238.
16. Morlais I, Severson DW. Identification of a polymorphic mucin-like gene expressed in the midgut of the mosquito *Aedes aegypti*, using an integrated bulked segregant and differential display analysis. *Genetics.* 2001;158:1125-36.
17. Shao L, Devenport M, Fujioka H, Ghosh A, Jacobs-Lorena M. Identification and characterization of a novel peritrophic matrix protein, Ae-Aper 50, and the microvillar membrane protein, AEG12, from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005;35:947-59.
18. Kato N, Mueller CR, Fuchs JF, Wessely V, Lan Q, Christensen BM. Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2006;36:1-9.
19. Zimmermann D, Peters W. Fine structure and permeability of peritrophic membranes of *Calliphora erythrocephala* (Meigen) (Insecta: Diptera) after inhibition of chitin and protein synthesis. *Comp Biochem Physiol.* 1987;86:353-60.
20. Terra WR. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2001;47:47-61.
21. Freyvogel TA, Staubli W. The formation of peritrophic membrane in Culicidae. *Acta Trop.* 1965;22:118-47.
22. Santos JN, Lanfredi RM, Pimenta PFP. The invasion of the midgut of the mosquito *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823 by the helminth *Litomosoides chagasfilhoi* Moraes Neto, Lanfredi and De Souza, 1997. *J Invertebr Pathol.* 2006;93:1-10.
23. Vinetz JM, Valenzuela JG, Specht CA, Aravind L, Langer RC, Ribeiro JM, et al. Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut. *J Biol Chem.* 2000;275:10331-41.
24. Giansanti A, Bocchieri M, Rosato V, Musumeci S. A fine functional homology between chitinases from host and parasite is relevant for malaria transmissibility. *Parasitol Res.* 2007;101:639-45.