

**JAYME AUGUSTO DE SOUZA-NETO**

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES DA DIGESTÃO  
DE AÇÚCARES NO MOSQUITO *Anopheles aquasalis***

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Doutor.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins**

**Ribolla**

**BOTUCATU – SP**

**- 2006 -**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Souza-Neto, Jayme Augusto de.

Aspectos bioquímicos e moleculares da digestão de açúcares no mosquito *Anopheles aquasalis* / Jayme Augusto de Souza-Neto. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2006.

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Assunto CAPES: 21300003

1. Entomologia médica 2. Parasitologia 3. Bioquímica

CDD 616.968

Palavras-chave: *Anopheles*; Digestão; Enzimologia; Expressão gênica; Malária; RNAi ; Sacarose

À minha esposa Adriana, aos meus  
pais, Jaime e Marta e aos meus  
irmãos, Elizeu, Talita e Ana  
Carolina.

## **Agradecimentos**

A Deus, por ter me guiado e conduzido até aqui. Por ter permitido que eu alcançasse meus objetivos, e ter sempre me rodeado de pessoas boas e bem intencionadas. Pela família e pela esposa maravilhosa que possuo, meus maiores bens, em toda esta vida.

À Adriana, minha esposa e também minha companheira de todas as horas, por todos os momentos compartilhados até aqui e também por aqueles que ainda virão. Por tudo o que você representa para mim e pela maravilha que é viver a vida ao seu lado. Por transformar simples ocasiões nos momentos mais belos da minha vida.

Aos meus queridos pais, Jaime e Marta. Por terem me preparado para enfrentar a vida e suas dificuldades. Por todo o incentivo e ajuda incondicionais que me dispensaram e que tenho certeza de que continuarão a dispensar, se preciso. Certamente vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, e sempre lhes serei grato por isso.

Aos meus irmãos, Elizeu, Talita e Ana Carolina, por terem partilhado desta caminhada.

Ao meu orientador e amigo, Paulo Ribolla, pela orientação, amizade e suporte científico. Por ter me aberto as portas de seu laboratório, e por ter me proporcionado as condições ideais para que este trabalho se concretizasse.

Aos integrantes do Laboratório de Entomologia Molecular, Aline, Karina, Diego, Letícia Amaral, Bianca, Letícia Gushi, Alberto, Élen, Paulo (soneca) e Fábio, pela amizade, discussões e sugestões.

Às professoras Semiramis Guimarães e Teresa Cristina pelo convívio cotidiano, pela amizade sincera e palavras de incentivos e lições de vida.

Às professoras Luciene Mascarini e Lúcia O'Dwyer pela constante amizade e incentivo.

Ao professor Newton Madeira, pelas críticas, palavras de incentivo e por sua amizade.

Aos professores Alessandro Talamini, Wesley Godoy e Reinaldo da Silva pela amizade e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, Roberto, Ângela, Márcia, Valdir e Nilza, pela amizade, apoio e prestatividade.

Aos amigos e irmãos, Gustavo, Nelson e Karina Santos. Sou privilegiado por ter tido a oportunidade de conviver com pessoas tão especiais como vocês, que compartilharam diversos momentos de minha vida. Muitos vêm, muitos vão, mas o mais importante é que a amizade sincera dura para sempre, não importando a distância nem o tempo.

Aos demais amigos do Departamento de Parasitologia, Adriano, Marco (Xabi), Viviane, Marcela, Denise, Thaís, Satie, Betina, Aruac, Giane, Bruna e Juliana, pela amizade sincera, pelo incentivo.

Ao Dr. Marcelo Jacobs-Lorena, da Johns Hopkins University, por ter me recebido em seu laboratório, como parte da sua equipe, pelas sugestões, críticas e discussões científicas que certamente contribuíram para a minha formação.

Ao Dr. Mauro Marrelli, pela amizade e por todo apoio no período em que estive em Baltimore.

Aos Drs. Eappen Abraham e Anil Gosh, pela contribuição científica no desenvolvimento dos experimentos de RNAi, na Johns Hopkins University.

Ao técnico do laboratório do Dr. Marcelo em Baltimore, Anirudh Mali, pela amizade sincera e por todo o apoio e prestatividade durante minha estada em Baltimore. A todos os demais membros do laboratório pelas discussões e críticas científicas.

Aos amigos Benvinda e Wilson por terem me hospedado em seu apartamento durante minha estada em Baltimore. Pela amizade, apoio e palavras de incentivo.

À coordenação do Seminário Laveran & Deane por ter me aceito como participante da edição de 2003. A todos os professores participantes do evento pelas críticas e sugestões, que certamente contribuíram para o refinamento deste trabalho e para minha formação científica.

À professora Margareth Capurro por ter me recebido em seu laboratório sempre com muita disposição, pelo apoio e incentivo.

Aos Drs. Osvaldo Marinotti e Francisco Lemos por terem aceitado participar do processo do meu exame geral de qualificação.

Aos Drs. José Bento e Denise Vale pelo fornecimento de mosquitos e pelo apoio no estabelecimento da colônia de *Anopheles aquasalis* em nosso laboratório.

Aos Drs. João Pessoa e João Candeias, por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios para a realização dos experimentos de PCR em tempo real.

À Dra. Sandra Drigo, pela amizade, críticas, sugestões e por todo auxílio nas análises dos dados de PCR em tempo real

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho.

À FAPESP e à CAPES pelas bolsas e pelo apoio financeiro concedido.

“Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar para atravessar o rio da vida. Ninguém, exceto tu, só tu. Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semideuses que se oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa; tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Aonde leva? Não perguntes, siga-o!”

**Friedrich Wilhelm Nietzsche**

## Resumo

Os mosquitos alimentam-se de açúcares, na maioria das vezes obtidos do néctar de algumas plantas. A presença de carboidratos na dieta provê uma fonte importante de energia para o vôo, contribuindo para a longevidade e a fecundidade. A digestão de sacarose, um açúcar muito comumente encontrado nos néctares florais, é realizada por  $\alpha$ -glicosidases, enzimas que clivam as extremidades não reduzidas de substratos  $\alpha$ -ligados para liberar glicose. A importância de açúcares para a manutenção da vida de alguns mosquitos, assim como o órgão em que este processo ocorre, são assuntos de controvérsia. No presente estudo foi demonstrado que uma dieta contendo sacarose aumenta de forma notável a sobrevivência de mosquitos *Anopheles aquasalis*. Além disso,  $\alpha$ -glicosidases foram identificadas no intestino médio das fêmeas adultas, indicando que a digestão de sacarose deve estar ocorrendo neste órgão, com enzimas produzidas por ele mesmo, uma vez que estas enzimas foram detectadas ligadas a membranas do intestino médio. Três diferentes  $\alpha$ -glicosidases foram identificadas, todas com pH ótimo em torno de 5,5, e com massa molecular em torno de 70 kDa, ocorrendo, em alguns casos, a formação de agregados de tamanho  $\geq 600$  kDa. A caracterização molecular revelou a expressão de três genes que codificam  $\alpha$ -glicosidases no intestino médio das fêmeas, dois deles sendo ativados após a ingestão de sacarose, um no intestino médio-anterior e o outro no intestino médio-posterior. Ademais, a injeção de RNA dupla-fita referente a um dos genes identificados acarretou no aumento da mortalidade das fêmeas injetadas, sugerindo que as  $\alpha$ -glicosidases exercem um papel fundamental na vida dos mosquitos, assim como uma dieta contendo sacarose.

## Abstract

Mosquitoes are believed to feed on sugar obtained mostly from the nectar of flowers. The presence of carbohydrates in the diet provides an important source of energy for flight, also contributing to increase the longevity and fecundity. The digestion of sucrose, a common sugar found in floral nectarines, is carried out by  $\alpha$ -glucosidases, enzymes which hydrolyze the non-reduced end of  $\alpha$ -linked substrates to release glucose. The importance of sugars in mosquitoes life maintenance as well the organ sugar digestion takes place is controversial. In the current work, it was shown that a sucrose-containing meal notably increases *Anopheles aquasalis* mosquitoes lifespan. Furthermore,  $\alpha$ -glucosidases were identified in adult female midguts, indicating that sucrose digestion is being carried out in this organ, by enzymes produced there, since membrane-bound  $\alpha$ -glucosidases were detected in the midgut. Three different  $\alpha$ -glucosidases were identified, all of them with pH optima around 5.5 and molecular masses of approximately 70 kDa. In some cases, the formation of  $\geq 600$  kDa self-aggregates was visualized. A molecular characterization revealed the expression of three  $\alpha$ -glucosidase coding genes in the midgut of females. Two of them were activated after a sucrose meal, one in the anterior midgut, and the other in the posterior midgut. Moreover, the injection of double-stranded RNA related to one of the identified genes provoked an increase on the mortality of the injected females, suggesting that the  $\alpha$ -glucosidases play an important role on mosquitoes life maintenance, as well a sucrose-containing diet.

## Sumário

Resumo	
Abstract	
1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	29
3. Material e Métodos.....	31
3.1. Colônia de <i>Anopheles aquasalis</i> .....	32
3.2. Alimentação em diferentes dietas e análise da longevidade e fecundidade.....	33
3.3. Obtenção dos intestinos médios.....	33
3.4. Preparo dos intestinos para os ensaios enzimáticos.....	34
3.5. Ensaios enzimáticos.....	34
3.6. Cromatografia de troca iônica.....	35
3.7. Cromatografia de filtração em gel.....	36
3.8. Cinética enzimática.....	36
3.9. Desnaturação térmica.....	36
3.10. Precipitação de proteínas com ácido tri-cloroacético (TCA) .....	37
3.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	37
3.12. Ensaios para atividade $\alpha$ -glicolítica após eletroforese semi- desnaturante em gel de poliacrilamida.....	38
3.13. Extração do RNA intestinal.....	39
3.14. Tratamento com DNase e Transcrição reversa.....	39
3.15. Alinhamento de seqüências polipeptídicas de $\alpha$ -glicosidases de mosquitos e delineamento de oligonucleotídeos (ONTs) degenerados.....	40
3.16. Reação da polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação de fragmentos gênicos de $\alpha$ -glicosidase.....	41
3.17. Eletroforese em gel de agarose.....	41
3.18. Ligação dos fragmentos amplificados em plasmídeos.....	42
3.19. Preparo de bactérias competentes.....	42
3.20. Transformação das bactérias com plasmídeos.....	43

3.21. Seleção das colônias de bactérias contendo plasmídeos com inserto.....	44
3.22. Subclonagem das colônias contendo insertos e extração dos plasmídeos.....	45
3.23. Sequenciamento dos plasmídeos subclonados.....	45
3.24. Alinhamento das seqüências e análise filogenética.....	45
3.25. Confeção de oligonucleotídeos específicos para análise da expressão gênica.....	46
3.26. Reação da polimerase em cadeia em tempo real ( <i>Real-time</i> PCR)	46
3.27. PCR para obtenção de fragmentos sense e antisense para síntese de RNA dupla-fita (dsRNA).....	48
3.28. Seleção e subclonagem das colônias de bactérias contendo plasmídeos em diferentes orientações.....	49
3.29. Extração de plasmídeos das bactérias selecionadas.....	52
3.30. Linearização dos plasmídeos e precipitação do DNA linearizado	52
3.31. Síntese de dsRNA para $\alpha$ -glicosidase (ds $\alpha$ -glu).....	54
3.32. Micro-injeção e contagem de mosquitos mortos.....	55
4. Resultados.....	56
4.1. Efeito da sacarose sobre a longevidade e fecundidade das fêmeas.....	57
4.2. Detecção de atividades carboidríticas em intestinos médios de mosquitos fêmeas alimentados com sacarose.....	60
4.3. Cinética temporal da atividade $\alpha$ -glicolítica em intestinos médios de fêmeas em jejum e após a alimentação com sacarose.....	60
4.4. Determinação do pH ótimo das $\alpha$ -glicosidases intestinais.....	64
4.5. Fracionamento das $\alpha$ -glicosidases intestinais de fêmeas	64
4.6. Análise das amostras através de eletroforese em géis de poliacrilamida.....	69
4.7. Estimativa da massa molecular das $\alpha$ -glicosidases após ensaio enzimático em gel de poli-acrilamida.....	69
4.8. Desnaturação térmica e cinética enzimática das $\alpha$ -glicosidases das amostras semipurificadas.....	72

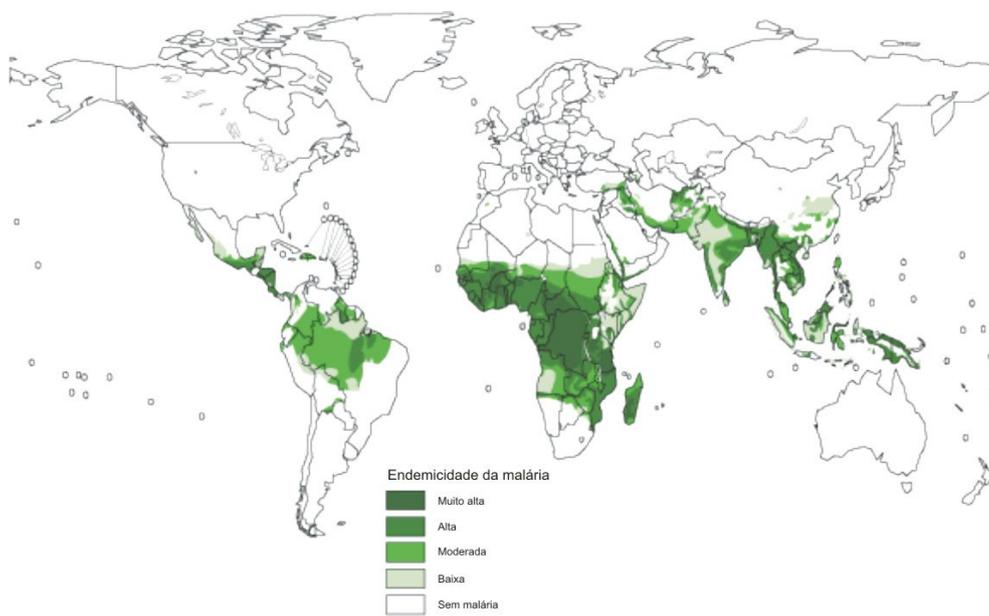
4.9. Amplificação, clonagem e seleção de fragmentos contendo seqüências codificantes para $\alpha$ -glicosidases.....	76
4.10. Expressão gênica das $\alpha$ -glicosidases intestinais nas formas imaturas e em machos.....	83
4.11. Cinética da expressão gênica das $\alpha$ -glicosidases intestinais em fêmeas em jejum e após a alimentação com sacarose.....	85
4.12. RNAi: Injeção do dsRNA e observação dos efeitos na longevidade dos mosquitos.....	86
5. Discussão.....	90
6. Conclusões.....	107
7. Referências.....	110

# 1. Introdução

---

Os mosquitos são insetos pertencentes ao Filo Arthropoda, Família Culicidae, da Ordem Diptera, sub-Ordem Nematocera. Certamente são os mosquitos Culicidae os que mais têm atraído a atenção da saúde pública. Até o final do século XX, acreditava-se que a única inconveniência causada por estes artrópodes era o incômodo ocasionado pela sua picada, sendo tratados, por muito tempo, como seres desagradáveis, a serem simplesmente tolerados ou evitados. O papel epidemiológico dos culicídeos como vetores biológicos veio a ser comprovado somente após as observações de Manson, em 1879, com respeito à filariose bancroftiana. Dava-se, com isso, o nascimento da entomologia médica como ciência propriamente dita (Forattini, 2002). Após décadas de estudo, sabe-se que os mosquitos são importantes veiculadores de parasitas para humanos, sendo os vetores de arboviroses, de filarioses e da malária. Com isso, o interesse acerca destes dípteros tem aumentado consideravelmente (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1997; Forattini, 2002).

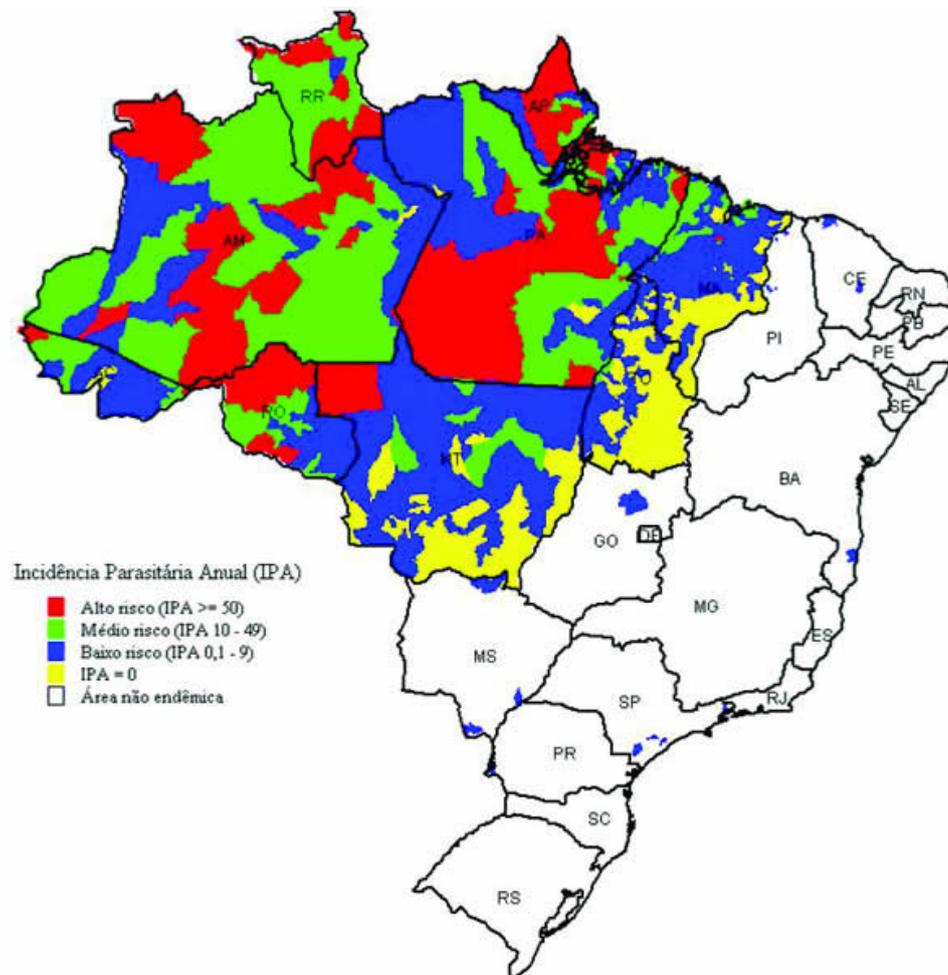
Dentre as doenças infecciosas transmitidas por insetos, a malária é responsável por mais de 1 milhão de mortes por ano, sendo considerada a doença tropical mais importante do mundo (WHO, 2005). As estatísticas revelam que esta moléstia é um problema em mais de 90 países, habitados por 2,4 bilhões de pessoas, ou seja, 40% da população mundial (Fig. 1). Estima-se que a cada ano ocorram cerca de 300-500 milhões de casos clínicos, sendo mais de 90% destes na África sub-saariana (WHO, 1998).



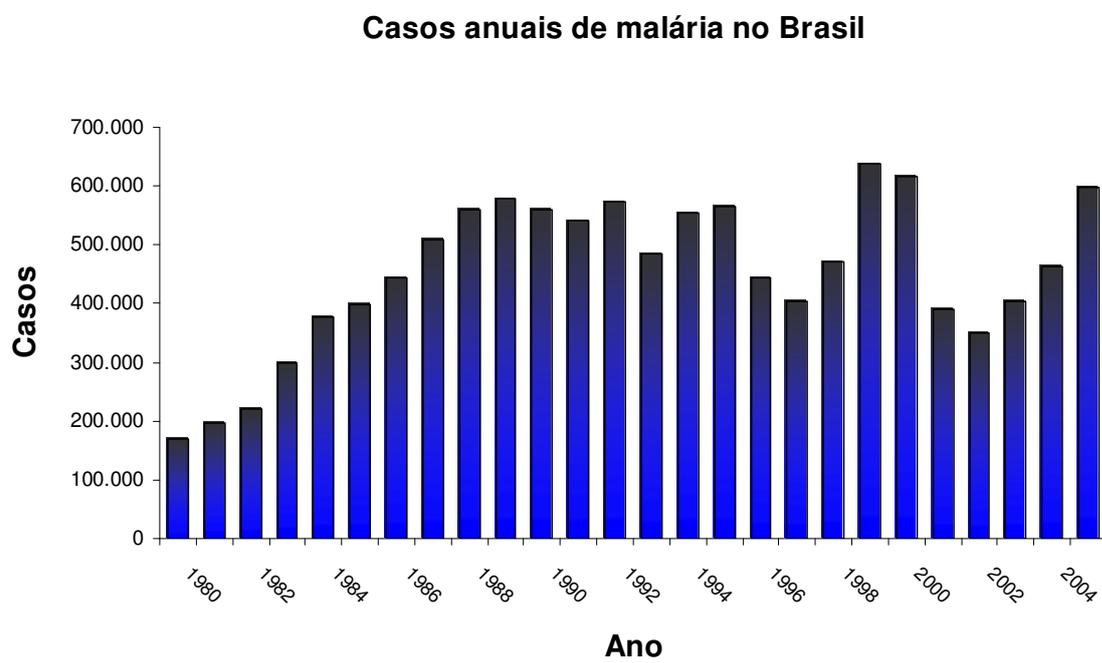
**Figura 1. Distribuição global da malária.** Fonte: WHO, 2003.

No Brasil, a malária acometia cerca de seis milhões de habitantes por ano na década de 40, em todas as regiões. Em decorrências das mudanças sociais ocorridas após este período, e por meio da Campanha de Erradicação da Malária, este número já esteve pouco abaixo dos 100 mil casos anuais, restringindo-se espacialmente às áreas adjacentes às florestas, na Amazônia Legal. Contudo, a partir da década de 70, os projetos de desenvolvimento da Amazônia promoveram uma grande migração interna no País, provocando a dispersão da malária pelas regiões Norte e Centro-Oeste, com um aumento significativo do número de casos, alcançando níveis de 450 a 500 mil casos por ano. Atualmente, a malária concentra-se principalmente na região da Amazônia Legal, onde são registrados mais de 99% dos casos no País (SVS/MS, 2005) (Fig. 2).

Com a elaboração do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), que vigorou no período de 2000 a 2002, houve redução de 50,2% na incidência da malária e 54,7% no número de óbitos ocasionados por esta doença na Região da Amazônia Legal, com uma queda de 637 mil casos, em 1999, para 349 mil casos, em 2002. Entretanto, nos últimos anos, o número de casos de malária voltaram a aumentar consideravelmente, atingindo a casa de 596.444 em 2005 (SVS/MS, 2005) (Fig. 3).



**Figura 2. Classificação das áreas de risco para malária segundo a Incidência Parasitária Anual (IPA), Brasil, 2001.** Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2003.



**Figura 3. Índices anuais de casos reportados de malária no Brasil.** Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2005.

A máalaria humana é causada por quatro espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malarie*. Destes, *P. falciparum* é o responsável pela maioria das infecções, sendo também o mais letal (WHO, 1998). Os transmissores desta enfermidade são mosquitos do gênero *Anopheles*. No Brasil, além do *A. darlingi*, principal espécie vetora, outros mosquitos como *A. aquasalis*, *A. albimanus*, *A. bellator*, *A. cruzi*, *A. neivai* e *A. pseudopunctipenis* são considerados importantes veiculadores de plasmódios, de acordo com a região em que são encontrados (Forattini, 2002).

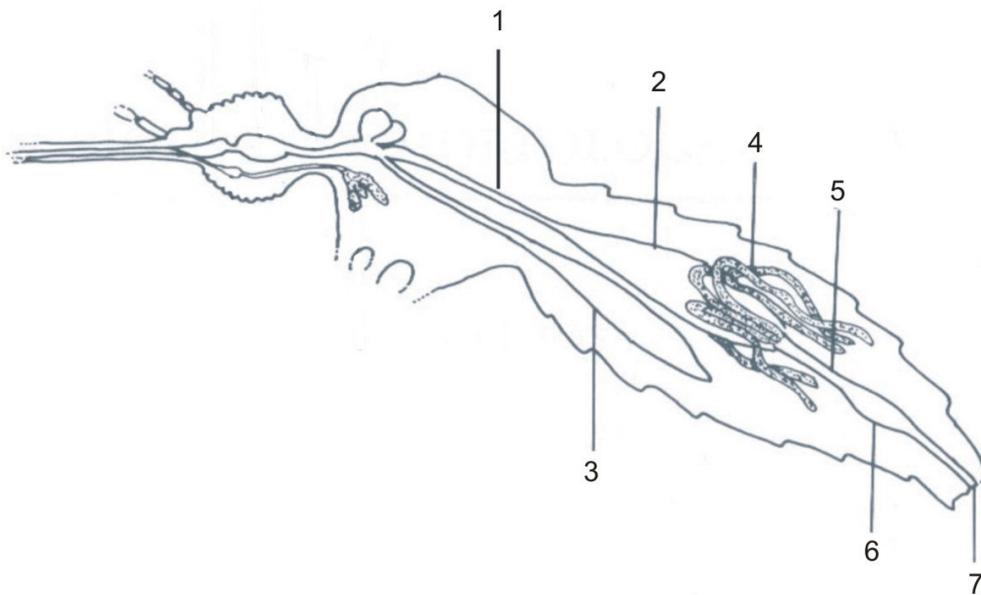
De um modo geral, os culicídeos possuem um ciclo de vida holometábolo, caracterizado pelos estádios de ovo, larva, pupa e adulto, sendo este último terrestre (Matheson, 1932). As larvas são sempre aquáticas e possuem aspecto vermiforme. Já os adultos possuem um corpo nitidamente dividido em cabeça tórax e abdome. No tórax encontram-se os apêndices especializados na locomoção (patas e asas) e no abdome está a maior parte dos órgãos internos, além dos aparelhos reprodutores, excretores e digestivos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1997).

O intestino dos insetos é um canal que se estende desde a boca até o ânus (Romoser, 1996). A parede desta estrutura é constituída por uma única camada de células, separadas da hemolinfa por uma membrana basal. Este órgão está fixado, em suas extremidades, à parede do corpo do inseto, sendo sustentado pela pressão que exercem os órgão adjacentes e as traquéias flexíveis (Daly et al., 1998). O tubo digestivo é morfológicamente dividido em três regiões distintas, denominadas: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. As regiões anterior e posterior são de origem ectodérmica e, por isso, são revestidas por uma fina cutícula, composta de quitina, chamada

íntima, apresentando continuidade com a cutícula do integumento. O intestino médio, por outro lado, não dispõe deste revestimento devido à sua origem endodérmica. Por isso, a maioria dos insetos sintetiza uma estrutura quitinosa extracelular denominada matriz (membrana) peritrófica, para, em adição a outras funções, proteger as células desta região intestinal contra agentes abrasivos químicos ou mecânicos (Billingsley e Lehane, 1996).

As regiões do intestino são especializadas em funções particulares. O intestino anterior está envolvido primariamente com a ingestão, condução e armazenagem do alimento, ao passo que se atribui ao intestino médio o papel de digerir e absorver o alimento. Já a região posterior do intestino é responsável pela excreção de produtos oriundos do intestino médio e dos túbulos de Malpighi (Romoser, 1996).

O intestino médio pode ser formado por um simples tubo ou ser variavelmente modificado (Daly et al., 1998). Esta região é composta por células colunares de borda estriada, especializadas na secreção de enzimas digestivas e na absorção de água e nutrientes provenientes da digestão. Especificamente em mosquitos na idade adulta, o intestino médio é longitudinalmente dividido em uma região anterior (intestino médio-anterior) em forma de tubo e em uma região posterior (intestino médio posterior), extremamente elástica, em forma de bolso (Billingsley e Lehane, 1996) (Fig. 4).



**Figura 4. Aparelho digestivo dos mosquitos adultos.** 1) intestino médio-anterior; 2) intestino médio-posterior; 3) divertículo ventral 4) tubos de Malpighi; 5) íleo/cólon; 6) reto; 7) ânus. Fonte: Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1997), modificado.

Os mosquitos fêmeas, na fase adulta, alimentam-se de sangue, na maioria das vezes obtido de humanos (ou outros mamíferos) ou pássaros (Clements, 1992). O sangue dos vertebrados é composto principalmente por proteínas, e por isso, proteases como tripsinas, aminopeptidases e carboxipeptidases são as principais enzimas digestivas do mosquito (Briegel e Lea, 1975; Graf e Briegel, 1989; Noriega e Wells, 1999).

A dieta sanguínea é essencial para a produção dos ovos. No entanto, uma refeição de açúcar é mais eficiente para a síntese das reservas energéticas (Van Handel, 1965; Clements, 1992). Com referência aos mosquitos adultos, machos e fêmeas alimentam-se constantemente de soluções açucaradas, o que constitui parte essencial da dieta destes insetos (Grimstad e DeFoliart, 1974; Van Handel, 1984; Foster, 1995). A ingestão de açúcares serve não apenas como combustível inicial para a produção de ovos (Magnarelli, 1978), mas também supre a energia necessária para o vôo (Van Handel, 1984), permitindo, desta forma, a busca por uma alimentação sanguínea e por reservatórios para a oviposição (Jamnback, 1961; Hunter, 1977). A dieta de carboidratos prolonga de forma notável a longevidade dos mosquitos (Nayar e Sauerman, 1971). Além disso, estes insetos podem armazenar o excesso de carboidratos na forma de glicogênio, e, uma vez atingido o limiar de seu armazenamento, os açúcares ingeridos são utilizados para a síntese de lipídeos (Van Handel, 1984).

A sacarose é um constituinte muito comum na maioria das fontes de açúcares em que os mosquitos se alimentam (Van Handel et al., 1972; Marinotti e James, 1990), e a digestão deste carboidrato é realizada por atividades  $\alpha$ -glicolíticas (Marinotti e James, 1990). As  $\alpha$ -glicosidases (EC

3.2.1.20,  $\alpha$ -glicosideo glicohidrolase) compõem um grupo de exo-glicosideo hidrolases, que catalisam a hidrólise de resíduos  $\alpha$ -glicosil das extremidades não reduzidas de substratos  $\alpha$ -ligados para liberar glicose (Chiba, 1997).

Sacarases, termo geralmente utilizado como sinônimo de  $\alpha$ -glicosidases, foram primeiramente identificadas em mosquitos por Schaefer e Miura (1972), cujos experimentos demonstraram que as glândulas salivares de *Culex tarsalis* contêm uma enzima capaz de clivar sacarose.

Em seguida, Marinotti et al. (1990) detectaram uma  $\alpha$ -glicosidase secretada pelas glândulas salivares de *A. aegypti*, caracterizada mais tarde por Marinotti e James (1990), como sendo uma proteína monomérica secretada pelos lóbulos laterais das glândulas salivares em resposta à ingestão de açúcares ou sangue. Segundo eles, esta poderia ser uma  $\alpha$ -glicosidase expressa pelo gene *maltase-like I (mal I)*, clonado e seqüenciado por James et al. (1989). Estes autores também sugeriram que esta enzima poderia ser ingerida junto com a alimentação e ajudaria na digestão dos carboidratos no divertículo. Atividades  $\alpha$ -glicolíticas também foram detectadas em glândulas salivares dos mosquitos *Aedes albopictus* (Marinotti et al., 1996) e *Anopheles darlingi* (Moreira-Ferro et al., 1999) e em intestinos de *Anopheles stephensi*, antes e após uma refeição sanguínea (Billingsley e Hecker, 1991).

Mais recentemente, o receptor da toxina binária de *Bacillus sphaericus* na membrana intestinal de larvas de *Culex pipiens* foi identificado como uma  $\alpha$ -glicosidase de 60 kDa (Darboux et al., 2001). Além disso, três genes codificando proteínas do tipo maltase (*maltase-like proteins*) foram seqüenciadas em *Anopheles gambiae* (Holt et al., 2002). Dois deles correspondendo aos genes intestinais *Agm1* e *Agm2*, seqüenciados e

caracterizados por Zheng et al. (1995), e o terceiro, um fragmento (ENSANGG00000012889) que por algum motivo não foi identificado e caracterizado por estes autores.

Atividades  $\alpha$ -glicolíticas foram detectadas nos intestinos médios dos flebotomíneos *Phlebotomus langeroni* (Dillon e El Kordy, 1997), *Lutzomyia longipalpis* (Gontijo et al., 1998) e *Phlebotomus papatasi* (Jacobson e Schlein, 2001), sendo correlacionadas com a digestão de sacarose nestes insetos. Entretanto, em mosquitos, a importância dos açúcares na dieta, e, até mesmo a origem das  $\alpha$ -glicosidases e o local em que ocorre a digestão dos carboidratos ingeridos ainda permanece em discussão. Em todos estes relatos anteriores (James et al., 1989; Marinotti e James, 1990; Marinotti et al., 1996; Moreira-Ferro et al., 1999) a produção das  $\alpha$ -glicosidases estava sempre associada às glândulas salivares, e a digestão de sacarose ao divertículo daqueles mosquitos. Além disso, as  $\alpha$ -glicosidases intestinais previamente identificadas nos intestinos dos mosquitos *A. stephensi* (Billingsley e Hecker, 1991) foram induzidas pelo repasto sanguíneo, ao passo que aquelas de *C. pipiens* (Darboux et al., 2001) foram detectadas em larvas. Contudo, não há relatos prévios que atribuam um papel para as  $\alpha$ -glicosidases intestinais na digestão de sacarose em mosquitos.

Desde que sangue e sacarose são armazenados em compartimentos diferentes do trato digestivo (intestino médio posterior e divertículo, respectivamente) (Kendi et al., 2005), é comumente aceito que a digestão de açúcares em mosquitos ocorra no divertículo, com enzimas produzidas pelas glândulas salivares, que seriam transportadas até este órgão em conjunto à refeição açucarada. No entanto, dados de Caroci (2001), em estudos com o

mosquito *Anopheles darlingi*, sugerem que o papel de tais enzimas seja insignificante ao menos no que diz respeito à digestão de sacarose no divertículo, uma vez que níveis irrelevantes de  $\alpha$ -glicosidases foram detectados no interior deste órgão. Tais dados indicam que a função do divertículo seria apenas de armazenamento e fornecimento gradual de açúcares para o intestino. Em contraste, três horas após a ingestão de solução de sacarose, a atividade  $\alpha$ -glicolítica aumenta nas regiões anterior e posterior do intestino médio, sugerindo que a digestão de sacarose esteja ocorrendo no interior deste órgão (Caroci, 2001). Sendo assim, é necessário que se re-avaliem o papel das glândulas salivares, do divertículo e do intestino médio na digestão de açúcares ingeridos na dieta, para que se possa chegar a conclusões mais concretas.

A importância do açúcar na dieta dos mosquitos também é um assunto que gera muita controvérsia. Há vertentes que apóiam a teoria de que múltiplas alimentações sanguíneas possam substituir o papel de uma dieta contendo açúcares (Gary Jr e Foster, 2001). Em contrapartida, há aqueles que defendem a tese de que uma refeição rica em hidratos de carbono é essencial para manutenção das principais funções fisiológicas dos mosquitos (Grimstad e DeFoliart, 1974; Van Handel, 1984). Uma vez assumida a importância de tais substâncias para os mosquitos, é de se esperar que as enzimas que degradam os açúcares também exerçam papéis fundamentais no desenvolvimento e manutenção da vida destes insetos. Tal fato os tornaria alvos potenciais a drogas, de modo que a inibição da síntese ou da atividade das  $\alpha$ -glicosidases pudesse ser utilizada para o controle de vetores.

Os insetos, com seus amplos números e habilidades de dispersão apresentam um conjunto ideal em que a seleção natural pode gerar novas

cepas resistentes aos inseticidas químicos. Aos humanos, por outro lado, cabe o desenvolvimento de técnicas alternativas para o controle destes insetos (Atkinson, 2005).

Recentemente, o surgimento de ferramentas como a técnica do RNA interferente (RNAi) Fire et al. (1998) tem sido considerado grandes avanços na biologia molecular, e tais técnicas vêm sendo utilizadas amplamente no campo da entomologia médica, permitindo aos pesquisadores executar análises no âmbito da genômica funcional e genética reversa em diversos seres vivos, de eucariotos inferiores até mamíferos.

Este fenômeno consiste no silenciamento gênico seqüência-específico a partir da injeção de RNAs fitas-duplas (dsRNA) no organismo em estudo. Após a injeção, o dsRNA é absorvido pelas células e reconhecido por uma enzima chamada DICER, que corta a fita em pequenos fragmentos de 21-23 pb, chamados siRNA (*short interferent RNA*). Em seguida, os fragmentos se hibridam a seus específicos transcritos (mRNA), e um complexo de proteínas chamado RISC (*RNA induced silencing complex*) promove a degradação da fita de mRNA, silenciando o gene (Dykxhoorn, et al., 2003; Novina e Sharp, 2004).

Está bem estabelecido que o silenciamento do RNA funciona como uma resposta imune adaptativa contra vírus e retro-vírus (Sanchez-Vargas et al., 2004; Baulcombe, 2004; Voinnet, 2005), sendo considerada uma defesa natural antivírus em insetos (Li, et al., 2002). Desta forma, trabalhos conduzidos por Keene et al. (2004) mostraram que o silenciamento gênico por RNA interfere na infecção do vírus Ónyong-nyong (Alphavirus; Togaviridae) em *Anopheles gambiae*. Resultados similares foram encontrados por Travanty et al. (2004), em que foi utilizada a técnica do RNA interferente para

desenvolver resistência ao vírus da dengue em *Aedes aegypti* geneticamente modificados.

Recentes experimentos têm mostrado que o silenciamento de alguns genes dos mosquitos pode afetar o desenvolvimento dos plasmódios (Osta et al., 2004), o que gera nova perspectivas para o controle da malária (Hemingway e Craig, 2004). Assim, possivelmente o silenciamento de determinados genes em mosquitos pode afetar o desenvolvimento destes insetos, especificamente.

Desta forma, através da técnica de RNAi, é possível silenciar uma ampla diversidade de genes e observar os efeitos do *knockdown* de determinado gene sobre o desenvolvimento dos mosquitos, o que diretamente permite avaliar a função e/ou a importância de diversas enzimas e/ou proteínas para o organismo em questão. Além disso, a técnica de RNAi representa uma ferramenta poderosa para a identificação de novos alvos a drogas, uma vez que sua especificidade tornaria o desenvolvimento de drogas, melhor, mais eficiente e mais rápido (Bartz e Jackson, 2005).

No presente estudo, é mostrada a importância de uma dieta contendo sacarose para os mosquitos *A. aquasalis*. Além disso, as enzimas responsáveis pela degradação deste dissacarídeo foram identificadas e caracterizadas, tanto no aspecto bioquímico quanto no aspecto molecular. Ademais, a importância das  $\alpha$ -glicosidases para a manutenção da vida dos mosquitos foi testada através de silenciamento gênico com a técnica de RNAi.

Os resultados obtidos neste trabalho gerarão informações sobre a fisiologia básica dos mosquitos vetores, em uma área que é pobre em publicações. Tais dados certamente serão usados posteriormente em

pesquisas mais aplicadas em biologia e controle de vetores. Além disso, é elucidado um aspecto controverso da biologia básica de mosquitos.

### 3. Material e Métodos

---

### 3.1. Colônia de *Anopheles aquasalis*

Larvas de *A. aquasalis* foram obtidas a partir de uma colônia mantida no Laboratório de Transmissores de Hematozoários, sediado no Dept. de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército/FIOCRUZ (Benfica-RJ), previamente estabelecida pelo Dr. José B. P. Lima e pela Dra. Denise Valle. As larvas foram mantidas em bandejas contendo água mineral e sal marinho a 0,2% (p/v), em insetário climatizado a  $28 \pm 5^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12h, sendo alimentadas com ração para peixes Tetramin Pro<sup>®</sup> pulverizada em peneira para granulometria de 150  $\mu\text{m}$  para L1 e 300 $\mu\text{m}$  para as formas maiores. As pupas foram transferidas para copos plásticos (30 ml) contendo água mineral e 0,2% de sal marinho (p/v) e colocadas no interior de gaiolas até a emergência dos adultos. As gaiolas permaneceram no interior de uma câmara de crescimento tipo BOD a  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa em  $85 \pm 5\%$ . Para a produção de ovos, uma dieta sanguínea foi oferecida às fêmeas através de camundongos anestesiados. Após a oviposição, os ovos foram transferidos para recipientes com água mineral e sal marinho 0,2% (p/v) até a eclosão das larvas, seguindo-se então a metodologia como citada anteriormente.

### **3.2. Alimentação em diferentes dietas e análise da longevidade e fecundidade**

Pupas de *A. aquasalis* foram separadas em três lotes contendo 100 mosquitos cada. Após a emergência de todos os mosquitos, cada gaiola recebeu uma alimentação específica: sacarose 10% + sangue, sangue + água ou sacarose 10% apenas. Uma refeição sanguínea foi oferecida, pela primeira vez, três dias após a emergência, e a cada quatro dias nas alimentações subsequentes. Os mosquitos mortos foram contados diariamente. A quantidade de ovos e a taxa de eclosão também foram monitoradas e comparadas.

### **3.3. Obtenção dos intestinos médios**

Fêmeas adultas de *A. aquasalis* foram mantidas em jejum, e alimentadas com solução de sacarose 10% (p/v) dois dias após a emergência. A solução de sacarose foi despejada em um papel de filtro colocado sobre o fundo da gaiola, e a alimentação prosseguiu até que as fêmeas parassem de ingerir a solução açucarada (aproximadamente 10 min).

Para a obtenção dos intestinos médios, os mosquitos foram imobilizados a 4°C e dissecados com o auxílio de um microscópio estereoscópico Stemi DV 4 (Carl Zeiss) em PBS, em tempos específicos após a alimentação com açúcar e transferidos para microtubos (1,5 ml) contendo água destilada (1 intestino/40 µl). O material foi estocado a -20°C até o momento do uso.

### **3.4. Preparo dos intestinos para os ensaios enzimáticos**

Os intestinos médios, previamente dissecados, foram descongelados e homogeneizados. Para alguns experimentos, este material foi centrifugado a  $14.000 \times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi estocado e chamado "S1", ou extrato solúvel. Seguindo-se com a extração, 100  $\mu\text{l}$  de Triton 1% (Gontijo et al., 1998) foram adicionados ao sedimento e este material foi homogeneizado e centrifugado como anteriormente. O sobrenadante foi estocado e chamado "S2" ou extrato ligado a membrana. Eventualmente, intestinos médios de fêmeas não alimentadas foram utilizadas nos experimentos. Quando necessário, os intestinos médio-anterior (IMA) e médio-posterior (IMP) foram separados durante a dissecação. Um frasco contendo água estava disponível aos mosquitos logo após a emergência, e durante todos os experimentos após a alimentação com açúcares.

### **3.5. Ensaios enzimáticos**

Atividades de  $\alpha$ -glucosidases foram determinadas pela liberação de p-nitrofenolato do substrato sintético cromogênico p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo (NP $\alpha$ Glu). Os ensaios foram conduzidos a  $25^\circ\text{C}$  em tampão citrato-fosfato 150 mM, pH 6,5, contendo NP $\alpha$ Glu 10mM, seguindo-se um protocolo de Terra et al. (1979) com modificações. As incubações foram realizadas em microplacas de 96 poços em um leitor de microplacas, Biotrak Visible Plate Reader (Amershan Biosciences). O p-nitrofenolato liberado foi monitorado à cada 10 min a 405 nm. Ao menos 6 pontos foram determinados para cada incubação e a taxa inicial de hidrólise foi calculada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para

hidrolisar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NP}\alpha\text{Glu}$  por minuto nas condições do ensaio. Atividades contra  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -galactosidase e  $\beta$ -galactosidase foram determinadas como acima, utilizando-se os substratos  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-maltopentaoside ( $\text{NP}\alpha\text{Malto}$ ),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranoside ( $\text{NP}\alpha\text{Gal}$ ) e  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranoside ( $\text{NP}\beta\text{gal}$ ), respectivamente. O efeito de diferentes pHs sobre a atividade enzimática foi estudado utilizando-se tampão citrato-fosfato 150 mM com pHs variando de 3,0 a 8,5, com intervalos de 0,5 unidade. Após 50 minutos de incubação, as reações foram interrompidas com 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1M e as placas submetidas à leitura a 405 nm.

### **3.6. Cromatografia de Troca Iônica**

Os extratos S1 e S2 (descritos no item 3.4) foram submetidos à cromatografia de troca iônica em uma coluna Resource Q de 1ml (Amershan Biosciences) conectada a um sistema de FPLC (*ÄKTApurifier*, Amershan Biosciences) equilibrada com tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 8,0, e eluída com 20 ml deste mesmo tampão em um gradiente de 0 a 1 M de NaCl. Frações de 1 ml foram coletadas em um fluxo de 2 ml/min e a absorvância monitorada a 280 nm. Ao término da cromatografia, 20  $\mu\text{l}$  de cada fração foram ensaiados com o substrato  $\text{NP}\alpha\text{Glu}$  como descrito anteriormente. A principal fração de cada pico com atividade  $\alpha$ -glicolítica foi submetida a uma nova cromatografia.

### 3.7. Cromatografia de filtração em gel

Atividades  $\alpha$ -glicolíticas oriundas da cromatografia de troca iônica foram submetidas à cromatografia de filtração em gel em uma coluna Superdex 200 HR 10/30 de 25 ml (FPLC) equilibrada e eluída com tampão citrato-fosfato 150 mM pH 6,5, contendo NaCl 150 mM. Frações de 1 ml foram coletadas em um fluxo de 1 ml/min e a absorvância foi monitorada a 280 nm. A coluna foi calibrada com uma mistura de diferentes proteínas com tamanhos conhecidos (tiroglobulina, 669 kDa; ferritina, 440 kDa; catalase, 232 kDa; lactato desidrogenase, 140 kDa e albumina, 66 kDa), e a massa molecular relativa (Mr) das proteínas de cada fração foi estimada. O limite de exclusão da coluna em questão é de 600 kDa.

### 3.8. Cinética enzimática

O efeito da concentração do substrato sobre as  $\alpha$ -glicosidases parcialmente purificadas foi determinado através de ensaios enzimáticos com ao menos oito diferentes concentrações do substrato NP $\alpha$ Glu. Os valores de  $K_m$  foram determinados por uma regressão linear de representação gráfica de Lineweaver-Burk.

### 3.9. Desnaturação térmica

Os picos com atividade  $\alpha$ -glicolítica foram incubados a 45°C em um banho-maria e a atividade residual determinada em 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min de incubação.

### **3.10. Precipitação de proteínas com ácido tri-cloroacético (TCA)**

Após cada etapa de purificação, frações selecionadas foram submetidas a uma precipitação protéica. Para tal, uma alíquota de tais frações foi colocada em solução contendo TCA para uma concentração final de 10% (p/v), permanecendo em repouso sobre o gelo por 1h. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14000 x g a 4°C por 5 min. Após o descarte do sobrenadante, 1 ml de etanol foi adicionado ao sedimento, seguindo-se uma vigorosa agitação. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores, sendo o sobrenadante novamente descartado. O sedimento foi então lavado com 1 ml de acetona, seguindo-se com mais um passo de centrifugação, como acima. Após o descarte deste último sobrenadante, o sedimentado foi finalmente ressuspendido em tampão de amostra para eletroforese de proteínas.

### **3.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**

As eletroforeses foram realizadas sob condições desnaturantes como a seguir: as amostras foram combinadas com o tampão de amostra contendo tampão Tris-HCl 500 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (p/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (p/v). Estas amostras foram aquecidas a 95 °C em um banho-maria e em seguida aplicadas a um gel de poliacrilamida a 12% (p/v) contendo SDS a 0,1% (p/v) (Laemmli, 1970). As eletroforeses ocorreram em uma voltagem constante de 100V, sendo os géis corados com coomassie blue R [coomassie blue R 0,1% (p/v), etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)] e descorados com solução contendo 40% de

metanol (v/v) e 10% de ácido acético (v/v). Os géis foram visualizados em um transiluminador UV/visível (Amershan Biosciences) e fotografados.

### **3.12. Ensaio para atividade $\alpha$ -glicolítica após eletroforese semi-desnaturante em gel de poliacrilamida**

Amostras contendo concentrações de proteínas apropriadas foram diluídas duas vezes em tampão de amostra para eletroforese, na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol [2,1 ml de água destilada, 0,5 ml de Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 0,4 ml de glicerol, 0,8 ml de SDS 10% (p/v) e 0,2 ml de azul de bromofenol 1%] e submetidas à eletroforese a 100V, sem tratamento térmico. As eletroforeses foram realizadas a 4°C utilizando-se tampões pré-refrigerados. Após a corrida, os géis foram acondicionados em recipientes contendo solução de Triton X-100 0,5% (v/v) por 30 min, a 25°C. Seguindo-se a renaturação, os géis foram transferidos para recipientes contendo tampão citrato-fosfato 100 mM, pH 5,5 e o substrato sintético fluorogênico 4-metilumbeliferil  $\alpha$ -D-glicosídeo (MU $\alpha$ Glu), sendo incubados por 15 min a 30 °C. As zonas de atividade foram visualizadas como bandas fluorescentes em um transiluminador UV (Amershan Biosciences) e fotografados.

### **3.13. Extração do RNA intestinal**

O RNA foi extraído dos tecidos com TRIzol® Reagent (Invitrogen). Para tal, os tecidos foram homogeneizados (vortex) em 500µl de TRIzol sendo incubados por 5 min a 25°C. A seguir, 200 µl de clorofórmio foram adicionados às amostras, homogeneizando-se vigorosamente e incubando-se o material por 15 min a 25°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4°C, sendo a fase aquosa (superior) transferida para um novo tubo. A este material foram adicionados 500µl de isopropanol homogeneizando-se gentilmente e incubando-se por 10 min a 25°C. Uma nova centrifugação foi realizada, como acima, seguindo-se, desta vez, com o descarte do sobrenadante. O sedimento foi lavado com 1 ml de etanol 75% (v/v) e submetido a uma nova centrifugação a 7.500 x g por 8 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento seco a 25°C. Após este período o sedimento foi ressuspensionado com 20 µl de uma solução contendo 0,1% de DEPC (dietilpirocarbonato). Este material foi acondicionado a -70°C e, a seguir, utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA).

### **3.14. Tratamento com DNase e Transcrição reversa**

O RNA total foi tratado com DNase para garantir a pureza do material. Desta forma, as amostras, contendo até 1 µg do RNA total, foram incubadas com 1U de DNase a 37 °C por 30 min, seguindo-se incubação a 65 °C por 10 min após a adição de 1 µl de EDTA a 25 mM. As fitas de cDNA foram sintetizadas com o kit RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas Life Science), utilizando-se oligo dT (12-18) seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. A seguir, os produtos foram

congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Todas as reações foram realizadas em termociclador Whatman Biometra <sup>®</sup> (T Gradient).

### 3.15. Alinhamento de seqüências polipeptídicas de $\alpha$ -glicosidases de mosquitos e delineamento de oligonucleotídeos (ONTs) degenerados.

Seqüências polipeptídicas de  $\alpha$ -glicosidases dos mosquitos *A. aegypti*, e *A. gambiae* foram alinhadas e 3 diferentes primers foram delineados com base nas regiões conservadas destas seqüências. Dois ONTs foram delineados para amplificação do DNA no sentido *forward* (F) (P1 e P3) e um no sentido *reverse* (R) (P5). A seqüência nucleotídica dos ONTs esta mostrada na tabela 1.

**Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos degenerados para  $\alpha$ -glicosidases.**

ONT	Sentido	Seqüência (5'-3')
P1	F	TTY TAY CAR ATH TAY CCN MGN WSN T
P3	F	ATH YTN GAY TTY GTN CCN AAY CAY
P5	R	RTC RTG RTT NCC NAR NAC CCA RTT

R) G ou A; Y) T ou C; M) A ou C; S) G ou C; W) A ou T; H) A, C ou T; N) A, C, G ou T.

### **3.16. Reação da polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação de fragmentos gênicos de $\alpha$ -glicosidase**

A amplificação de seqüências codificantes para  $\alpha$ -glicosidases foi realizada através de PCR tendo como molde o cDNA previamente sintetizado. As reações, com volume final de 25  $\mu$ l continham: 1  $\mu$ l do cDNA molde, Tris-HCl 10mM pH 8.0, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, 0,1% de Triton X-100 (v/v), 50% de glicerol (v/v), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 0,1 mM (PCR nucleotide mix Invitrogen Life Technologies), 5U de Taq DNA polimerase (Biotools DNA polimerase), além de 10 pmoles dos primers degenerados, nas seguintes combinações: P1/P5 ou P3/P5. Todas as reações foram realizadas em um termociclador Whatman Biometra<sup>®</sup> (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e um ciclo de 72°C por 5 min. O material foi submetido à eletroforese em gel de agarose.

### **3.17. Eletroforese em gel de agarose**

As amostras contendo DNA ou RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, segundo Sambrook et al., (1989), contendo brometo de etídeo a 0,1  $\mu$ l/ml. Ao material foram adicionados 2  $\mu$ l de tampão de amostra, sendo, em seguida, aplicado no gel. As eletroforeses foram realizadas em cubas Hoefer HE 33 Mini Submarine Unit ou Hoefer HE 99X Max Submarine Unit (Amershan Biosciences) a 90 V. Os fragmentos amplificados foram comparados ao marcador de massa molecular, GeneRuler<sup>™</sup> 1kb DNA Ladder ou GeneRuler<sup>™</sup> 100kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences). Os ácidos

nucléicos foram visualizados com o auxílio de um transiluminador UV e os géis fotografados com uma câmara digital Nikon 750.

### **3.18. Ligação dos fragmentos amplificados em plasmídeos**

Os fragmentos amplificados foram inseridos em plasmídeos já preparados para receber produtos de PCR, com o uso do kit InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit (Fermentas Life Sciences). As reações continham 5 µl do produto de PCR, 1 µl de tampão 10X, 1 µl do plasmídeo pTZ57R/T, 0,5 µl da enzima T4 DNA ligase e água para um volume final de 15 µl. Os tubos contendo as reações foram mantidos a 4°C durante a noite. Fragmentos de DNA oriundos de diferentes reações de PCR foram ligados separadamente.

### **3.19. Preparo de bactérias competentes**

Bactérias *Escherechia coli* da cepa DH5-α foram manipuladas para que se tornassem aptas a receber o DNA plasmidial contendo o inserto. Para tal, um pré-inóculo destas bactérias foi incubado em meio SOB (2,4 g de triptona; 1 g de extrato de levedura; 1,1 ml de NaCl 1M; 500 µl de KCl 1M, completando-se o volume com água destilada até 99 ml, autoclavando-se a solução e adicionando-se 1 ml de MgCl<sup>2</sup> 1M em seguida) a 37 °C sob agitação durante a noite. Na manhã seguinte, uma alíquota de 1 ml deste material foi repassado para um erlenmeyer contendo 50 ml do mesmo meio. A densidade ótica (DO) a 600 nm foi monitorada até que esta alcançasse 0,5-0,6 (aproximadamente 2h). Em seguida o frasco foi colocado em gelo, e a cultura recebeu 1 ml de cloreto de magnésio 1M, seguindo um repouso de 15 min. Após isso, o material foi centrifugado a 4000 x g por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e

o sedimento ressuspenso com 20 ml da solução RF1 gelada [5 ml de KCl 1M; 2,5 ml de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1M; 3 ml de acetato de potássio 0,5 M, pH 6,9; 0,5 ml de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  1M; 7,5 ml de glicerol 15% (v/v), ajustando-se o pH para 5,8 com ácido acético e o volume final para 50 ml com água destilada, em seguida filtrando-se a solução], sendo incubada em gelo por mais 15 min. Após uma nova centrifugação a 4.000 x g por 12 min, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso gentilmente em 2 ml da solução RF2 [1 ml de MOPS-NaOH 0,5M pH 7,0; 0,5 ml de KCl 1M; 3,7 ml de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  e 7,5 ml de glicerol 15 % (v/v), ajustando-se o volume para 50 ml com água destilada]. Em seguida, as bactérias foram aliqüotadas em tubos de 1,5 ml (50 µl/tubo) e mantidas a -70 °C até o uso.

### **3.20. Transformação das bactérias com plasmídeos**

Bactérias *Escherichia coli* da cepa DH5- $\alpha$ , competentes para receber plasmídeos, foram descongeladas em gelo, sem agitação. Em seguida, 10 µl de cada reação de ligação foram adicionados a 50 µl de células competentes, permanecendo, este material, em repouso sobre gelo por 25 min. Após este período, os tubos foram transferidos imediatamente para um banho-maria a 37°C, por 5 min. Decorrido este tempo os tubos foram colocados imediatamente no gelo, e ali permaneceram por 2 min. Em seguida 500 µl de meio de cultura LB sem ampicilina foram adicionados ao material, sendo este incubado por 1 h a 37°C. Alíqüotas de 50 µl das bactérias transformadas foram semeadas em placas de cultura LB-ágar com ampicilina (10 g/L de triptona; 5g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl; 0,1 g/L de ampicilina). As placas foram mantidas em estufa a 37°C durante a noite.

### **3.21. Seleção das colônias de bactérias contendo plasmídeos com inserto**

A detecção das colônias que receberam plasmídeos com insertos foi realizada através de PCR. As reações, com volume final de 25 µl continham: Tris-HCl 10mM pH 8.0, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, 0,1% de Triton X-100, 50% de glicerol (v/v), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 0,1 mM (PCR nucleotide mix Invitrogen Life Technologies), 10 pmoles dos primers específicos para regiões do plasmídeo que flanqueiam o inserto (M13F 5' GTAAAACGACGGCCAG 3'; M13R 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'), além de 1,5U de Taq DNA polimerase (Biotools DNA polimerase). Após a adição de todos os componentes, algumas colônias foram escolhidas aleatoriamente, e parte delas foi removida da placa com o auxílio de uma ponteira e colocada no interior do tubo de reação de PCR. Todas as reações foram realizadas em termociclador Whatman Biometra<sup>®</sup> (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 30s, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e um ciclo de 72°C por 5 min. O material amplificado foi analisado através de eletroforese em gel de agarose, como descrito previamente.

### **3.22. Subclonagem das colônias contendo insertos e extração dos plasmídeos**

As colônias contendo insertos foram subclonadas em 3ml de meio LB líquido, contendo ampicilina (0,1 mg/ml). Os frascos foram incubados durante a noite a 37°C, com agitação.

Os plasmídeos foram extraído das bactérias para uso posterior em reações de sequenciamento, digestão, e para estocagem. Para tal, foi utilizado o kit Rapid Plasmid Miniprep Protocol (Marligen), de acordo com as especificações do fabricante. Após a extração, a qualidade do material foi novamente analisado via PCR, como no item anterior.

### **3.23. Sequenciamento dos plasmídeos subclonados**

Os clones, previamente obtidos em nosso laboratório, foram seqüenciados pelo *DNA Analysis Facility*, durante o estágio de doutorado na Johns Hopkins University, Baltimore, MD, EUA.

### **3.24. Alinhamento das seqüências e análise filogenética**

As seqüências obtidas foram comparadas com as demais depositadas no banco de dados através do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Uma árvore filogenética, baseada na comparação entre seqüências gênicas obtidas e as do mosquito *A. gambiae*, foi construída através do método de comparação com máxima parcimônia.

### 3.25. Confeção de oligonucleotídeos específicos para análise da expressão gênica

Oligonucleotídeos (ONTs) foram confeccionados com base nas regiões menos conservadas das diferentes seqüências identificadas, de modo que cada ONT se anelasse apenas ao seu respectivo gene, evitando assim reações cruzadas. Os ONTs são mostrados na tabela 2.

**Tabela 2. Seqüências dos oligonucleotídeos específicos para os diferentes genes de  $\alpha$ -glicosidases.**

Gene	F	R
<i>Aqglu 1</i>	5' GAG CGT AGT ATG GCC ACC GAT 3'	5' TCC GAA AAG GCG GAT GAT GTT C 3'
<i>Aqglu 2</i>	5' CCA GCG AGT GGT CTG ACG GA 3'	5' TTG ATA GTA GGT TTG GAT GAT TTC T 3'
<i>Aqglu 3</i>	5' GAG CTG ATC GAT CCG AAG GGT 3'	5' CCA TAC CAA AGC ATC GTC TGC T 3'

### 3.26. Reação da polimerase em cadeia em tempo real (*Real-time PCR*)

As reações para a determinação da expressão dos genes alvos e dos genes controles (endógenos) foram realizadas em triplicatas em placas de 96 poços (Applied Biosystems). Para cada reação foram acrescentados controles negativos, também em triplicata, constituídos da mistura de reagentes e água. Para cada amostra foi preparado inicialmente uma mistura de reação em um volume final de 35  $\mu$ l. Esta mistura era constituída de 5  $\mu$ l do cDNA, 0,7  $\mu$ l dos ONTs de cada gene (listados no item anterior) a 10  $\mu$ M para uma concentração final de 200 nM e 17,5  $\mu$ l de SyBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A seguir, 10  $\mu$ l do mix foram transferidos para cada poço da triplicata na placa de reação. A reação de Real-Time PCR foi realizada no equipamento Applied Biosystems Amp 7300 Sequence Detection System, com

os seguintes passos: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 10s e 60°C por 1 min. Após a reação uma curva de dissociação (CD) foi construídas para cada amostra.

As análises de cada gene alvo foram realizadas em relação às intensidades de expressão do gene endógeno, que codifica uma proteína ribossomal S7 de mosquitos. Neste caso, as reações de PCR foram realizadas com o par de ONTs S7F (5' TTC GTT GTG AAC CCA AAT AAA AAT C 3') e S7R (5' TGC GGC TTC AGA TCC GAG TTC 3'), nas mesmas condições citadas anteriormente.

Curvas de eficiência foram delineadas para os ONTs de cada gene em questão. Para os genes alvos, reações foram realizadas com o cDNA diluído sucessivamente nas seguintes concentrações: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625. Já para o gene endógeno, as concentrações foram de 1:1, 1:3, 1:9 e 1:27. A eficiência (E) foi calculada através da fórmula  $E=10^{(-1/\text{inclinação})}$ . A quantificação relativa (R) dos genes foi determinada de acordo com Pfaffl (2001), onde CP (do inglês *crossing point*) é definido como o ponto em que a fluorescência detectada está apreciavelmente acima da fluorescência de fundo:

$$R = \frac{E_{\text{alvo}} \Delta CP_{\text{alvo}} \text{ (controle - amostra)}}{E_{\text{endógeno}} \Delta CP_{\text{endógeno}} \text{ (controle - amostra)}}$$

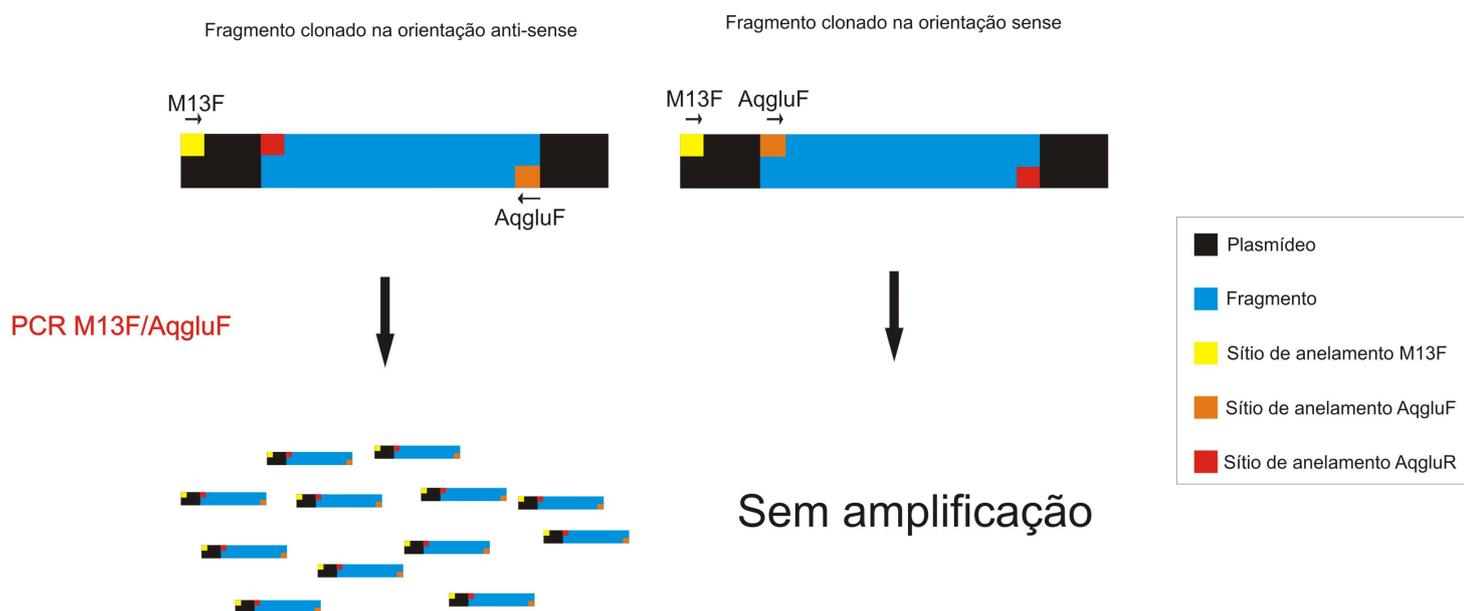
As eficiências calculadas foram: 2,13; 1,92; 2,05 e 2,15 para os ONTs referentes a *Aqglu1*, *Aglu2*, *Aqglu3* e S7, respectivamente.

### 3.27. PCR para obtenção de fragmentos sense e antisense para síntese de RNA dupla-fita (dsRNA)

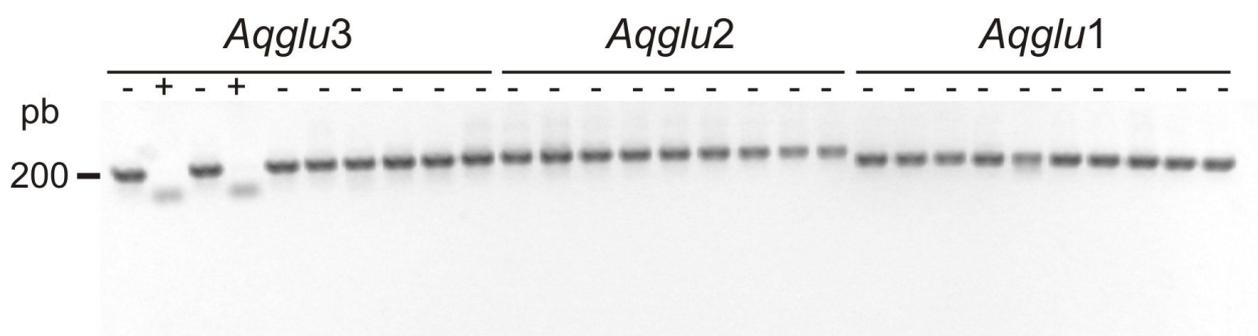
Reações de PCR foram realizadas para que fragmentos gênicos de  $\alpha$ -glicosidases pudessem ser obtidos. Cada reação continha 2,5  $\mu$ l de tampão de reação 10X, 0,5  $\mu$ l de dNTP (10 mM), 1,5  $\mu$ l dos ONTs degenerados P3 e P5, 1,5U de Taq DNA polimerase (Biotools DNA polimerase), além de 1 $\mu$ l de cada plasmídeo (*Aqglu1*, *Aqglu2* ou *Aqglu3* 50X diluído), separadamente. O volume final de cada reação foi ajustado com água para 25  $\mu$ l. Todas as reações foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min, e uma etapa final a 72°C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram ligados a plasmídeos pTZ57R/T, e inseridos em bactérias *Escherichia coli* da cepa DH5- $\alpha$ , como descrito anteriormente. Uma vez que a inserção do fragmento no plasmídeo é aleatória, este experimento gerou plasmídeos que continham os fragmentos gênicos na orientação sense, e outros que continham o mesmo fragmento na orientação anti-sense para que fosse possível a síntese do RNA dupla-fita. Este experimento foi realizado com os diferentes genes identificados, de modo que diferentes placas, cada uma referente a um fragmento gênico diferente, foram obtidas.

### **3.28. Seleção e subclonagem das colônias de bactérias contendo plasmídeos em diferentes orientações**

A seleção de colônias contendo plasmídeos em diferentes orientações (sense ou antisense) foi realizada através de PCR. Cada reação continha 2,5 µl de tampão de reação 10X, 0,5 µl de dNTP (10 mM), 1,5 µl de cada primer, 1,5U de Taq DNA polimerase (Biotools DNA polimerase) e água para volume final de 25 µl. Para a amplificação, foi utilizado o primer M13F combinado com os demais oligonucleotídeos específicos para cada gene de  $\alpha$ -glicosidase, também no sentido *forward* (Aqglu1F, Aqglu2F ou Aqglu3F). Após a adição de todos os componentes, uma pequena porção das colônias de bactérias foi removida da placa com o auxílio de uma ponteira e aplicada no interior do tubo de reação de PCR. Foram escolhidas, aleatoriamente, 10 colônias por placa. Todas as reações foram realizadas em um termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, e uma etapa final a 72 °C por 5 min. A combinação de ONTs utilizada nas reações acima permitiu que fossem amplificados apenas fragmentos que estivessem na orientação antisense, podendo-se, desta forma, diferenciar as colônias contendo fragmentos na orientação sense daquelas portando o mesmo fragmento no sentido antisense, como está exemplificado na figura 5. O material amplificado foi analisado através de eletroforese em gel de agarose (fig. 6). As colônias identificadas como sense ou antisense, foram subclonadas em 3ml de meio LB líquido, contendo ampicilina (0,1 mg/ml). Os frascos foram incubados durante a noite a 37°C, com agitação.



**Figura 5. Esquema representativo das reações de PCR para a seleção de clones contendo fragmentos gênicos de  $\alpha$ -glicosidase nas orientações anti-sense ou sense. Os sítios de anelamento Aqglu generalizam os três fragmentos gênicos utilizados.**



**Figura 6. Eletroforese em gel de agarose para a visualização dos produtos da reação de PCR para a identificação da orientação dos fragmentos gênicos de  $\alpha$ -glicosidases inseridos em plasmídeos pTZ57R/T.** As reações foram realizadas utilizando-se o ONT M13F em conjunto com um dos ONTs AqgluF (1, 2 ou 3), de acordo com o fragmento em questão, com etapas de 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min, e uma etapa final a 72°C por 5 min. Os sinais + e - indicam a orientação do fragmento em questão inserido no plasmídeo (sense e antisense, respectivamente).

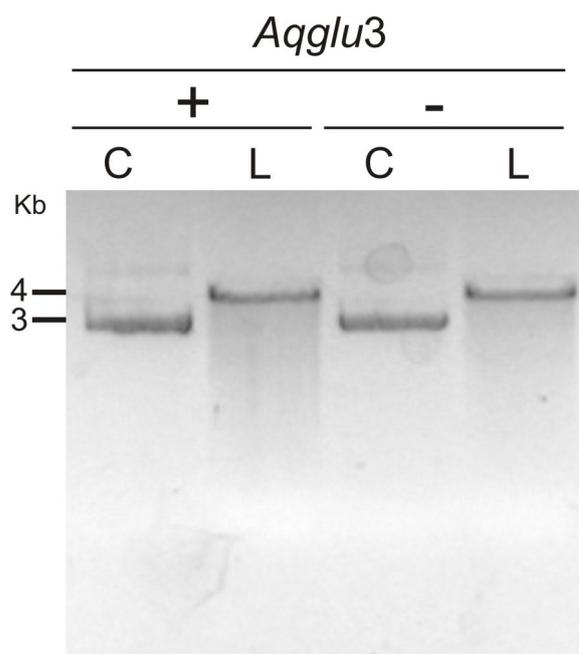
### **3.29. Extração de plasmídeos das bactérias selecionadas**

Os plasmídeos foram extraídos das bactérias através do kit Rapid Plasmid Miniprep Protocol (Marligen), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, bactérias foram transformadas separadamente com os plasmídeos identificados como sense ou anti-sense, de modo que, para cada gene se obteve duas novas placas contendo colônias com plasmídeos diferindo apenas no sentido de inserção do fragmento (+ ou -). Os plasmídeos foram novamente extraídos como acima.

### **3.30. Linearização dos plasmídeos e precipitação do DNA linearizado**

Para a utilização na síntese de dsRNA, é necessário que os plasmídeos estejam linearizados. Assim, a RNA polimerase literalmente cai da fita após a transcrição do fragmento. Para tal, o DNA foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*, que corta a fita apenas na região oposta ao promotor T7, ou seja, após o término do fragmento clonado. Para a digestão foram utilizados: 1µg do DNA plasmidial, 1 µl de *EcoRI*, 1 µl de tampão de digestão 10X específico para *EcoRI* e água para um volume final de 10 µl, seguindo-se uma incubação a 37°C, por um período de 2h. Uma vez linearizados, os plasmídeos migram em uma velocidade menor em relação ao correspondente não linearizado, e desta forma a eficiência da digestão pôde ser observada em gel de agarose, após eletroforese (fig. 7). Após a digestão, o DNA linearizado foi precipitado com a adição de 1/20 volume de EDTA 0,5 M, 1/10 volume de Acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol 100%. O material foi homogeneizado e incubado por 15 min a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 12.000 x g (4°C) e o DNA sedimentado foi

ressuspendido em água ultra-purificada em uma concentração final de 0,5-1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .



**Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para a observação da linearização dos plasmídeos identificados como sense ou antisense.** As fitas foram cortadas com a enzima de restrição EcoRI a 37 °C por 2h. C) circular; L) linear. Os sinais + e - indicam a orientação do fragmento em questão inserido no plasmídeo (sense e antisense, respectivamente).

### 3.31. Síntese de dsRNA para $\alpha$ -glicosidase (ds $\alpha$ -glu)

A síntese de dsRNA foi realizada com o Kit MEGAscript® RNAi Kit (Ambion) de acordo com as especificações do fabricante. Para tal os seguintes passos foram seguidos.

Em um microtubo (1,5 ml) foi colocado 1  $\mu$ g de cada plasmídeo contendo os insertos sense ou antisense específicos de cada gene, os nucleotídeos (ATP, CTP, GTP, UTP) e a enzima T7 polimerase. O material foi homogeneizado gentilmente e incubado por 16h a 37°C. Após a transcrição dos fragmentos em ambas orientações, duas fitas complementares foram geradas no mesmo tubo. Desta forma, foi necessário anelar estas duas fitas para a formação do dsRNA. Para isso, as amostras foram incubadas a 75°C por 5 min e em seguida resfriadas naturalmente em temperatura ambiente.

Após a formação do dsRNA, o material passou por um tratamento com DNase/RNase, realizado a 37°C por 1h. Este passo é necessário para a digestão das demais fitas de ácidos nucléicos, tais quais os moldes de DNA e qualquer RNA simples-fita que não tenha se anelado a outra molécula complementar. Em seguida, o dsRNA foi purificado com um sistema de cartuchos com filtros (fornecido pelo kit), para que traços de proteínas, ácidos nucléicos livres e produtos de degradação, pudessem ser removidos do material. O dsRNA foi recuperado dos filtros em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7, EDTA 1mM, que é compatível com a injeção. Alíquotas de 1:400 (v/v) de RNA foram visualizadas em gel de agarose a 1% .

### **3.32. Micro-injeção e contagem de mosquitos mortos**

Fêmeas recém emergidas, previamente anestesiadas a 4°C, foram injetadas com 69 nl de uma solução contendo 3 µg/µl do dsα-glu, com o auxílio de um micro-injetor Nanoject II (Drummond Scientific) e um microscópio estereoscópico (Carl Zeiss). Os mosquitos injetados foram separados em dois lotes. Um lote foi mantido com solução de sacarose 10% e outro com solução de glicose+frutose 10% (controle 1). Um segundo grupo controle de mosquitos foi injetado com PBS e mantido com glicose+frutose 10%.

A contagem de mosquitos mortos foi realizada diariamente por aproximadamente 14 dias desde a injeção.

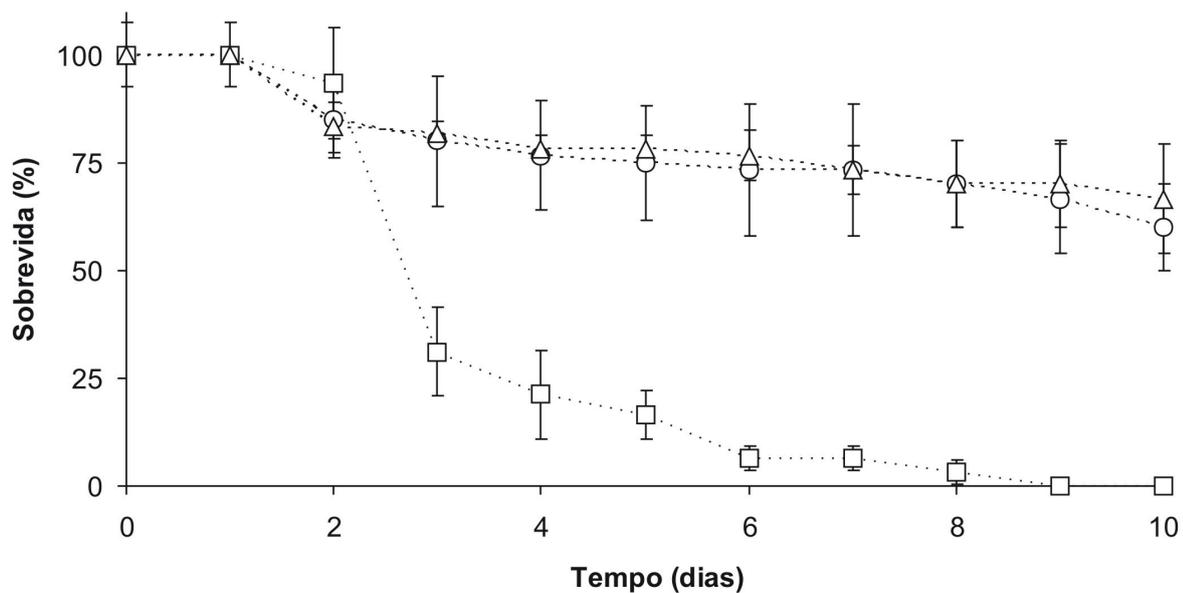
## 4. Resultados

---

#### **4.1. Efeito da sacarose sobre a longevidade e fecundidade das fêmeas**

A influência da ingestão de carboidratos na sobrevivência de *A. aquasalis* foi testada através da observação do efeito de diferentes dietas na taxa de mortalidade de adultos. O tempo de vida das fêmeas foi medido diariamente pela contagem do número de mortos no interior de cada gaiola (fig. 8). Não houve diferenças significativas entre a longevidade dos mosquitos alimentados com sangue + sacarose ou apenas sacarose ( $P=0,71$ ). No entanto, quando estes insetos ingeriram apenas sangue + água, a longevidade das fêmeas foi drasticamente reduzida, de modo que no décimo dia já não havia mosquitos vivos no interior da gaiola. O número total de ovos produzidos também foi afetado quando o açúcar era oferecido aos mosquitos (Tab.3). Quando estes insetos se alimentaram de sangue + sacarose as fêmeas ovipuseram cerca de 35% mais ovos que aquelas que se alimentaram apenas de sangue + água. Resultados mais extremos foram observados quando comparadas as taxas de eclosão destes dois grupos. Aproximadamente 50% dos ovos originados das fêmeas providas com sangue + sacarose eclodiram, ao passo que menos de 1 % dos ovos postos por fêmeas que se alimentaram com sangue + água eram viáveis. Todos os mosquitos machos estavam mortos após o quarto dia de experimento, quando sacarose não estava disponível na dieta.

Os dados acima sugerem que a sacarose é um componente imprescindível na dieta destes mosquitos, afetando diretamente a longevidade e fecundidade destes insetos.



**Figura 8. Comparação entre a sobrevivência de fêmeas de *A. aquasalis* mantidas em diferentes condições alimentares.** Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três diferentes experimentos. -□- sangue + água; -○- sangue + sacarose; -△- sacarose + água.

**Tabela 3. Comparação entre as taxas de postura e eclosão das fêmeas mantidas em diferentes dietas.**

Dieta	n.º de ovos	eclosão <sup>a</sup> (%)
sangue + sacarose	1048	51,15
sangue + água	685	0,30

<sup>a</sup> os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três diferentes experimentos.

#### **4.2. Detecção de atividades carboidrolíticas em intestinos médios de mosquitos fêmeas alimentados com sacarose**

Para a detecção das carboidrases presentes no intestino médio das fêmeas, extratos deste órgão foram ensaiados com os substratos sintéticos listados no item 3.5. De todos os substratos utilizados, NP $\alpha$ Glu foi o único que sofreu hidrólise substancial, revelando que apenas  $\alpha$ -glicosidases estão presentes no intestino destes mosquitos (Tab. 4). Após a realização dos ensaios com as regiões anterior e posterior do intestino médio, pôde-se notar que as atividades  $\alpha$ -glicolíticas se encontram distribuídas ao longo de todo este órgão, porém em concentração maior na região posterior do intestino médio (Tab. 5). Níveis considerados de atividade  $\alpha$ -glicolítica não foram detectados no interior do divertículo (dados não mostrados).

#### **4.3. Cinética temporal da atividade $\alpha$ -glicolítica em intestinos médios de fêmeas em jejum e após a alimentação com sacarose**

A atividade das  $\alpha$ -glicosidases durante a vida adulta das fêmeas foi determinada através de ensaios enzimáticos. Atividades  $\alpha$ -glicolíticas foram detectadas em intestinos médios de mosquitos recém emergidos antes da alimentação com sacarose, alcançando um primeiro pico dois dias após a emergência (fig. 9). Embora possa ser visualizado um segundo, porém discreto, pico de atividade  $\alpha$ -glicolítica imediatamente após ingestão de sacarose, aparentemente, não há uma indução significativa na atividade das  $\alpha$ -glicosidases após a refeição açucarada. Em seguida, a atividade decai aos níveis basais até 6h após a alimentação com sacarose, permanecendo sem grandes variações.

**Tabela 4. Detecção de atividades carboidrolíticas no intestino médio de fêmeas alimentadas com sacarose.**

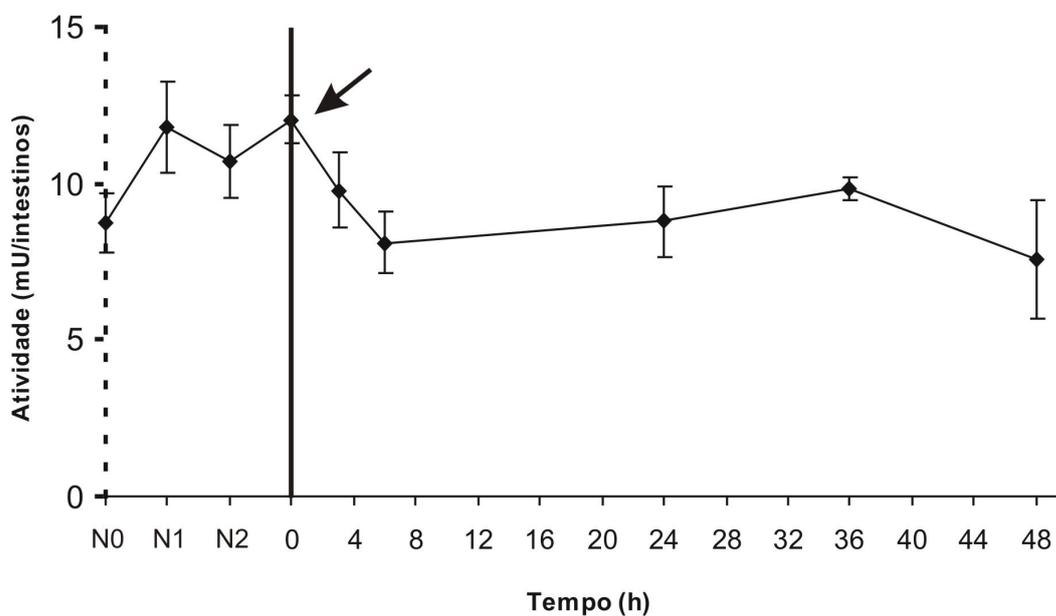
Substrato	Atividade (mU/intestino)
NP $\alpha$ Glu	8,26 $\pm$ 1,13
NP $\alpha$ Malto	ND
NP $\alpha$ Gal	ND
NP $\beta$ Gal	ND

Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios diferentes. ND-Não detectada.

**Tabela 5. Compartimentalização da atividade  $\alpha$ -glicolítica no intestino médio de fêmeas alimentadas com sacarose.**

Região	Atividade $\alpha$ -glicolítica	
	mU/região	%
médio-anterior	0,91 $\pm$ 0,13	14,05
médio-posterior	5,6 $\pm$ 0,63	85,95

Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios diferentes.



**Figura 9. Variação nos níveis da atividade  $\alpha$ -glicolítica em intestinos médios de fêmeas de *A. aquasalis* em jejum e após a alimentação com sacarose.** Vinte microlitros de uma mistura inicial de 5 intestinos (1 intestino/40 $\mu$ l) foram utilizados para a determinação da atividade de  $\alpha$ -glicosidase. As amostras foram ensaiados contra o substrato NP $\alpha$ -glu como descrito no item 3.5. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três diferentes ensaios enzimáticos. N0) Recém emergido; N1) um dia após a emersão; N2) dois dias após a emersão. A seta indica o momento da alimentação açucarada.

#### 4.4. Determinação do pH ótimo das $\alpha$ -glicosidases intestinais

A hidrólise do substrato NP $\alpha$ Glu ocorreu preferencialmente em pH 5,5, embora estas  $\alpha$ -glicosidases tenham apresentado uma atividade considerável na faixa que compreende os pHs 4,5-6,5 (fig. 10). O perfil foi similar tanto nos ensaios com a porção solúvel (S1) quanto naqueles com o material extraído das membranas celulares (S2).

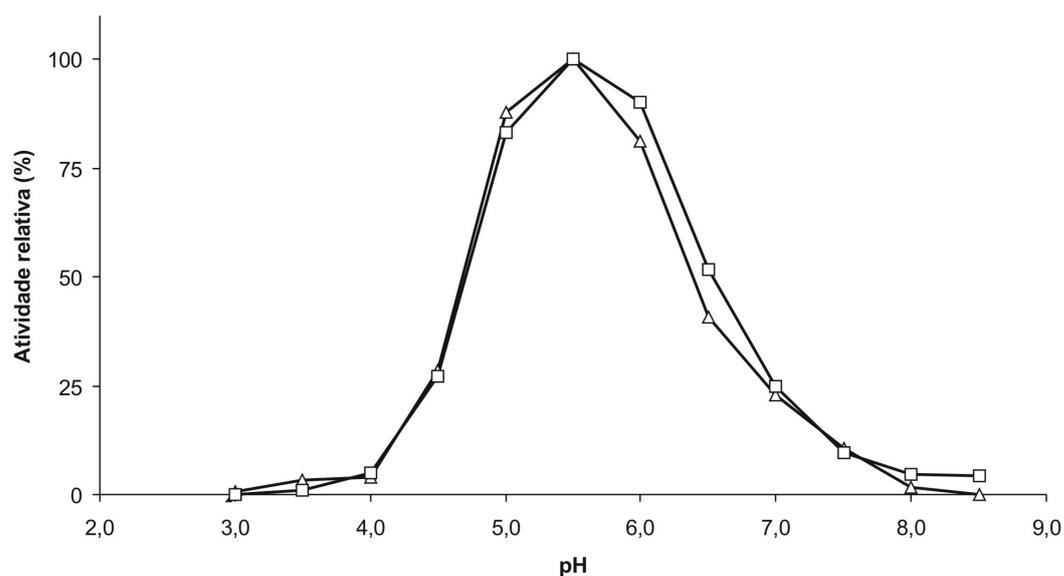
#### 4.5. Fracionamento das $\alpha$ -glicosidases intestinais de fêmeas

Após uma desnaturação térmica preliminar, as curvas geradas revelaram a presença de diferentes atividades  $\alpha$ -glicolíticas no intestino médio das fêmeas ( $r^2=0,80$  e  $0,78$  para S1 e S2, respectivamente). Desta forma, com a intenção de isolar as diversas  $\alpha$ -glicosidases intestinais, os extratos das porções solúvel e ligada a membranas foram submetidos a cromatografias para o fracionamento de suas proteínas.

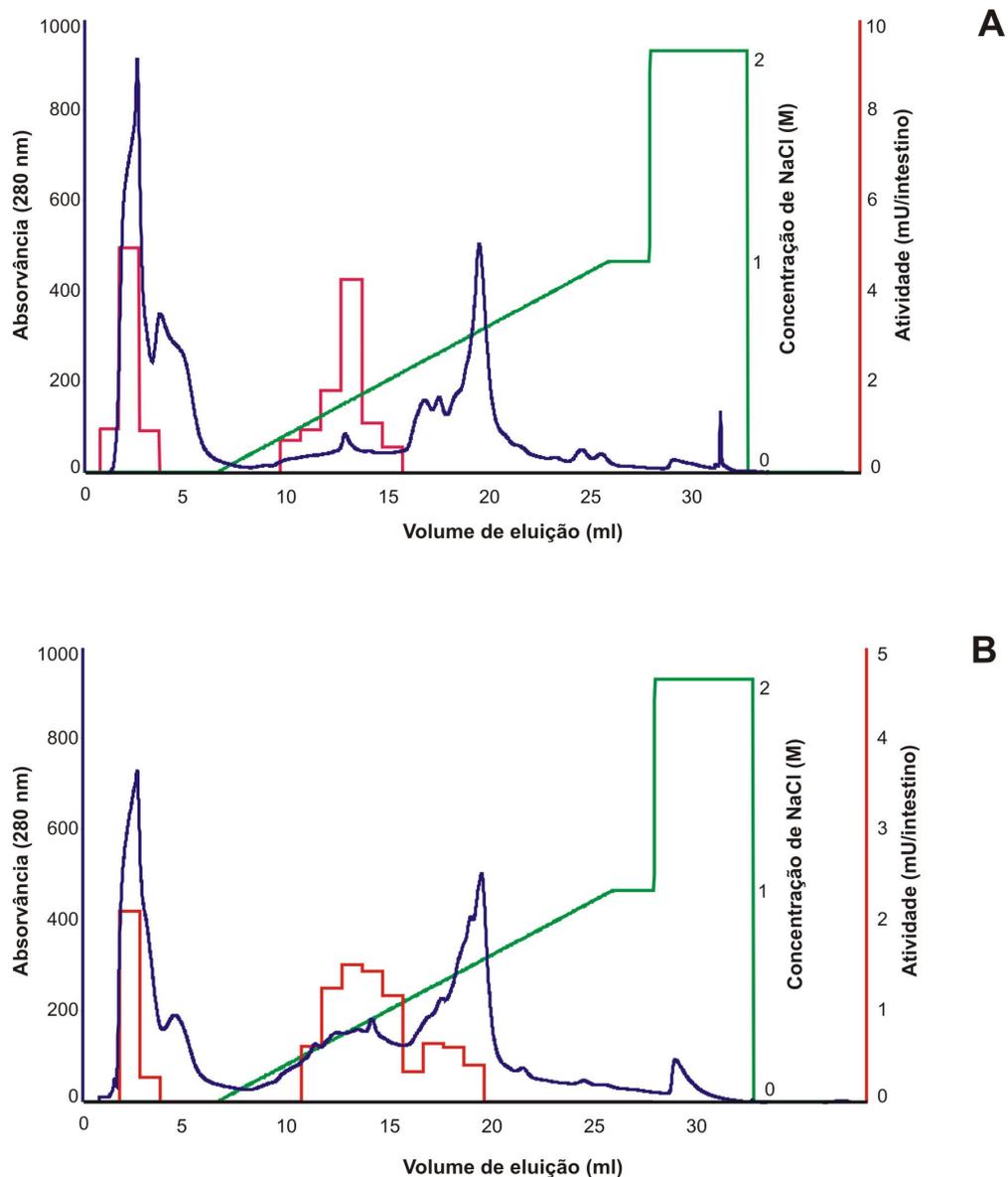
Após o fracionamento inicial pelas cromatografias de troca iônica (Resource Q), o perfil da atividade recuperada foi muito similar entre S1 e S2 (fig. 11). Em ambos foram observados dois picos principais de atividade, sendo o primeiro na fração 2, não retido pela coluna, e o segundo na fração 13, eluído com aproximadamente 400 mM de NaCl. Estas frações foram denominadas S1-RQ2/S2-RQ2 e S1-RQ13/S2-RQ13 (S1 ou S2, de acordo com a origem do extrato) respectivamente. Um terceiro pico de atividade foi visualizado na fração 17, apenas após o fracionamento do extrato ligado a membrana, sendo denominado S2-RQ17. Com isto, é possível sugerir que as  $\alpha$ -glicosidases dos picos S1-RQ2/S2-RQ2 têm um ponto isoelétrico (pI) igual ou acima de 8,0 (pH do tampão utilizado nesta cromatografia) pois ainda se encontravam com carga

positiva durante a cromatografia de troca iônica, e por isso não se ligaram à coluna. Por outro lado, o segundo pico (S1-RQ13/S2-RQ13) parece ser composto por  $\alpha$ -glicosidases com propriedades físico-químicas diferentes daquelas do primeiro pico de atividade, apresentando um  $pI < 8,0$ .

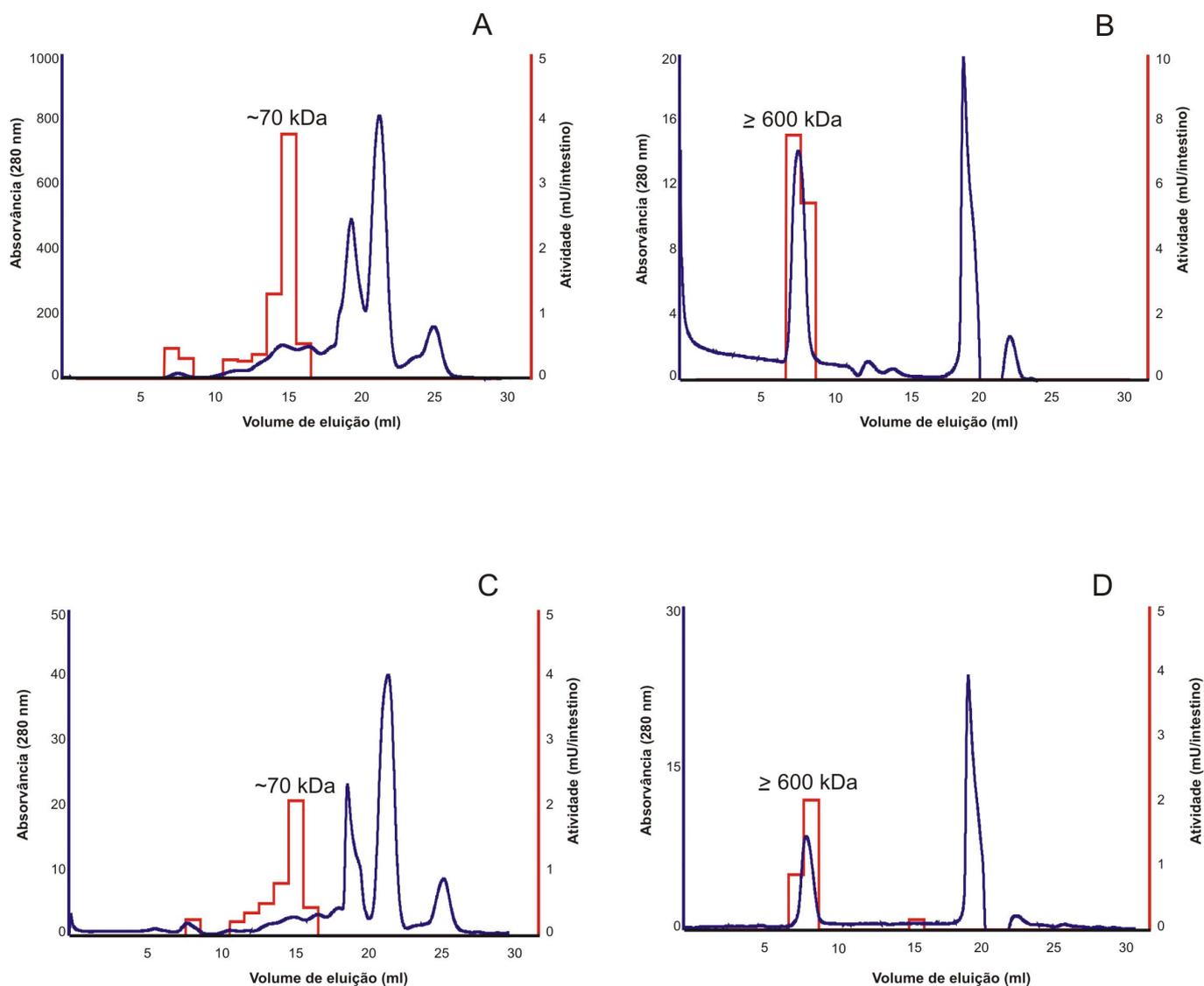
Cada pico de atividade foi então, separadamente, submetido a uma coluna de filtração em gel (Superdex 200). Aparentemente,  $\alpha$ -glicosidases de dois diferentes tamanhos foram recuperadas e novamente os perfis de atividade de S1 e S2 foram muito similares (fig. 12). As  $\alpha$ -glicosidases dos picos S1/S2-RQ2 foram eluídas na fração 15 (~70 kDa), ao passo que aquelas dos picos S1/S2-RQ13 foram eluídas nas frações 7 e 8, podendo ser conferido a estas um tamanho  $\geq 600$  kDa. Infelizmente não foi possível determinar a massa molecular do terceiro pico de atividade presente em S2 (S2-RQ17).



**Figura 10. Efeitos do pH sobre a atividade  $\alpha$ -glicolítica de intestinos médios de fêmeas de *A. aquasalis*.** A atividade foi determinada pela incubação de 20  $\mu$ l de uma mistura inicial de 5 intestinos (1 intestino/40 $\mu$ l) com o substrato NP $\alpha$ -Glu e tampão citrato-fosfato 150 mM com pH variando de 3,0 a 8,5, como descrito no item 3.5. - $\triangle$ - extrato solúvel (S1); - $\square$ - extrato ligado a membranas (S2).



**Figura 11. Cromatografia de troca iônica dos homogeneizados de trato digestivo fêmeas de *Anopheles aquasalis*.** A coluna foi equilibrada com tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 8,0. Um gradiente de 0 a 1 M de NaCl foi realizado para a eluição das proteínas adsorvidas à resina. Frações de 1 ml foram coletadas e ensaiadas com o substrato NP $\alpha$ -Glu como no item 3.5. A) extrato solúvel (S1); B) extrato ligado a membranas (S2).



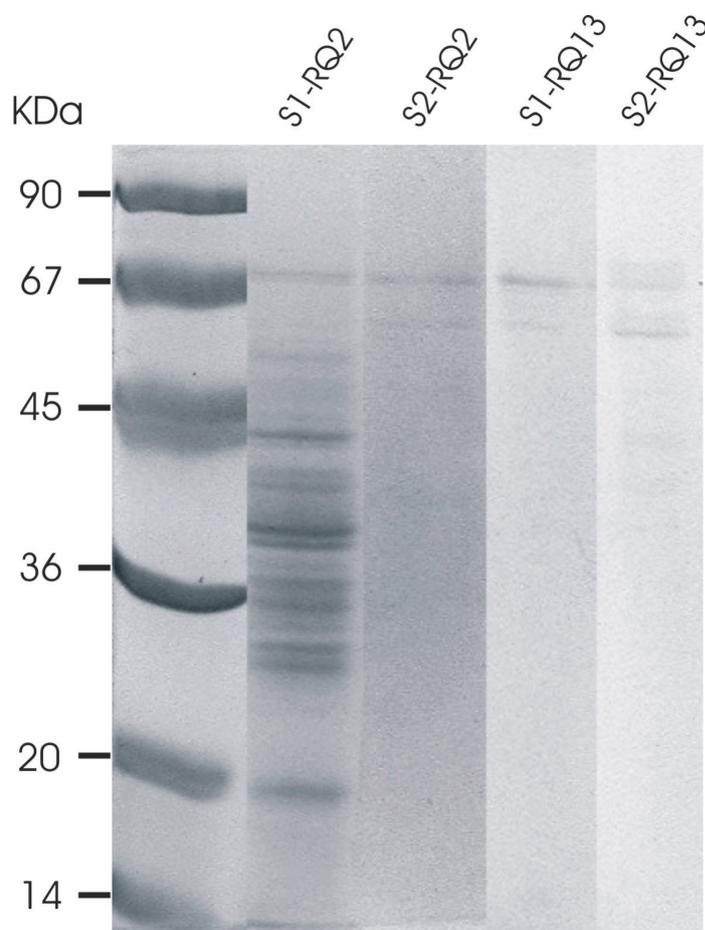
**Figura 12. Cromatografia de filtração em gel das frações com atividade  $\alpha$ -glicolítica provenientes das cromatografias de troca iônica.** A coluna foi equilibrada em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 6,5, contendo NaCl na concentração de 150 mM. As amostras foram aplicadas e eluídas em um fluxo de 1 ml/min. Frações de 1 ml foram coletadas e ensaiadas com o substrato NP $\alpha$ -Glu como no item 3.5. A) S1-RQ2; B) S1-RQ13; C) S2-RQ2; D) S2-RQ13.

#### **4.6. Análise das amostras através de eletroforese em geis de poliacrilamida**

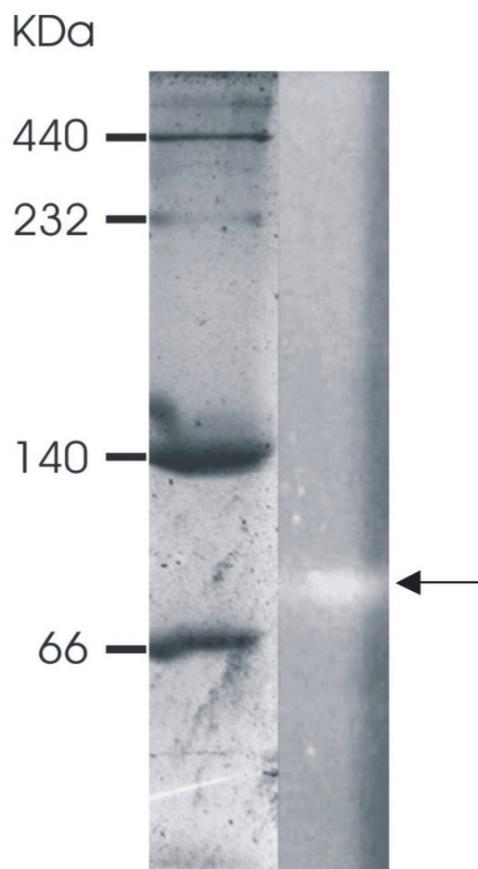
Após o re-fracionamento dos picos S1-RQ2, S2-RQ2, S1-RQ13 e S2-RQ13, através da cromatografia de gel-filtração, a principal fração de cada novo pico de atividade foi precipitada com TCA e submetida a uma eletroforese em gel de poli-acrilamida a 12%, na presença de SDS (fig. 13). Notavelmente, após a eletroforese, apenas polipeptídeos de ~70 kDa foram visualizados no gel, ocorrendo isto, mesmo com as amostras oriundas dos picos com massa molecular estimada em  $\geq 600$  kDa. Isto sugere, que, possivelmente, está ocorrendo uma formação de agregados entre as  $\alpha$ -glicosidases presentes em S1/S2-RQ13.

#### **4.7. Estimativa da massa molecular das $\alpha$ -glicosidases após ensaio enzimático em gel de poli-acrilamida**

As massas moleculares das  $\alpha$ -glicosidases também foram estimadas através de uma eletroforese semi-desnaturante, seguida de um ensaio enzimático com o substrato fluorescente MU $\alpha$ Glu. Assim como na eletroforese desnaturante, apenas uma banda de aproximadamente 70 kDa foi visualizada no gel após o ensaio enzimático, sugerindo que esta é a massa molecular aproximada das  $\alpha$ -glicosidases nativas presentes no intestino médio de fêmeas do mosquito *A. aquasalis* (fig. 14).



**Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de SDS das amostras com atividade de  $\alpha$ -glicosidase.** A principal fração de cada pico de atividade recuperada após o re-fracionamento das amostras S1-RQ2, S1-RQ13, S2-RQ2 e S2-RQ13 pela cromatografia de filtração em gel foi submetida à eletroforese desnaturante. A corrida foi realizada a 100 V e os géis corados com coomasie blue R.



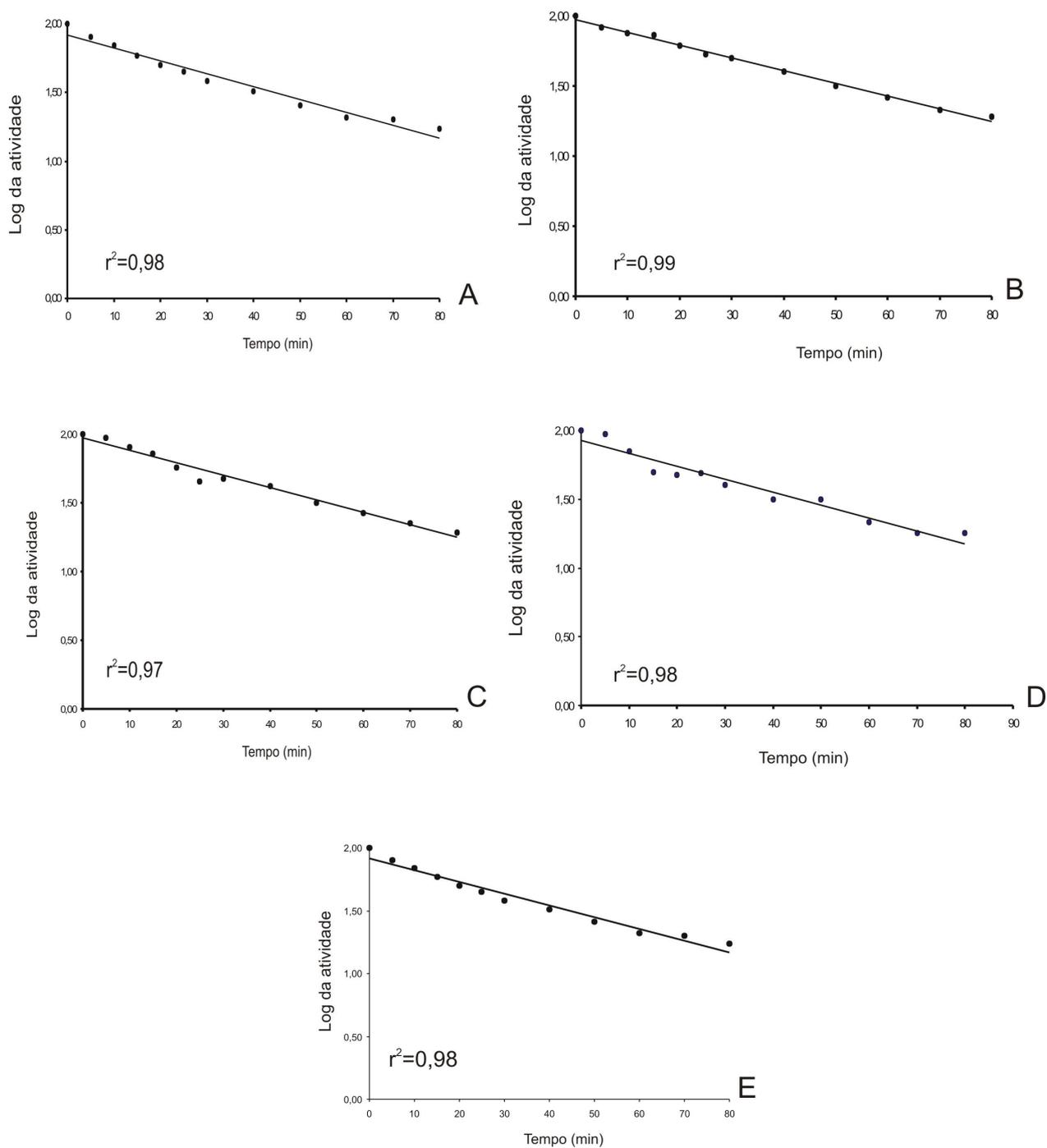
**Figura 14. Determinação da atividade  $\alpha$ -glicolítica após eletroforese semi-desnaturante em gel de poliacrilamida a 8%.** As amostras contendo o equivalente a 15 intestinos médios foram submetidas à eletroforese a 100 V, a 4°C. Em seguida o gel foi incubado em tampão citrato-fosfato 100 mM, pH 5,5 contendo o substrato fluorescente MU $\alpha$ glu, como no item 3.12. A atividade foi visualizada como uma banda clara contra o gel escuro. A seta indica a região de atividade.

#### **4.8. Desnaturação térmica e cinética enzimática das $\alpha$ -glicosidases das amostras semipurificadas**

As atividades  $\alpha$ -glicolíticas encontradas em cada pico de atividade, previamente coletado após a cromatografia de troca iônica (S1-RQ2, S1-RQ13, S2-RQ2, S2-RQ13 e S2-RQ17) foram caracterizadas.

Com uma nova curva de desnaturação térmica foi possível confirmar que as diversas  $\alpha$ -glicosidases haviam sido isoladas nos picos de atividade recuperados após a cromatografia de troca-iônica ( $r^2=0,98$ ;  $0,99$ ;  $0,97$ ;  $0,98$  e  $0,98$ , respectivamente para S1-RQ2, S1-RQ13, S2-RQ2, S2-RQ13 e S2-RQ17) (fig. 15). As diferenças, e também as semelhanças entre as  $\alpha$ -glicosidases isoladas em cada pico, foram visualizadas mais precisamente com a determinação dos valores de  $K_m$  de cada fração. Assim como as outras características bioquímicas, as constantes representadas pelo  $K_m$  foram muito similares entre os picos S1-RQ2/S2-RQ2, ocorrendo o mesmo entre S1-RQ13/S2-RQ13 (Tab. 6).

Com base nos dados apresentados acima, é possível sugerir que apenas três diferentes  $\alpha$ -glicosidases são sintetizadas no intestino médio das fêmeas. Duas delas estão presentes tanto na forma secretada ou ligada a membrana (S1/S2-RQ2 e S1/S2-RQ13) e a terceira apenas ligada a membrana (S2-RQ17). Um resumo com as principais características das diferentes  $\alpha$ -glicosidases isoladas é mostrado na tabela 7.



**Figura 15. Efeito da temperatura sobre a atividade  $\alpha$ -glicolítica das frações semi-purificadas.** As amostras foram incubadas por 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 e 80 min a 45°C e em seguidas ensaiadas com o substrato NP $\alpha$ Glu, como no item 3.5. A) S1-RQ2; B) S1-RQ13; C) S2-RQ2; D) S2-RQ13; E) S2-RQ17.

**Tabela 6. Valores de  $K_m$  determinados para cada  $\alpha$ -glicosidase intestinal parcialmente purificada.**

Amostra	$K_m^a$
S1-RQ2	4,96
S1-RQ13	6,62
S2-RQ2	4,77
S2-RQ13	6,88
S2-RQ17	8,92

<sup>a</sup> valores representados em mM

**Tabela 7. Resumo das principais características de cada  $\alpha$ -glicosidase intestinal semi-purificada**

Amostra	pI	Km <sup>a</sup>	kDa
S1-RQ2	$\geq 8$	4,96	~70
S1-RQ13	$< 8$	6,62	$\geq 600$
S2-RQ2	$\geq 8$	4,77	~70
S2-RQ13	$< 8$	6,88	$\geq 600$
S2-RQ17	$< 8$	8,92	ND

<sup>a</sup> valores representados em mM

#### **4.9. Amplificação, clonagem e seleção de fragmentos contendo seqüências codificantes para $\alpha$ -glicosidases**

O cDNA, previamente sintetizado a partir do RNA intestinal, foi amplificado, via PCR, com os conjuntos de oligonucleotídeos P1/P5 e P3/P5, separadamente (fig. 16). Quando a combinação P1/P5 foi utilizada, apenas um produto, em torno de 250 pb foi visualizado (fig. 16, raia 1), ao passo que na presença do conjunto P3/P5, além do produto de 250 pb, dois outros fragmentos, na altura de 500 pb e 750 pb, também foram visualizados (fig. 16, raia 2). Em seguida, os produtos de PCR das reações P1/P5 e P3/P5 foram separadamente ligados em plasmídeos e transferidos para bactérias *E. coli* da cepa DH5- $\alpha$ . As bactérias foram semeadas em placas de petri, de modo que se obteve uma placa para cada reação de PCR.

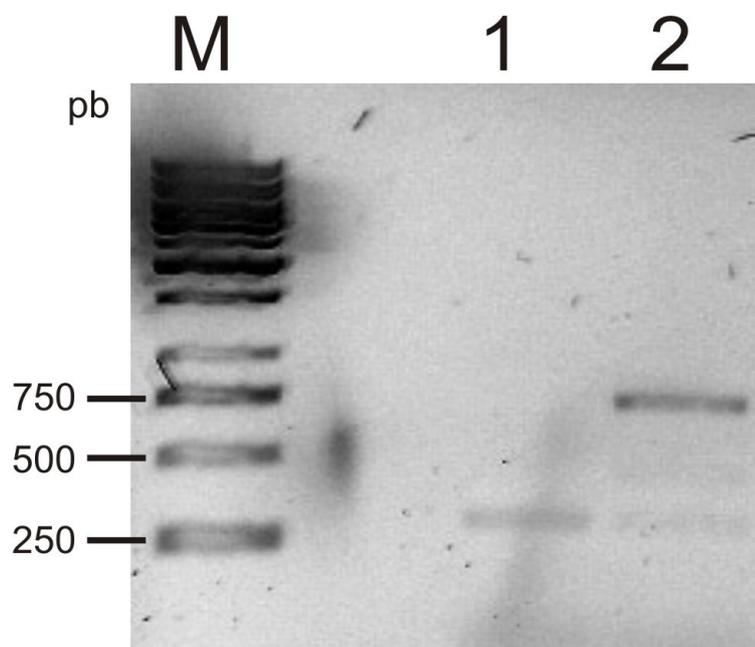
A seleção dos plasmídeos contendo fragmentos de PCR foi realizada através de PCR com primers M13F/R. Inicialmente, foram analisados 5 colônias por placa, e a amplificação do DNA dos clones contendo fragmentos da reação de PCR P1/P5 gerou bandas em torno de 250 e 500 pb (fig. 17A), ao passo que, após a PCR das colônias contendo fragmentos P3/P5, bandas de 500 e 750 pb foram visualizadas (fig. 17B).

Em seguida, foi realizado o sequenciamento do DNA dos fragmentos contidos nestes mesmos clones selecionados, e as seqüências nucleotídicas foram alinhadas e comparadas com as demais depositadas no banco de dados. Das 5 colônias escolhidas da placa P1/P5, nenhuma continha seqüências codificantes para  $\alpha$ -glicosidases. Duas delas apresentaram seqüências similares à subunidade 4 da enzima NADH desidrogenase (ND4) de *Anopheles gambiae*, não sendo possível detectar a seqüências dos outros

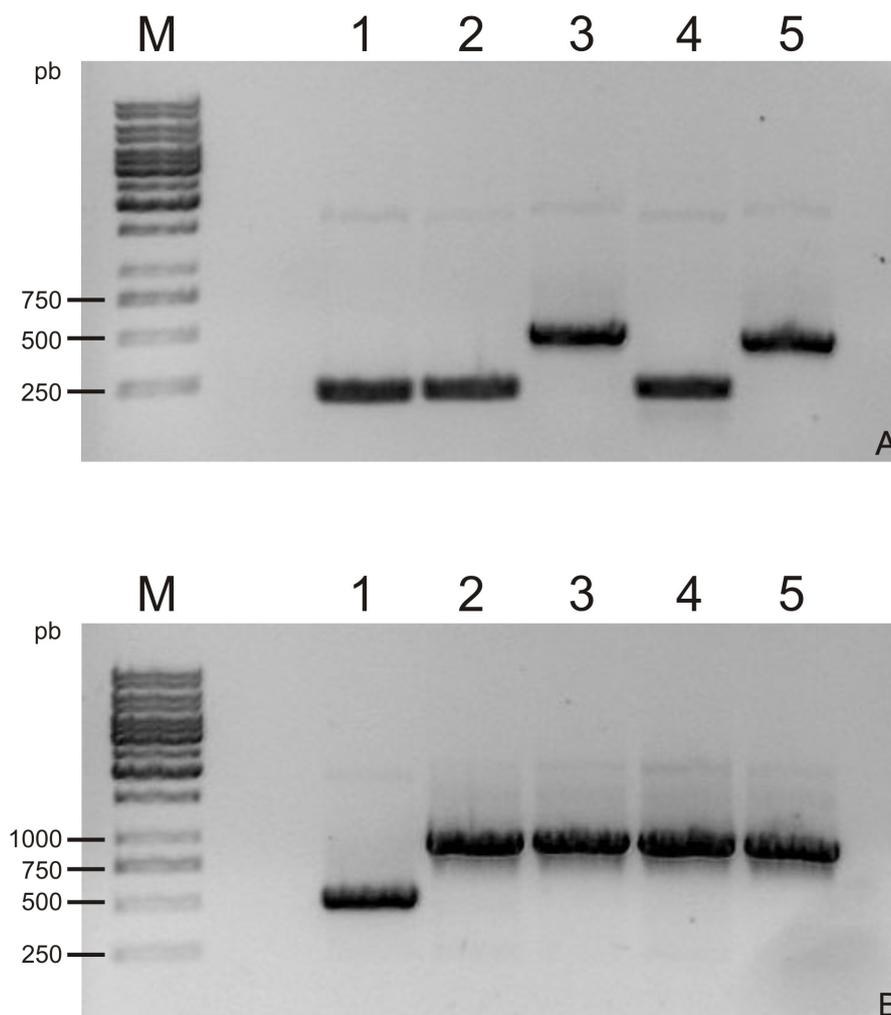
três fragmentos. Por outro lado, apenas uma das 5 colônias selecionadas da placa P3/P5 não apresentou seqüências codificantes para  $\alpha$ -glicosidases (clone C1). Os outros quatro clones escolhidos (C2, C3, C4 e C5) apresentaram similaridade, principalmente com as  $\alpha$ -glicosidases dos genes *Agm1* e *Agm2* de *A. gambiae* (tab. 8). Além disso, as seqüências continham um domínio de  $\alpha$ -amilase (Amy), com um sítio para ligação de cálcio, o que as coloca na família 13 das glicosil-hidrolases. Os clones C4 e C5 continham seqüências exatamente iguais, ao passo que os demais apresentaram fragmentos diferentes (C2 e C3).

As três seqüências que codificavam diferentes  $\alpha$ -glicosidases (clones C2, C3 e C4) foram traduzidas e alinhadas com as seqüências polipeptídicas referentes aos produtos dos genes *Agm1* e *Agm2* e o fragmento tipo maltase (ENSANGG00000012889), chamado neste trabalho, por conveniência de *Agm3* (fig. 18). Com base nestes dados, uma árvore filogenética também foi construída (fig. 19).

Com base nos resultados gerados pela comparação das seqüências, assumiu-se que, os clones C3 e C4 são homólogos a *Agm2* e *Agm1* respectivamente, e serão chamados tentativamente como *Aqglu2* e *Aqglu1*, respectivamente. Por outro lado, o clone C2 apresentou menos de 50% de similaridade em relação a ambos, se fixando em um ramo separado da árvore, distinguindo-se também do gene *Agm3*. De qualquer forma, convenientemente, o clone C2 foi nomeado *Aqglu3*. Através desta análise, pôde-se chegar à conclusão de que três diferentes genes codificantes para  $\alpha$ -glicosidases intestinais foram identificados em fêmeas do mosquito *A. aquasalis*.



**Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 1% para a visualização dos produtos amplificados após a reação de RT-PCR.** O cDNA intestinal foi amplificado separadamente por dois conjuntos de oligonucleotídeos seguindo as etapas de 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e um ciclo de 72°C por 5 min. 1) P1/P5; 2) P3/P5. M) Marcador de massa molecular (Gene ruler 1kb DNA ladder).



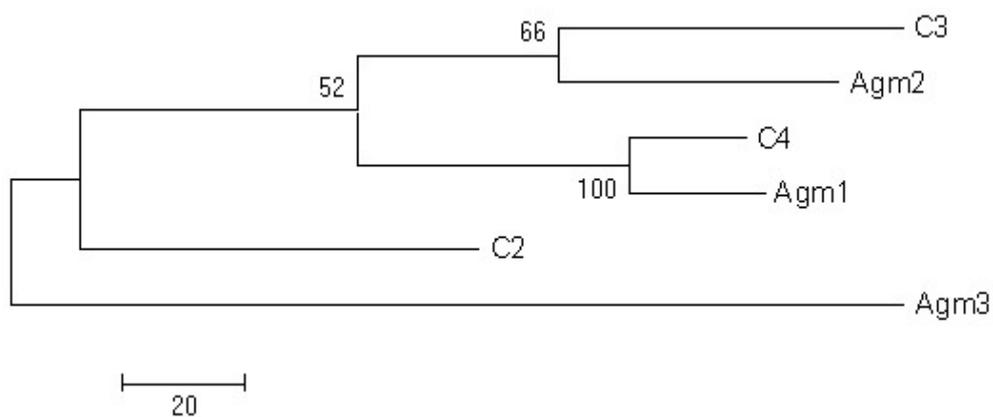
**Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 1% para a visualização dos produtos amplificados após a reação de RT-PCR para a identificação das colônias contendo plasmídeos com insertos.** Cinco colônias escolhidas aleatoriamente em cada placa foram utilizadas como fonte de DNA na reação de PCR. O DNA foi amplificado com os ONTs M13F e M13R seguindo as etapas de 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min e um ciclo de 72°C por 5 min. A) Reações com colônias da placa P1/P5; B) Reações com colônias da placa P3/P5. M) Marcador de massa molecular (Gene ruler 1kb DNA ladder). Os números de 1 a 5 indicam as colônias escolhidas.

**Tabela 8. Similaridade dos fragmentos de cDNA intestinal em relação aos genes *Agm1* e *Agm2* de *Anopheles gambiae*.**

Clone	Similaridade (%)	
	<i>Agm1</i>	<i>Agm2</i>
2	43	48
3	47	58
4	83	53
5	83	53

C4	---
Agm1	---
Agm2	---
C2	---
C3	---
Agm3	RELIDAFQAEHGGETRVMTEAYSTLDVIKTYIASSTGRLGSHMPFNFRLITEVDKQSTA
	* .:* .: : :: :* . :
C4	NGTRVPPSNWISVFRG---SAWEWNDVRQEYYLHQFLVKQPD-----LNYRHPALVEE-
Agm1	NGTRVPPSNWVSVFRG---SAWEWNDVRKEYYLHQFLVKQPD-----LNYRNPALVQE-
Agm2	GTERDPPNNWVAAWYG---SAWEWNDERKQFYLHQFHKKQPD-----LNYRNPVVQA-
C2	NAE---PNNWQSVFHT---PAWTRLPGQNQYYLHQFDKKQPD-----LNYQNQRVKDE-
C3	GGRNLPPNNWIQAFRG---SAWQWSDTRNQYYLHQFTVEQPD-----LNYRNPVVQE-
Agm3	ADYVVKVVDWMSILPAGQVPNNWVMGNHDRPRVATRLGEERIDALNMVLLSLSGASVTYQG
	.:* . * . : : * * . :
C4	----MKDVLKFWLDKGVHGFVRDVAVPYLFESLP-----VGGVYPDEERSMATDD----P
Agm1	----MKDVMTFWLGKGVHGFRI DAVPYLFESLP-----VNGVYPDEEKSGETDD----P
Agm2	----MKDVLRFWLDQGVDFRIDAVPWL FET-----VG--FPDEPVSGHSTD----P
C2	----MESMIRFWLDKGVDFRIDAINHVYEDP-----QFRDEELIDPKGE----L
C3	----MKDILTFWLDKGV DGLRIDAVPTLYEDT-----QLRDEPASGLTED----T
Agm3	EEIGMTDVYISWEDT-VDPAACNAGKDL YAEKSRDPCRTPFQWDDTAMAGFTTGSKTWLP
	* .: * . * . :* : : * .
C4	ENPNYL IHTHTQNL DPTFDMMYQWRKVVDEYKAGHKTEDIVLMAEAYTPLANI IRLFGD-
Agm1	DNPTYLVHQHTQNLDET FDMMYQWRKVVDDFKQQTQSEDI VLM AEAYTPLLNI IRLFGN-
Agm2	LSQNYLTHIYTL DQPETV DMMYQWRELMDQYKQEHNTTTKVL MTEAWSSLDVVKTYFND-
C2	IWEN-LDHKYTQNLPECYDLIYDWRDVF DQYKARDN-VTRLMMTEAYANLEQTMLWYGNP
C3	EDTNCLLHIY TQDLPETVEMVYEWRELVDAYQREHGGDTRVIMTEAYSSLEI IQTYYS-
Agm3	VGDYREVNVAQLAAEKSHLKVYQSMME LRKTKTYQLGT VKAVALGDSVLA VVRELTNF
	: . : : : : : : . : .
C4	ANS-EGARVPFNFEVLS--NTFKD TTGKQFHDVIKRWLDIVPANRVSNWVLGNHD-
Agm1	EVS-EGAHIPFNFEVLS--NTFKD TTGQQFYDNIKRWLDVVPENRFSNWVLGNHD-
Agm2	SNNRQGSQMPFNFLIM--RLDQNSKASDFQTVINSWLDI I PPGHTPNWVLGNHD-
C2	QRNRKGAH I PNFAMIN--RLSND SRAGDFKEI IDEWLDGMPAGQANWVLGNHD-
C3	ASGRLGSHMPFNFRIIT--ELNEQSKPSDYVKKVVDWMSIVPAGNVPNWVLGNHD-
Agm3	GTYITLANFGSQIEVISGITLADALPGKLYFEVVS VNSHNIRGGSMATKDIVLLPN
	: . : : : : . : : : . . :

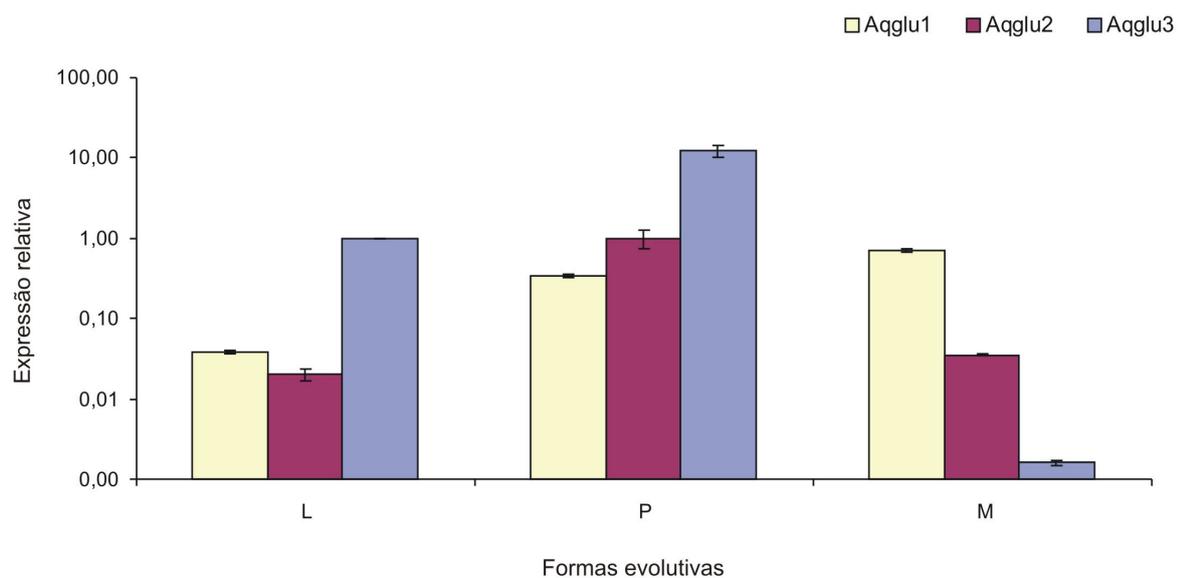
**Figura 18. Alinhamento das seqüências polipeptídicas dos fragmentos gênicos codificantes para  $\alpha$ -glicosidases intestinais de *A. aquasalis* (*Aqglu1*, *Aqglu2* e *Aqglu3*) e *A. gambiae* (*Agm1*, *Agm2* e *Agm3*). (\*) identidade entre os aminoácidos; (: e .) similaridade entre os aminoácidos.**



**Figura 19. Árvore filogenética das  $\alpha$ -glicosidases intestinais de *A. aquasalis* (*Aqglu1*, *Aqglu2* e *Aqglu3*) e *A. gambiae* (*Agm1*, *Agm2* e *Agm3*).** Após o alinhamento das seqüências polipeptídicas, a árvore foi construída pelo método de máxima parcimônia. Os números nos ramos indicam a porcentagem de Bootstrap (apenas valores >50% estão indicados).

#### **4.10. Expressão gênica das $\alpha$ -glicosidases intestinais nas formas imaturas e em machos**

A expressão de cada gene, previamente clonado e seqüenciado, foi estudada através da técnica de PCR em tempo-real primeiramente em intestinos médios das formas imaturas e de mosquitos machos (fig. 20). É possível notar que os três genes são expressos tanto em larvas quanto em pupas, e também em machos, porém em níveis bem distintos. O gene *Aqglu3* é o mais expresso nas formas imaturas, sendo aproximadamente 10 vezes mais expresso em pupas com relação às larvas, porém sua expressão é baixa em machos. Assim como *Aqglu3*, o gene *Aqglu2* foi mais expresso em intestinos médios de pupas, porém em concentrações bem menos elevadas. Em contrapartida, o gene *Aqglu1* é o principal gene expresso em machos, possuindo também atividade em larvas e pupas, entretanto em níveis menores.



**Figura 20. Expressão relativa dos genes *Aqglu1*, *Aqglu2* e *Aqglu3* no intestino médio das formas imaturas e em machos de *A. aquasalis*.** A expressão gênica foi determinada através de PCR em tempo real utilizando-se o marcador fluorescente SyBR green, com as etapas de 10 min a 95 °C, e 40 ciclos de 95 °C por 10 s e 60 °C por 1 min. L) larva; P) pupa; M) macho. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três diferentes reações realizadas em triplicata (n=9).

#### **4.11. Cinética da expressão gênica das $\alpha$ -glicosidases intestinais em fêmeas em jejum e após a alimentação com sacarose**

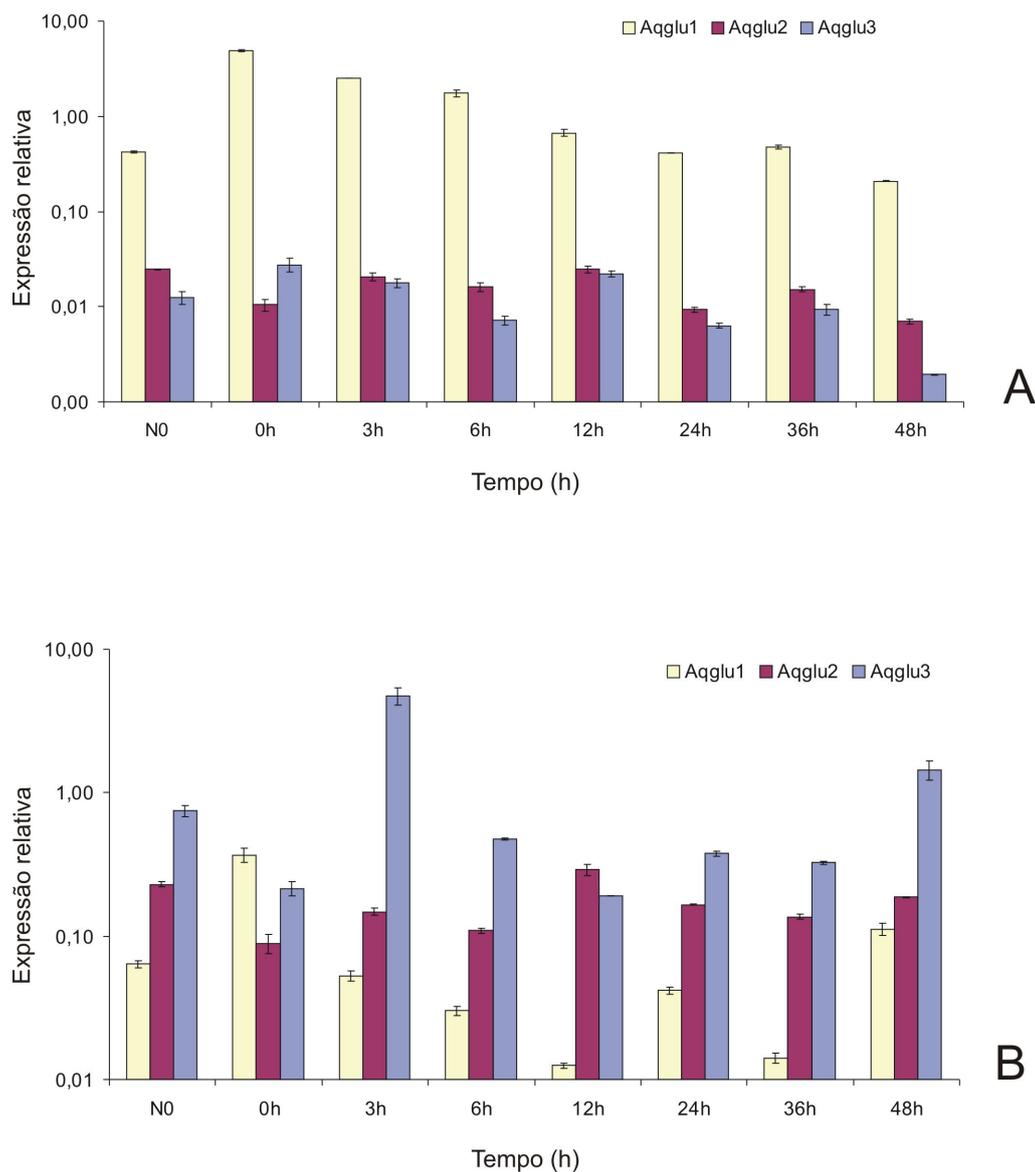
O padrão da expressão dos genes *Aqglu1*, 2 e 3 foi avaliado nos intestinos médio-anterior e médio-posterior de fêmeas em jejum e em diversos momentos após a alimentação com sacarose (fig. 21). Ficou nítido que *Aqglu1* é o principal expresso no IMA de fêmeas (fig. 21A). Mesmo antes da alimentação com sacarose, o nível de expressão chega a ser perto de 100 vezes maior que o de *Aqglu3*. É provável que a sacarose exerça um papel ativador na transcrição de *Aqglu1*, uma vez que imediatamente após a refeição açucarada, a quantidade de transcritos deste gene aumenta em quase 10 vezes, retornando ao nível inicial apenas em 24h após a refeição açucarada. Os transcritos de *Aqglu3* e *Aqglu2*, no IMA, permaneceram, durante todo o tempo, em concentrações consideravelmente menores que *Aqglu1*, e parecem não ser ativados pela sacarose, ao menos neste tecido, sugerindo que *Aqglu1* seja o principal gene expresso em intestinos médios-anteriores de fêmeas.

Por outro lado, este quadro se inverte quando a expressão destes três genes é estudada no intestino médio-posterior (fig. 21B). No tecido em questão, o gene *Aqglu3* se torna o mais expresso dentre os três estudados, de modo que seus transcritos são encontrados em maiores concentrações ainda em fêmeas não alimentadas. A transcrição de *Aqglu3* também parece ser intensificada após a ingestão de sacarose. Entretanto, em comparação ao gene *Aqglu1*, a ativação de *Aqglu3* ocorre mais tardiamente, por volta de 3h após a ingestão de sacarose. Ao contrário do que ocorre com *Aqglu1*, a concentração de transcritos de *Aqglu3* retorna aos níveis basais mais rapidamente, por volta de 6h após a refeição açucarada e parece sofrer outros dois picos de

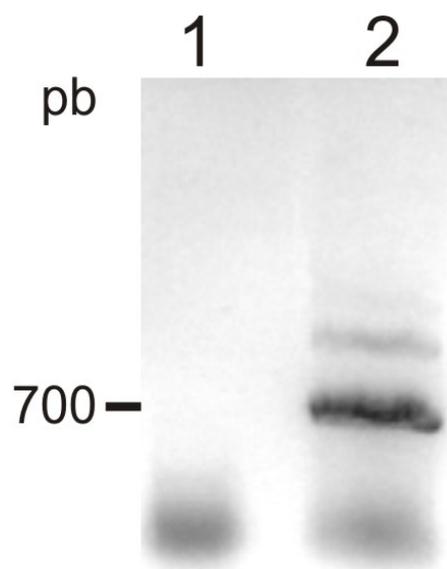
transcrição, em 24h e 48h, respectivamente. De uma maneira geral, *Aqglu3* é o principal gene expresso no IMP de fêmeas, sendo *Aqglu1* muito pouco ativo neste tecido, quadro que se inverte no IMA. Por outro lado, o gene *Aqglu2* parece ser de expressão mediana em ambos os tecidos estudados, não sofrendo grandes oscilações após a ingestão da dieta açucarada.

#### **4.12. RNAi: Injeção do dsRNA e observação dos efeitos na longevidade dos mosquitos**

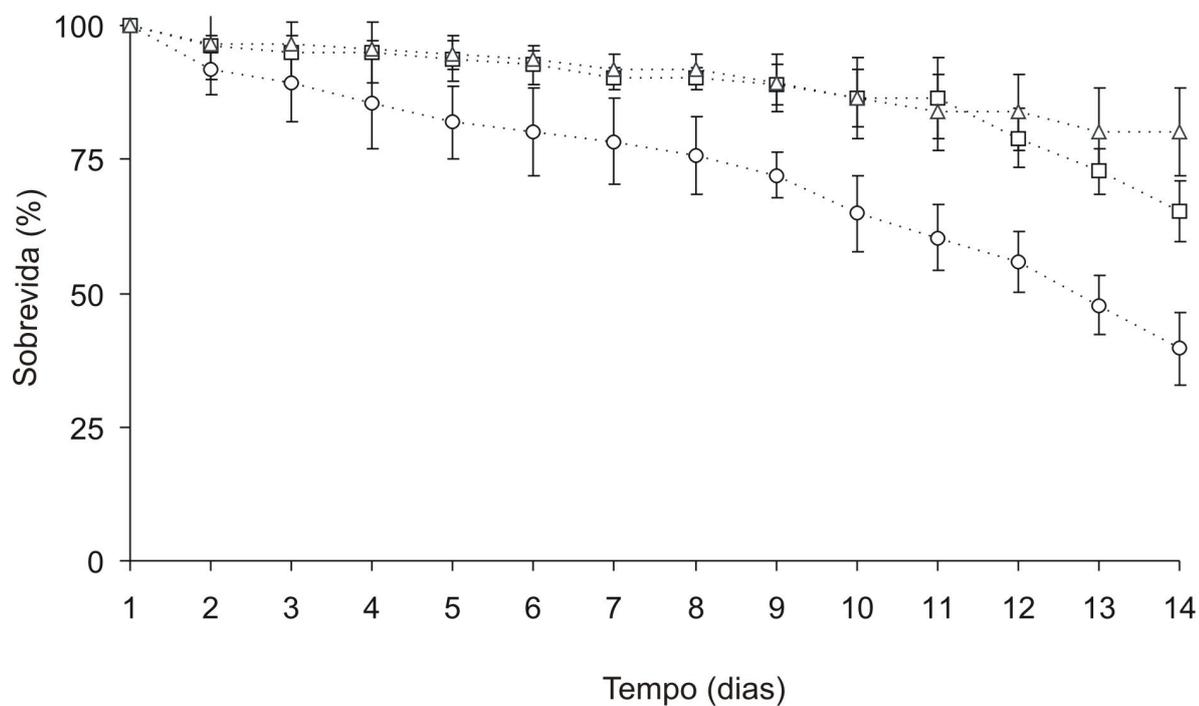
Após a síntese do dsRNA referente ao gene *Aqglu3* (dsAqglu3) (fig. 22), este produto foi injetado em fêmeas de *A. aquasalis* e a longevidade destes insetos foi medida. Após duas semanas de contagem diária de fêmeas mortas, o percentual de mosquitos remanescentes foi de 39,6 %, 65,4% e 80,2 %, respectivamente para os grupos ds $\alpha$ -glu + sacarose, ds $\alpha$ -glu + glc/fru e PBS + glc/fru (fig. 23). Os dados apresentados indicam que há um aumento significativo na mortalidade dos mosquitos injetados com o ds $\alpha$ -glu e mantidos com sacarose, se comparados com aqueles mantidos com glicose + frutose ( $P < 0,05$ ). Além disso, quando estes índices são comparados aos das fêmeas PBS + glc/fru a diferença é ainda maior ( $P < 0,0005$ ). Sendo assim, apesar de tais experimentos terem sido realizados em caráter preliminar, não havendo ainda um controle das porcentagens do *knockdown* e da atividade  $\alpha$ -glicolítica remanescente, é possível que a diminuição na longevidade das fêmeas injetadas com o dsAqglu3 aconteça em decorrência do silenciamento deste gene, indicando que as  $\alpha$ -glicosidases exercem um papel importante para estes insetos.



**Figura 21. Expressão relativa dos genes *Agglu1*, *Agglu2* e *Agglu3* no intestino médio de fêmeas de *A. aquasalis* em jejum e após a alimentação com sacarose.** A expressão gênica foi determinada através de PCR em tempo real utilizando-se o marcador fluorescente SyBR green, com as etapas de 10 min a 95 °C, e 40 ciclos de 95 °C por 10 s e 60 °C por 1 min. A) Expressão relativa no intestino médio-anterior; B) Expressão relativa no intestino médio-posterior. N0) fêmeas em jejum. O tempo 0h indica o momento imediatamente após a ingestão da refeição açucarada. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três diferentes reações realizadas em triplicata (n=9).



**Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 1% para a visualização do RNA dupla-fita (dsRNA) referente ao gene *Aqglu3*.** As reações de síntese do dsRNA foram realizadas a 37°C por 16h, como no item 3.31. 1) Controle negativo (reação com moldes na mesma orientação); 2) dsRNA para *Aqglu3*.



**Figura 23. Efeitos da injeção do dsRNA referente ao gene *Aqglu3* (dsAqglu3) na sobrevivência de fêmeas de *A. aquasalis*.** As fêmeas foram injetadas com o dsAqglu3 ou PBS e mantidas com sacarose ou glicose+frutose (glc/fru) e a mortalidade foi monitorada diariamente. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três diferentes experimentos. -○-dsAqglu3 + sacarose; -□-dsAqglu3 + glc/fru; -△-PBS + glc/fru.

## 5. Discussão

---

Os açúcares encontrados nas plantas são importantes recursos alimentares para os mosquitos e embora o néctar floral seja a fonte mais conhecida, estes insetos também obtêm carboidratos de néctares extra-florais, frutas danificadas e tecidos vegetativos (Clements, 1992).

A importância de substâncias açucaradas na dieta dos mosquitos hematófagos é um assunto de muita controvérsia. Há muito têm sido proposto que uma refeição de açúcar é mais eficiente que o sangue para a síntese das reservas energéticas (Van Handel, 1965; Clements, 1992). Além disso, a ingestão de açúcares serve não apenas como combustível inicial para a produção de ovos (Magnarelli, 1978), mas também supre a energia necessária para o vôo (Van Handel, 1984), permitindo, desta forma, a busca por uma alimentação sanguínea e por reservatórios para a oviposição (Jamnback, 1961; Hunter, 1977). Ainda nesta linha de raciocínio, foi sugerido que a dieta de carboidratos prolonga de forma notável a longevidade dos mosquitos (Nayar e Sauerman, 1971), sendo estas substâncias, quando ingeridas em excesso, armazenadas na forma de glicogênio, e até mesmo de lipídeos (Van Handel, 1984).

Apesar das evidências, existem vertentes que contestam esta teoria, como é o caso dos dados apresentados por Gary Jr e Foster (2001). Em seus experimentos com o mosquito *Anopheles gambiae*, estes pesquisadores sugeriram que múltiplas refeições sanguíneas poderiam substituir uma dieta contendo carboidratos. Embora tenha sido mostrado que a taxa de reprodução de *A. gambiae* não tenha sido afetada pela alimentação com sacarose, houve um aumento na longevidade destes insetos quando açúcar + sangue estava disponível. Tais mosquitos permaneceram vivos por 20-43 dias quando se

alimentaram apenas de sangue, indicando que as fêmeas mantidas nestas condições (apenas sangue) podem viver o suficiente para se tornarem efetivos vetores de malária. Este fato não aconteceu com os mosquitos *Anopheles aquasalis*, em experimentos conduzidos em nosso laboratório. Estes mosquitos apresentaram uma sobrevivência consideravelmente maior quando uma dieta contendo açúcar foi oferecida, assim como ocorre para outras espécies de mosquitos (Day et al, 1994). Além disso, a maior parte das fêmeas que foram mantidas na ausência de sacarose estava morta por volta de 6 dias após a emergência, sugerindo que estes mosquitos necessitam se alimentar de açúcar para intensificar sua longevidade, e conseqüentemente, a sua competência vetorial.

Não se pode afirmar ao certo quão freqüentemente as fêmeas de *A. gambiae* se alimentam de açúcares no campo. É possível que elas raramente ou até mesmo nunca se alimentem de açúcar, como sugerido por Muirhead-Thomson (1951), Gillies (1968), McCrae (1989) e Beier (1996). Se as fontes de açúcares forem escassas e houver um hospedeiro vertebrado disponível no campo, pode haver uma pressão seletiva para a alimentação exclusivamente sanguínea, tornando estes mosquitos independentes de refeições açucaradas para a manutenção do ciclo de vida. Entretanto, ainda existe a dúvida se a baixa freqüência com que estes mosquitos se alimentam de açúcares na natureza é uma causa da escassez de fontes de carboidratos ou da preferência por sangue (Gary Jr e Foster, 2001). Por outro lado, a disponibilidade de fontes de açúcares no *habitat* de *A. aquasalis* pode ter sido um fator determinante para que estas substâncias exerçam um papel fundamental na fisiologia destes

mosquitos, e talvez por isso a dependência deste vetor aos açúcares ainda seja inerente ao seu ciclo de vida.

Outro fato que merece atenção é a queda na fertilidade dos mosquitos mantidos na ausência de sacarose. Segundo Magnarelli (1978), a ingestão de açúcares pode ser utilizada como combustível inicial para a produção dos ovos e maturação dos ovários, o que afetaria diretamente a fertilidade das fêmeas. Os dados encontrados sugerem que a fertilidade em *Anopheles aquasalis* está sendo drasticamente afetada pela ausência de sacarose.

A digestão de açúcares é um processo que requer atividades  $\alpha$ -glicolíticas para a liberação de glicose (Chiba, 1997) e  $\alpha$ -glicosidases foram detectadas no intestino médio de fêmeas de *A. aquasalis*. Embora estas enzimas tenham sido encontradas em glândulas salivares dos mosquitos *Culex tarsalis* (Schaefer e Miura, 1972), *Aedes aegypti* (Marinotti et al., 1990; Marinotti e James, 1990), *Aedes albopictus* (Marinotti et al., 1996) e *Anopheles darlingi* (Moreira-Ferro et al., 1999), é possível que estas  $\alpha$ -glicosidases exerçam um papel minoritário na degradação de sacarose da dieta. Além disso, nenhuma atividade de  $\alpha$ -glicosidase foi detectada no divertículo de *A. aquasalis*, assim como em relatos sobre os flebotomíneos *Phlebotomus langeroni*, *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomia longipalpis* (Dillon e El Kordy, 1997; Gontijo et al., 1998; Jacobson e Schlein, 2001), sugerindo que a degradação de sacarose esteja ocorrendo no intestino médio destes mosquitos.

Através de estudos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) em fêmeas de *A. aegypti*, Bauer et al. (1977) mostraram que durante grandes períodos em jejum ou após a alimentação com sacarose há uma tendência de

atrofia no retículo endoplasmático rugoso das células da região médio-posterior do intestino das fêmeas, sugerindo que esta região estaria principalmente envolvida com a síntese de enzimas para a digestão de sangue. Entretanto, a taxa da síntese protéica é bem mais elevada durante a digestão de sangue, pois envolve uma quantidade e diversidade muito maior de enzimas (Briegel e Lea, 1975; Graf e Briegel, 1989; Noriega e Wells, 1999; Páscoa et al., 2002), ao passo que a digestão de sacarose requer apenas  $\alpha$ -glicosidases, o que torna este evento compreensível. Desta forma, é possível afirmar que a degradação massiva de sacarose em *A. aquasalis* também ocorre no intestino médio-posterior, ao menos na ausência de sangue, justificando os 85% da atividade  $\alpha$ -glicolítica total encontrada nesta região. Por outro lado, pode-se sugerir que a atividade encontrada no intestino médio-anterior exerce um papel importante na degradação de sacarose, principalmente durante a digestão sanguínea, quando a região médio-posterior está totalmente preenchida com o sangue ingerido pelo mosquito.

Não foi estudada, neste trabalho, a compartimentalização das  $\alpha$ -glicosidases induzidas por sangue. Todavia, foi mostrado por Billingsley e Hecker (1991), em estudos com o mosquito *Anopheles stephensi*, que, após a alimentação sanguínea,  $\alpha$ -glicosidases ligadas a membranas foram detectadas apenas na região médio-anterior do intestino médio, ao passo que toda atividade  $\alpha$ -glicolítica encontrada no intestino médio-posterior estava restrita ao lúmen intestinal. Os dados encontrados por estes autores reforçam a teoria de que o intestino médio-anterior exerça um papel fundamental na digestão de sacarose enquanto o intestino médio-posterior esteja preenchido com sangue. Além disso, a comparação entre os dados obtidos neste trabalho com os

daqueles pesquisadores, sugerem que os mecanismos de síntese das  $\alpha$ -glicosidases durante a digestão de açúcar e de sangue sejam diferentes.

Desde que atividades  $\alpha$ -glicolíticas foram detectadas nos extratos insolúveis (S2) do intestino médio, fato já relatado em outros insetos, tais quais *Dysdercos peruvianus* (Silva e Terra, 1995) e *Phlebotomus langeroni* (Dillon e El Kordy, 1997), é possível sugerir que estas enzimas sejam sintetizadas pelas células epiteliais do próprio intestino médio. Assim, a degradação massiva dos açúcares seria realizada no intestino médio, com enzimas produzidas por este órgão. Desta forma, a função da saliva seria auxiliar a solubilização e a ingestão dos oligossacarídeos consumidos pelos mosquitos (Eliason, 1963; Yuval, 1992), mas não na digestão propriamente dita destas moléculas.

O tempo de vida dos mosquitos *A. aquasalis* adultos é drasticamente reduzido se eles não consumirem uma refeição contendo carboidratos dentro dos primeiros quatro dias após a emergência. Desta forma, a primeira ingestão de açúcar deve ocorrer, preferencialmente e rapidamente, neste período. A maioria dos mosquitos recém emergidos utiliza reservas oriundas da pupa nas primeiras horas após a emergência. No entanto, estes insetos brevemente iniciam sua busca por fontes de açúcares para reporem suas reservas energéticas (Clements, 1992). Sendo assim, a detecção de altos níveis de  $\alpha$ -glicosidases no intestino médio de fêmeas de *A. aquasalis* logo após a emergência não surpreende e ainda reforça a idéia mencionada acima. Esta atividade seria responsável pela degradação imediata de sacarose, garantindo uma liberação rápida de glicose e frutose, assim que o mosquito ingerisse suas primeiras porções de açúcar. A queda da atividade  $\alpha$ -glicolítica nas horas após a ingestão de sacarose poderia estar acontecendo em decorrência do equilíbrio

entre a síntese e a utilização de tais enzimas, tal qual sugerido por Marinotti e James (1990), em estudos com o mosquito *A. aegypti*. Além disso, a ingestão de sacarose parece não estar relacionada com a ativação da síntese das  $\alpha$ -glicosidases, uma vez que atividade  $\alpha$ -glicolítica foi encontrada no intestino médio de mosquitos não alimentados. Outros fatores, como hormônios, estão provavelmente regulando a produção destas enzimas ainda no estágio de pupa (Racioppi et al., 1948).

Ao menos em mosquitos em jejum, e após a ingestão de sacarose, nenhuma outra atividade carboidrolítica foi detectada no intestinos médio das fêmeas. No entanto, os dados ainda são insuficientes para se afirmar que outras glicosidases não possam ser sintetizadas pelos mosquitos, uma vez que a alimentação destes insetos com outros tipos de açúcares não foi testada. Assim sendo, é possível que outras enzimas possam ser ativadas após a ingestão de diferentes carboidratos. A detecção de atividades  $\alpha$ -glicolíticas antes da alimentação pode estar relacionado ao fato de que a sacarose é o açúcar mais comumente ingerido pelos mosquitos (Van Handel et al., 1972; Marinotti e James, 1990), fato que não impede a ativação de outra carboidrase e a supressão das  $\alpha$ -glicosidases a partir da ingestão de outro açúcar. Outros autores já têm demonstrado que flebotomíneos são capazes de selecionar refeições de açúcar de diferentes fontes, incluindo plantas e secreções de afídeos (Killick-Kendrick e Killick-Kendrick, 1987; Schlein e Yuval, 1987; Cameron, et al., 1995). Desta forma, uma variação no tipo de glicosidase poderia possibilitar a sobrevivência destes indivíduos através da digestão de açúcares de diferentes plantas, podendo influenciar na distribuição das populações destes insetos (Dillon e El Kordy, 1997).

Em estudos recentes, Jacobson e Schlein (2001) detectaram atividades de  $\alpha$ -amilase e de  $\alpha$ -glicosidase em glândulas salivares e intestinos médios do inseto *Phlebotomus papatasi*. Segundo eles, isto estaria ocorrendo porque na natureza os flebotomíneos podem adquirir energia de tecidos vegetais e caules (Schlein e Jacobson, 1994; Schlein e Muller, 1995), regiões que contêm grandes quantidades de sacarose e amido (Taiz e Zeiger, 1991). O amido é especificamente hidrolisado pela  $\alpha$ -amilase em maltose, substância que é clivada pela  $\alpha$ -glicosidase, gerando glicose (Dixon e Webb, 1979), sugerindo que a detecção destas duas atividades nos intestinos deste inseto é concernente com a sua dieta. Por outro lado a atividade de  $\alpha$ -amilase não foi encontrada no intestino das fêmeas de *A. aquasalis*. Desta forma, além do tipo de açúcar ingerido, isto também pode estar relacionado às diferenças entre os aparelhos bucais de flebotomíneos e mosquitos. Enquanto as peças bucais nestes insetos são adaptadas à sucção (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1997), permitindo a sucção apenas de soluções açucaradas, naqueles, os instrumentos da boca são adaptados à dilaceração (Forattini, 1973) o que os permite se alimentar de tecidos vegetais, que são ricos em grânulos de amido. Os resultados dos experimentos realizados com flebotomíneos sugerem que a dieta influencia o tipo de glicosidase sintetizada.

O pH é uma propriedade que afeta diretamente a atividade das enzimas digestivas (Terra e Regel, 1995; Cooper e Vulcano, 1996). As condições ótimas para que as  $\alpha$ -glicosidases intestinais do mosquito *A. aquasalis* hidrolisem seu substrato ocorrem ao redor do pH 5,5, o que as classifica como  $\alpha$ -glicosidases ácidas (Mehrani e Storey, 1993). Este valor está dentro da faixa

de pH ótimo encontrado para as  $\alpha$ -glicosidases de outros insetos, que varia entre 5,0-6,5 (Terra et al., 1996).

Embora a massa molecular aparente ( $M_r$ ) das  $\alpha$ -glicosidases esteja entre 60-80 kDa, estas podem se apresentar na forma de agregados com tamanhos múltiplos destes valores (Terra et al., 1996). Isto pode explicar o fato de algumas  $\alpha$ -glicosidases apresentarem uma alta massa molecular aparente ( $M_r \geq 600$  kDa). Notavelmente, apenas polipeptídeos de  $\sim 70$  kDa foram visualizados após a eletroforese desnaturante ou o ensaio de atividade em gel, sugerindo que as formações com  $M_r \geq 600$  kDa são dissociadas durante estes processos, e  $\sim 70$  kDa é a massa das formas monoméricas das  $\alpha$ -glicosidases intestinais. Este valor está em acordo com o tamanho das  $\alpha$ -glicosidases previamente identificadas em outros mosquitos, como nas formas adultas de *A. aegypti* (68 kDa) (Marinotti e James, 1990), em larvas de *A. aegypti* (60 kDa) (Silva-Filha, et al., 1999) e em *A. albopictus* adultos (67 kDa) (Marinotti et al., 1996).

A caracterização bioquímica de cada pico de atividade após a cromatografia de troca iônica revelou a presença de duas  $\alpha$ -glicosidases ativas em S1 e S2, e uma terceira apenas em S2. A comparação entre as características bioquímicas destas enzimas sugere que existe uma semelhança muito grande entre as  $\alpha$ -glicosidases dos picos S1-RQ2 e S2-RQ2, ocorrendo o mesmo entre S1-RQ13, e S2-RQ13. Desta forma, pode-se inferir que as atividades  $\alpha$ -glicolíticas isoladas nestes picos representam nada mais que as formas solúveis (S1) ou ligadas a membranas (S2) da mesma enzima. Assim, apenas três  $\alpha$ -glicosidases distintas teriam sido caracterizadas, isoladas nos picos S1/S2-RQ2, S1/S2-RQ13 e S2-RQ17. Uma vez que, aparentemente, as

enzimas dos picos RQ2 e RQ13 estejam sendo encontradas tanto no lúmen intestinal quanto ligada a membrana, é bastante provável que, tanto a forma solúvel quanto a insolúvel sejam produtos de um mesmo gene. Desta forma, tais enzimas podem estar sofrendo alterações pós-traducionais que as remetam para as membranas ou para a secreção. Não obstante, este fenômeno também pode estar relacionado ao processamento alternativo do RNA mensageiro, de modo que as seqüências contidas no éxon a ser transcrito, e conseqüentemente traduzido, determinariam o endereçamento destas  $\alpha$ -glicosidases. Este é um fenômeno já observado em várias espécies de *Plasmodium* com relação à proteína MAEBL da família das proteínas de ligação a eritrócitos. Nestes organismos, Singh et al. (2004) identificaram mecanismos de *splicing* alternativo que são responsáveis pela substituição da seqüência codificante da região C-terminal por outra com características hidrofílicas, alterando a proteína de membrana MAEBL tipo 1 para uma isoforma solúvel. No entanto, isto necessita ser estudado de uma maneira mais detalhada em *A. aquasalis*.

O sequenciamento dos fragmentos de PCR amplificados a partir do cDNA proveniente do intestino de fêmeas alimentadas com sacarose identificou três genes diferentes. Destes, *Aqglu1* e *Aqglu2* eram similares aos genes *Agm1* e *Agm2* de *A. gambiae* (Zheng et al., 1995), respectivamente, e *Aqglu3* apresentou uma similaridade inferior a 50% com relação a ambos os genes. Durante o sequenciamento do genoma do mosquito *A. gambiae*, um terceiro fragmento gênico codificante para  $\alpha$ -glicosidase - não identificado por Zheng et al. (1995) - foi sequenciado (Holt et al., 2002). Surpreendentemente, *Aqglu3* não apresentou semelhança alguma com este fragmento, causando surpresa

ainda maior o fato do alinhamento deste fragmento com as demais seqüências de *A. gambiae* e *A. aquasalis* ter mostrado que este gene possuía baixa similaridade com as demais  $\alpha$ -glicosases destes mosquitos. A presença de um gene com seqüências tão diferentes das demais leva a crer que a pressão seletiva sobre este fragmento talvez seja menor que aquela sobre os outros dois genes identificados em *A. gambiae* (*Agm1* e *Agm2*), permitindo assim que ele sofra uma maior taxa de mutação sem prejudicar a adaptabilidade dos mosquitos ao meio em que vivem. Em decorrência disso, é possível que este fragmento esteja se tornando, ou já tenha se tornado um pseudogene, não exercendo mais sua função no mosquito em questão, apesar de ainda ser transcrito. Isto faz sentido se forem levados em consideração os argumentos de Gary Jr e Foster (2001), já apresentados acima, em que múltiplas alimentações sanguíneas podem substituir o papel do açúcar em *A. gambiae*. Provavelmente os genes *Agm1* e *Agm2* ainda exercem um papel essencial para o mosquito, e por isso continuam tendo suas seqüências conservadas de uma maneira mais eficiente.

Uma possível explicação para o fato de que este fragmento não tenha sido identificado por Zheng et al. (1995), é a de que estes autores selecionaram seqüências de uma biblioteca de cDNA intestinal utilizando um fragmento do gene *Mal1* de *A. aegypti* (James et al., 1989) como sonda. Como a similaridade deste fragmento, com relação as demais seqüências do tipo maltase é muito baixa, durante a seleção dos clones da biblioteca de cDNA, o clone contendo o fragmento *Agm3* pode não ter hibridado com a sonda, não permitindo assim sua detecção. Por isso, estes autores caracterizaram apenas duas seqüências e não três como seria correto. A presença de um maior

número de regiões conservadas entre os três genes de *A. aquasalis*, quando comparados aos três genes de *A. gambiae*, sugere que no vetor neo-tropical estes genes são mais conservados que no mosquito africano.

A análise da expressão dos três genes revelou que, assim como ocorre com *Agm1* (Zheng et al, 1995), *Aqglu1* também se expressa principalmente em pupas e mosquitos recém emergidos, e sua expressão aumenta principalmente após a alimentação com sacarose. Estes também foram os genes que apresentaram o maior grau de similaridade quando comparados um com o outro. É importante ressaltar que *Aqglu1* é principalmente expresso no intestino médio-anterior e em machos. Por outro lado, os demais genes (*Aqglu2* e *Aqglu3*) se expressam de maneira bem diferente de *Agm2*. Enquanto que *Agm2* é expresso apenas em intestinos médios de adultos, *Aqglu2* parece não ter uma especificidade por tecido. Apesar de ser um gene de expressão relativamente baixa, seus transcritos foram detectados, sem grandes variações, em todas as formas evolutivas do mosquito, e não apenas em adultos. Já o padrão de expressão de *Aqglu3* foi mais parecido com *Aqglu1*, ao menos no que diz respeito à sua expressão nas formas imaturas e na ativação após a ingestão de sacarose. No entanto, *Aqglu3* quase não é expresso em machos adultos, e nas fêmeas, é ativado principalmente na região posterior do intestino médio. Muito provavelmente estes três genes possuem papéis diferentes na degradação de açúcares no intestino médio dos mosquitos. Uma vez que o canal alimentar de machos é morfometricamente similar ao intestino médio anterior das fêmeas (Rudin e Hecker, 1976), a análise dos dados sugere que *Aqglu1* deve estar relacionado preferencialmente com a digestão de sacarose. Desta forma, é possível que, após a ingestão de sangue, a região anterior do

intestino médio continue sintetizando  $\alpha$ -glicosidases para a digestão de açúcares enquanto a região posterior permanecer ocupada com a refeição sanguínea. Por outro lado, o gene menos expresso em machos também é mais ativo no intestino médio posterior das fêmeas. Isto pode ser um indicativo de que, além da digestão de sacarose, este gene pode estar relacionado com a degradação de açúcares do sangue no intestino médio-posterior. Além disso, é possível que o gene *Aqglu2*, seja um intermediário entre a digestão de sacarose e de açúcares presentes no sangue, e sofra alguma ativação após a tomada do repasto sanguíneo pelas fêmeas. Entretanto, estas são apenas suposições, de forma que, possíveis alterações nos padrões de expressão de tais genes, em decorrência da ingestão de sangue ainda necessitam ser estudadas para que conclusões mais consistentes venham a ser tiradas. Contudo, pode-se afirmar que existem três genes sendo expressos no intestino médio das fêmeas, estando dois deles relacionados com a digestão de sacarose, uma vez que há uma ativação na transcrição em 0h e em 3h após a ingestão deste açúcar (*Aqglu1* e *Aqglu3*, respectivamente). Embora *Aqglu1* e *Aqglu3* sejam notavelmente ativados pela ingestão de sacarose, a detecção de transcritos dos três genes codificantes de  $\alpha$ -glicosidases nas formas imaturas do mosquito sugere a existência de um sistema de regulação transcricional, envolvendo possivelmente o hormônio juvenil, assim como ocorre em *Apis mellifera* (Ohashi et al., 1996).

A detecção de três genes permite afirmar, com um embasamento maior, que as  $\alpha$ -glicosidases isoladas e caracterizadas bioquimicamente possivelmente tem origem em três produtos gênicos diferentes. Isto deve ser confirmado futuramente com a obtenção das seqüências polipeptídicas de

cada. Além disso, com a detecção das seqüências que codificam  $\alpha$ -glicosidases a partir da amplificação de transcritos intestinais, pode-se, agora, afirmar que a síntese destas enzimas, assim como a digestão de sacarose, esteja sendo realizada no intestino médio, sugerindo que a função das  $\alpha$ -glicosidases das glândulas salivares deve ser revista.

No presente trabalho, também foi revelada a importância de uma dieta açucarada para a sobrevivência e para a fecundidade de *A. aquasalis*. Uma vez que a ausência de sacarose na dieta acarreta um efeito deletério a estes mosquitos, qualquer mecanismo que interfira na síntese das enzimas que degradam este dissacarídeo poderia causar um efeito similar ao de uma dieta livre de tal substância. A demonstração de tal fato caracterizaria estas enzimas como alvos potenciais para o controle destes vetores, o qual, devido a diversos aspectos relacionados à emergência de parasitas resistentes a drogas, é considerado, outra vez, o mais prático e eficiente método para controle da malária (Hemingway e Craig, 2004).

Um desafio chave e o primeiro passo essencial no desenvolvimento de novas drogas é a identificação dos alvos corretos. Uma ampla porcentagem dos candidatos a drogas falha durante o desenvolvimento, e por isso, a indústria está à procura de novas tecnologias para identificar alvos mais eficientes com uma elevada probabilidade de sucesso durante o processo de desenvolvimento da droga (Bartz e Jackson, 2005).

Seguindo este raciocínio, mesmo que em caráter preliminar, foi avaliado o efeito da injeção de RNA dupla-fita referente ao gene *Aqglu3*, sobre a longevidade de fêmeas de *A. aquasalis*.

Após a injeção do dsAqglu3, foi possível observar que a taxa de mortalidade nas fêmeas aumentou. No entanto, o aumento na mortalidade não foi tão acentuado quanto se esperava, uma vez que a longevidade das fêmeas é drasticamente reduzida quando estas são mantidas na ausência de sacarose. É importante ressaltar que apenas o dsRNA específico para o gene *Aqglu3* foi injetado, e no caso de mosquitos, assim como em outros eucariotos superiores, a degradação parece se direcionar apenas às seqüências alvos dos siRNAs, não se propagando nos sentidos 5' e 3' do RNA mensageiro, diferentemente do que ocorre nos eucariotos inferiores e em plantas (Celotto e Graveley, 2002). Desta forma, apesar de os três genes possuírem algumas regiões conservadas, é possível que apenas *Aqglu3* esteja sendo eficientemente silenciado, sendo que os demais genes, principalmente *Aqglu1*, estejam suprimindo a falta de transcritos *Aqglu3*. Tal fato permite que a digestão de sacarose, mesmo que em níveis menores continue ocorrendo, possibilitando, assim, que os mosquitos não morram tão rápido quanto se esperava. De um modo geral, os dados sugerem que o silenciamento das  $\alpha$ -glicosidases exerce um efeito deletério para as fêmeas, sugerindo que estes genes possam vir a ser utilizados como alvos a inseticidas para o controle destes mosquitos.

Além disso, foi mostrado que o desenvolvimento dos adultos na ausência de sacarose causa um efeito esterilizante nestes insetos. Uma poderosa alternativa aos inseticidas químicos, a técnica de insetos estéreis (SIT, do inglês *Sterile Insect Technique*) (Knipling, 1959), é uma potente estratégia de controle genético de amplo alcance, baseada na produção e liberação massiva de centenas de milhões de insetos estéreis para acasalar com a população selvagem. Este processo inibe a geração de prole, podendo

reduzir, e até mesmo eliminar determinadas populações de insetos, e sua eficácia foi demonstrada através da erradicação da mosca *Cochliomyia hominivorax*, dos Estados Unidos, México e toda a América Central (Krafsur et al., 1987; Lindquist et al., 1992). Desde então, SIT tem sido utilizada com sucesso no controle de outros insetos, incluindo *Ceratitidis capitata* (Robinson, 2002) e *Glossina austeni* (Vreysen et al., 2000).

Um dos problemas no desenvolvimento de programas envolvendo SIT é a produção em massa de insetos estéreis. Além disso, no caso da utilização de mosquitos, a liberação de fêmeas estéreis para a natureza deve ser extremamente evitada porque mesmo estéreis as fêmeas ainda são capazes de transmitir patógenos entre os hospedeiros humanos. Desta forma, machos e fêmeas devem ser separados, em um processo chamado sexagem para que apenas os machos venham a ser liberados para a natureza. O problema da sexagem parece ter sido resolvido, através da produção de uma linhagem de mosquitos transgênicos que expressa uma proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*), a partir do terceiro estágio larval, apenas em machos (Catteruccia et al., 2005). Desta forma, as larvas podem ser separadas de modo que as fêmeas são eliminadas e apenas os machos criados até a fase adulta. O outro problema, a produção em massa dos mosquitos estéreis, poderia ser resolvido através da construção de mosquitos transgênicos que produzam dsRNA específicos para  $\alpha$ -glicosidases. Transformações genéticas estáveis e herdáveis envolvendo a síntese de dsRNAs já foram previamente estabelecidas em *Drosophila* (Kennerdell e Carthew, 2000) e *Anopheles stephensi* (Brown et al., 2003). Desta forma, uma colônia transgênica que produza os dsRNAs específicos para os genes das  $\alpha$ -

glicosidasas poderia ser mantida no laboratório com glicose e frutose, e os machos destinados à liberação seriam mantidos sem açúcar após a emergência. Com isto, a possibilidade de que estes insetos se alimentem de soluções açucaradas após sua liberação na natureza não causaria efeito na fertilidade dos machos estéreis, uma vez que eles não poderiam digerir os açúcares ingeridos. No entanto, os efeitos da ausência de sacarose, bem como do silenciamento gênico das  $\alpha$ -glicosidasas sobre a fertilidade destes mosquitos devem ser estudados com mais detalhes.

Ainda neste raciocínio, segundo Benedict e Robinson (2003), os primeiros testes envolvendo a liberação de mosquitos transgênicos para a natureza, no intuito do bloqueio da transmissão da malária, deveriam ocorrer com insetos estéreis. Desta forma, a produção de insetos estéreis, através das técnicas citadas no parágrafo anterior, poderia ser uma ferramenta a ser utilizada juntamente com os testes de liberação dos primeiros transgênicos refratários ao *Plasmodium*.

A realização deste trabalho visava a geração de informações sobre a fisiologia básica dos mosquitos vetores, através da elucidação do processo de digestão de açúcares pelos mosquitos. Além disso, era de interesse comprovar a importância de uma refeição açucarada para estes insetos, destacando o potencial das  $\alpha$ -glicosidasas como alvo a inseticidas. Os dados apresentados abrem novas perspectivas e campos de trabalhos relacionados com a fisiologia da digestão em mosquitos, seja no âmbito da pesquisa básica, ou na utilização das enzimas relacionadas como alvo para o controle destes mosquitos vetores.

## 6. Conclusões

---

A sacarose é uma substância essencial para as fêmeas de *Anopheles aquasalis*, haja vista que a ausência desta substância na dieta reduziu drasticamente o tempo de vida destes insetos, bem como a postura e taxa de eclosão.

Três diferentes  $\alpha$ -glicosidases foram encontradas no intestino médio das fêmeas de *Anopheles aquasalis*. Isto foi sugerido pela caracterização bioquímica e comprovado pela identificação dos três fragmentos codificantes para  $\alpha$ -glicosidases.

A digestão de sacarose, bem como a síntese das  $\alpha$ -glicosidases ocorre no intestino médio. Tal fato pôde ser comprovado através da detecção de  $\alpha$ -glicosidases e transcritos codificantes para  $\alpha$ -glicosidases nos tecidos epiteliais do intestino médio.

Apesar de não influenciar consideravelmente a ativação das  $\alpha$ -glicosidases no intestino médio, a sacarose promove um aumento na expressão dos genes *Aqglu1* e *Aqglu3* após ser ingerida.

O padrão da expressão gênica de *Aqglu1* e *Aqglu3* em fêmeas alimentadas com sacarose difere um do outro. *Aqglu1* é expresso principalmente no intestino médio-anterior, e parece estar envolvido preferencialmente com a digestão de sacarose, ao passo que *Aqglu3* é expresso principalmente no intestino médio-posterior, podendo estar envolvido,

além da digestão de sacarose, com a digestão de açúcares durante a alimentação sanguínea.

As  $\alpha$ -glicosidases exercem um papel importante na fisiologia das fêmeas de *Anopheles aquasalis*, uma vez que o silenciamento do gene *Aqglu3* provocou uma diminuição na sobrevivência destes mosquitos.

## 7. Referências

---

- ATKINSON, P. W. (2005) Green light for mosquito control. **Nature Biotech.** 11, 1371-1372.
- BARTZ, E., JACKSON, A. L. (2005) How will RNAi facilitate drug development? **Sci. STKE.** 2005, pe39.
- BAUER, P., RUDIN, W., HECKER, H. (1977) Ultrastructural changes in midgut cells of female *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) after starvation or sugar diet. **Cell tiss. Res.** 177, 215-219.
- BAULCOMBE, D. (2004) RNA silencing in plants. **Nature.** 431, 356-363.
- BEIER, J. C. (1996) Frequent blood-feeding and restrictive sugar-feeding behavior enhance the malaria vector potential of *Anopheles gambiae* s.l. and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **J. Med Entomol.** 33, 613-668.
- BENEDICT, M. Q., ROBINSON, A. S. (2003) The first release of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **T. Parasitology.** 19, 349-355.
- BILLINGSLEY, P. F., HECKER, H. (1991) Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera:Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidases and  $\alpha$ -glucosidase in the midgut. **J. Med. Entomol.** 28, 865-871.
- BILLINGSLEY, P. F., LEHANE, M. J. (1996) Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Lehane M J, Billingsley P F (eds). **Biology of the insect midgut.** 1<sup>st</sup> edition. London: Chapman & Hall, 86-114.
- BRIEGEL, H., LEA, A. O. (1975) Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. **J. Insect Physiol.** 21, 1597-1604.

- BROWN, A. E., BUGEON, L., CRISANTI, A., CATTERUCCIA, F. (2003) Stable and heritable gene silencing in the malaria vector *Anopheles stephensi*. **Nuc. Ac. Res.** 31, 1-6.
- CAMERON, M. M., MILLIGAN, P. M. J., LLANOS-CUENTAS, A., DAVIS, C. R. (1995) An association between phlebotomine sandflies and aphids in the Peruvian Andes. **Med. Vet. Entomol.** 9, 127-132.
- CAROCCI, A. S. (2001) Enzimas digestivas em anofelinos brasileiros vetores de malária. Dissertação de mestrado. Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo. 63p.
- CATTERUCCIA, F., BENTON, J. P., CRISANTI, A. (2005) An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. **Nature Biotech.** 11, 1414-1417.
- CELOTTO, A. M., GRAVELEY, B. R. (2002) Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. **RNA.** 8, 718-724.
- CHIBA, S. (1997) Molecular mechanism in  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 61, 1233-1239.
- CLEMENTS, A. N. (1992) The biology of mosquitoes. **Development, nutrition and reproduction**, vol 1. Chapman & Hall, London, 532 p.
- CONSOLI R. A. G. B., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. L. (1997) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 2.<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 55, 226p.
- COOPER, P. D., VULCANO, R. (1996). Regulation of pH in the digestive system of the cricket, *Teleogryllus commodus* walker. **J. Insect Phys.** 43, 495-499.

- DALY, H. V., DOYEN, J. T., PURCELL III, A. H. (1998) Introduction to insect biology and diversity. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press, Oxford, 680p.
- DARBOUX, I., NIELSEN-LEROUX, C., JEAN-FRANÇOIS C., PAURON, D. (2001) The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 31, 981-990.
- DAY, J. F., EDMAN, J. D., SCOTT, T. W. (1994) Reproductive fitness and survivorship of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) maintained on blood, with field observations from Thailand. **J. Med. Entomol.** 31, 611-617.
- DILLON, R. J., EI KORDY, E. (1997) Carbohydrate digestion in sandflies:  $\alpha$ -glucosidase activity in the midgut of *Phlebotomus langeroni*. **Comp. Biochem. Physiol.** 116B, 35-40.
- DIXON, M., WEBB, E. C. (1979) Enzymes, third ed. Academic Press, New York.
- DYKXHOORN, D. M., NOVENA, C. D., SHARP, P. A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. **Nature Mol. Cell Biol.** 4, 457-467.
- ELIASON, D. A. (1963) Feeding adult mosquitoes on solid sugars. **Nature.** 200, 289.
- FIRE A., XU S., MONTGOMERY M. K., KOSTAS S. A., DRIVER S.E., MELLO C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature.** 391, 806-811.
- FORATTINI, O. P. (1973) Entomologia Médica. Vol. 4. Editora USP, São Paulo, 658p.

- FORATTINI, O. P. (2002) *Culicidologia Médica*. Vol 2. Editora USP, São Paulo, 860p.
- FOSTER, A. W. (1995) Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. **Annu. Rev. Entomol.** 40, 433-474.
- GARY JR, R. E., FOSTER, W. A. (2001) Effects of available sugar on the reproductive fitness and vectorial capacity of the malaria vector *Anopheles gambiae*. **J. Med. Entomol.** 38, 22-28.
- GILLIES, M. T. (1968) Journal of meetings. **Proc. R. Entomol. Soc. Lond.** 33, 27-27.
- GONTIJO, N. F., ALMEIDA-SILVA, S., COSTA, F. F., MARES-GUIA, M. L. (1998) *Lutzomyia longipalpis*: pH in the gut, digestive glycosidases, and some speculations upon *Leishmania* development. **Exp. Parasitol.** 90, 212-219.
- GRAF, R., BRIEGEL, H. (1989) The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and “in vivo” simulation in isolated midguts. **Insect Biochem.** 19, 129-137.
- GRIMSTAD, P. R., DeFOLIART, G. R. (1974) Nectar sources of Wisconsin mosquitoes. **J. Med. Entomol.** 11, 331-341.
- HEMINGWAY, J., CRAIG, A. (2004) New ways to control malaria. **Science.** 303, 1984-1985.
- HOLT, R. A., SUBRAMANIAN, G. M., HALPERN, A., SUTON, G. G., CHARLAB, R., NUSSKERN, D. R., WINCKER, P., CLARCK, A. G., RIBEIRO, J. M., WIDES, R., ET AL. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science.** 298, 129-149.

- HUNTER, D M (1977) Sugar-feeding in some Queensland black flies. **J. Med. Entomol.** 14, 229-232.
- JACOBSON, R. L., SCHLEIN, Y. (2001) *Phlebotomus papatasi* and *Leishmania major* parasites express  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. **Acta Tropica.** 78, 41-49.
- JAMES, A. A., BLACKMER, K., RACIOPPI, J. V. (1989) A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Gene.** 75, 78-83.
- JAMNBACK, H. (1961) Observations on *Culicoides obsoletus* (Meigen) in the laboratory (Diptera: Ceratopogonidae). **Mosq. News.** 21, 48-53.
- KEENE, K. M., FOY, B. D., SANCHEZ-VARGAS, I., BEATY, B. J., BLAIR, C. D., OLSON, K. E. (2004) RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. **PNAS.** 101, 17240-17245.
- KENDI, O., CAROCI, A., RIBOLLA, P., MARINOTTI, O., deBIANCHI, A. G., BIJOVSKY, A. T. (2005) Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. **J. insect Physiol.** 51, 769-776.
- KENNERDELL, J. R., CARTHEW, R. W. (2000) Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. **Nature Biotechnol.** 17, 896-898.
- KILLICK-KENDRICK, R., KILLICK-KENDRICK, M. (1987) Honeydew of aphid as a source of sugar for *Phlebotomus ariasi*. **Med. Vet. Entomol.** 1, 297-302.
- KNIPLING, E. F. (1959) Esterile-male method of population control. **Science.** 130, 902-904.

- KRAFSUR, E. S., WHITTEN, C. J., NOVJ, J. E. (1987) Screwworm eradication in North and Central America. **Parasitol. Today.** 3, 131-137.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227, 680-685.
- LI, H., LI, W. X., DING, S. W. (2002) Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. **Science.** 296, 1319-132.
- LINDQUIST, D. A., ABUSOWA, M., HALL, J. R. (1992) The New World screwworm fly in Lybia: a review of its introduction and eradication. **Med. Vet. Entomol.** 6, 2-8.
- MAGNARELLI, L. A. (1978) Nectar-feeding by female mosquitoes and its relation to follicular development and parity. **J. Med. Entomol.** 14, 527-530.
- MARINOTTI, O., JAMES, A. A. (1990) An  $\alpha$ -glucosidase in the salivary gland of the vector mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem.** 20, 619-623.
- MARINOTTI, O., JAMES, A. A., RIBEIRO, J. M. C. (1990) Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquitoes. **J. Insect Physiol.** 36, 545-548.
- MARINOTTI, O., BRITO, M., MOREIRA, C. K. (1996) Apyrase  $\alpha$ -glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 113B, 657-679.
- MATHESON, R. (1932) Medical entomology. 1<sup>st</sup> edition. USA: Charles & Thomas, 489p.
- McCRAE, A. W. R. (1989) Differences in sugar feeding activity between tropical and temperate mosquitoes: field observations and their implications. **Vector Ecol. Newsl.** 20, 16.

- MEHRANI, H., STOREY, K. B. (1993) Characterization of  $\alpha$ -glucosidase from rainbow trout liver. **Arch. Biochem. Biophysics**. 306, 188-194.
- MOREIRA-FERRO, C. K., MARINOTTI, O., BIJOVSKY, A. T. (1999) Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*. **Tissue Cell**. 31, 264-73.
- MUIRHEAD-THOMSON, R. C. (1951) Mosquito behavior in relation to malaria transmission and control in the tropics. E. Arnold, London.
- NAYAR, J. K., SAUERMAN, D. M. (1971) Physiological effects of carbohydrates on survival, metabolism, and flight potential of female *Aedes taeniorhynchus*. **J. Insect. Physiol.** 17, 2221-2233.
- NORIEGA, F. G., WELLS, M. A. (1999) A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. **J. Insect Physiol.** 45, 613-620.
- NOVINA, C. D., SHARP, P. A. (2004) The RNAi revolution. **Nature**. 430, 161-164.
- OHASHI, K., SAWATA, M., TAKEUCHI, H., NATORI, S., KUBO, T. (1996) Molecular cloning of cDNA and analysis of expression of the gene for  $\alpha$ -glucosidase from the hypopharyngeal gland of the honeybee *Apis mellifera* L. **Biochem. Biophys. Research Communic.** 221, 380-385.
- OSTA, M. A., CHRISTOPHIDES, G. K., KAFATOS, F. C. (2004) Effects of mosquito genes on Plasmodium development. **Science**. 303, 2030-2032.
- PFAFFL, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nuc. Ac. Res.** 29, 2003-2007.

- RACIOPPI, J. V., HAGEDORN H. H., CALVO, J. M. (1984) Physiological mechanisms controlling the reproductive cycle of the mosquito *Aedes aegypti*. In **Advances in invertebrate Reproduction** (Engles W. et al., eds), Vol. 3, pp259-265. Elsevier, Amsterdam.
- ROBINSON, A. S. (2002) Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. **Genetica**. 116, 5-13.
- ROMOSER, W. S. (1996) The vector alimentary system. In: Beaty, B. J., Marquardt, W. C. (Eds) **The Biology of Disease Vectors**. 1<sup>st</sup> edition. Colorado: Colorado University.
- RUDIN, W., HECKER, H. (1976) Morphometric comparison of the midgut epithelial cells in male and female *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera). **Tissue and Cell**. 8, 459-470.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E. F., MANIATS, T. (1989) **Molecular Cloning: a laboratory manual**, vol. 3. 2.<sup>a</sup> edição. Nova York: Cold Spring Harbor.
- SANCHEZ-VARGAS, I., TRAVANTY, E. A., KEENE, K. M., FRANZ, A. W., BEATY, B. J., BLAIR, C. D., OLSON, K. E. (2004) RNA interference, arthropod-borne viruses and, mosquitoes. **Virus Res**. 102, 65-74.
- SCHAEFER, C. H., MIURA, T. (1972) Sources of energy utilized by natural populations of the mosquito, *Culex tarsalis*, of overwintering. **J. Insect Physiol**. 18, 797-805.
- SCHLEIN, Y., JACOBSON, R. L. (1994) Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by plant feeding of the sand flies. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 50, 20-27.

- SCHLEIN, Y., MULLER, G. (1995) Assessment of plant tissue feeding by sand flies (Diptera: Psychodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) **J. Med. Entomol.** 32, 882-887.
- SCHLEIN, Y., YUVAL., B. (1987) Leishmaniasis in the Jordan Valley. IV: Attraction of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to plants in the field. **J. Med. Entomol.** 24, 87-90.
- SILVA, C. P., TERRA, W. R. (1995) An  $\alpha$ -glucosidase from the perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. Purification and properties. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 25, 487-494.
- SILVA-FILHA, M. H., NIELSEN-LeROUX, C., JEAN-FRANÇOIS C. (1999) Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.** 29, 711-721.
- SINGH, N., PREISER, P., RENIA, L., BALU, B., BARNWELL, J., BLAIR, P., JARRA, W., VOZA, T., LANDAU, I., ADAMS, J. H. (2004) Conservation and developmental control of alternative splicing in maebl among malaria parasites. **J. Mol. Biol.** 343, 589-599.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. (1991) **Plant Physiology**. Benjamin-Cummings, Redwood City, CA.

TERRA, W. R., REGEL, R. (1995) pH buffering in *Musca domestica* midguts.

**Comparative Biochemistry and Physiology.** 112A, 559-564.

TERRA, W. R., FERREIRA, C., DE BIANCHI, A. G. (1979) Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Thynchosciara* and its physiological significance. **J. Insect Physiol.** 25, 487-494.

TERRA, W. R., FERREIRA, C., JORDÃO, B. P., DILLON, R. J. (1996) Digestive Enzymes. In: Lehane, M. J., Billingsley, P. F. (Eds) **Biology of the insect midgut.** 1<sup>st</sup> edition. London: Chapman & Hall.

TRAVANTY, E. M., ADELMAN, Z. N., FRANZ, A. W. E., KEENE, K. M., BEATY, B. J., BLAIR, C. D., JAMES, A. A., OLSON, K. E. (2004) Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Molec. Biol.** 34, 607-613.

VAN HANDEL, E. (1965) The obese mosquito. **J. Physiol.** 181, 478-486.

VAN HANDEL, E. (1984) Metabolism nutrients in the adult mosquito. **Mosquito News.** 44, 573-579.

VAN HANDEL, E., HEAGER, J. S., HANSEN, C. W. (1972) The sugars of some Florida nectars. **Amer. J. Bot.** 59, 1030-1032.

VOINNET, O. (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nat. Rev. Genet.** 6, 206-220.

VREYSEN, M. J. ET AL (2000) *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. **J. Econ. Entomol.** 93, 123-135.

YUVAL, B. (1992) The other habit-sugar feeding by mosquitoes. **Bull. Soc. For Vector Ecol.** 17, 150-156.

ZHENG, L., WHANG, L. H-S., KUMAR, V., KAFATOS, F. C. (1995) Two genes encoding midgut-specific maltase-like polypeptides from *Anopheles gambiae*. **Experimental Parasitology**. 81, 272-283.

**Páginas da internet:**

SVS/MS (2005) Situação das doenças transmissíveis no Brasil  
([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br))

WHO (1998) Fact sheet 117 ([www.who.int/inf-fs/en/fact117.html](http://www.who.int/inf-fs/en/fact117.html))

WHO (2005) World Malaria Report

(<http://rbm.who.int/wmr2005/html/introduction.html>)