

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO E SILENCIAMENTO DE GENES
DO TRATO DIGESTIVO DE *Anopheles aquasalis***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista
Júlio Mesquita Filho para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

**Aluna: Bianca Cechetto Carlos
Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla**

BOTUCATU

2008

"Quando você tem uma meta, o que era um obstáculo passa a ser uma das etapas do seu plano."

Gerhard Erich Boehme

"Mau será o dia do homem quando ele se tornar absolutamente satisfeito com a vida que está levando, quando não estiver mais eternamente batendo nas portas de sua alma um enorme desejo de fazer algo maior."

Phillips Brooks

"Não diga a Deus que você tem um grande problema; diga ao problema que você tem um grande Deus."

Desconhecido

"Nada beneficiará mais a saúde da humanidade e aumentará as chances de sobrevivência da vida na Terra quanto a dieta vegetariana."

Albert Einstein

Agradecimientos

Agradeço imensamente à Bondade de Deus e Jesus pela bênção da vida e pelas oportunidades de progresso. Por nos mostrar o caminho do crescimento, oferecendo não apenas os meios, mas também nos privilegiando com a presença de pessoas maravilhosas em nossas caminhadas. Pessoas que educam e dão exemplo; que criticam e admiram; que discutem e aprimoram uma idéia; que escutam e se solidarizam; que riem e choram junto; que te aconselham e ajudam; que erram, ensinam e aprendem também; que brincam e divertem; que te procuram e te fazem sentir especial; que oram e sentem saudades; que abraçam e beijam; que compreendem e acariciam; que convivem e amam.

Se em minha vida sou grata por conhecer essa diversidade de pessoas, à minha família sou eternamente grata! Pois só nela já pude encontrar tudo isso e formar daí uma base sólida para seguir em frente. E na ausência desta, pela distância, Deus me ofereceu os melhores amigos e companheiros que jamais poderia imaginar, presenteando-me com novas famílias! E eu amo todas elas!!!

À minha família de sangue: minha mãe Eliana, meu pai Edson, meu irmão Geyson, vovó Mafalda, vovô Hélio, tia Elida, tia Elaine; “agregados”, Luciana, Paulo, Graça e Selí, todos parentes de São Paulo, que apesar do pouco contato guardo um imenso carinho.

À minha família religiosa, frequentadores da Casa do Caminho em Ibiúna, em especial: Dr. Resende, Dona Darci, Jacqueline, Rubens, Cleide, Dr. Maurício, D. Valéria, Cida, Zé e Rose.

À minha família acadêmica, às meninas da República: Negin, Dollý, Baba, Cláudia, Juliana, e antigas moradoras, Gulosa, Marofa, Nádia, Gardy, Pitiça, Dimas e Carol. Ao pessoal do Entomolab: Karina Paduan, Aline, Neto, Leticiona, Diego, Leticinha, Soneca, Alberto, Márcia, Sandra, Élen e Jayme, este que praticamente me coorientou em grande parte dos experimentos e me ensinou muito. Aos amigos dos outros laboratórios: Karina Santos (irmã do coração), Bruninha querida, Betina, Nelson, César, Aruaque, Giane, Fabiana, Samir, Gabriel, Eriquinha, Ericona, Satie. A todos os professores, em especial à Lúcia Helena, minha primeira orientadora, Newton Madeira, que me recebeu primeiramente no Depto, e a Paulo Ribolla, atual orientador, que já me “atura” há mais de 4 anos e meio com paciência e atenção, sempre oferecendo-nos muita liberdade para o desenvolvimento de nossos trabalhos! Também a todos os funcionários queridos: Nilza, Valdir, Bicho, Márcia e à queridíssima Safete. Ao

peçoal da Graduação: Ana, Rosalva, Iolanda, Fátima e Cristiane. Ao pessoal da Pós-Graduação: Serginho, Luciene e Maria Helena. A Luis Gerônimo e Tancler do STI.

À minha outra família de companheiros queridos, uns ainda perto, outros distantes, porém sempre guardados com muito carinho no coração: André Silva, Emiliano Cisneros, Peres, Edi, Fernanda Dias, Mirela, Marcela Vieira, Natália Dinardo, Diego Villa Verde, Daniel Peter, Kiko, Carlo, Aline Fernandes, Any Carol Costa, Miriam e Edson Celestrino, Sueli, Luis Herman, Rafinha, e todos integrantes da turma XXXVIII da Bio Integral.

Agradeço também e muito à FAPESP pelo apoio financeiro.

Resumo

Estudos recentes vêm elucidando a importância de uma diversidade de proteínas do intestino médio de insetos vetores, tanto nos processos de digestão como em respostas imunológicas e interações parasita-hospedeiro. Este trabalho teve como objetivo analisar a expressão de genes do intestino médio de *Anopheles aquasalis*, um importante vetor de malária no Brasil, a partir de clones sequenciados de bibliotecas de cDNA de machos e fêmeas alimentados apenas com sacarose. Nas fêmeas, pôde-se notar a grande predominância de serino proteases, proteínas ligantes de quitina e fatores relacionados à imunidade. Os machos também apresentaram diversos peptídeos de defesa imune, porém apenas uma protease digestiva e uma glicosidase. Alguns genes foram selecionados das bibliotecas para estudo de suas expressões durante a vida de *An. aquasalis*. *Tripsina 1*, *peritrofina 1* e *quinurenina 3-monooxigenase* tiveram seus níveis de expressão aumentados 6h após a ingestão de sangue, analisados através de qRT-PCR. No entanto, o silenciamento desses genes não resultou em alterações na longevidade de fêmeas adulta. O gene da *serpina* foi expresso em todas as fases do desenvolvimento do mosquito, exceto em ovos; e o gene da *cecropina* foi expresso em trato digestivo e carcaça de machos e fêmeas, principalmente após alimentação de açúcar ou sangue. Considerando que a ingestão de alimentos é a principal porta de entrada a microorganismos durante a vida adulta destes mosquitos, a presença de diversos produtos antimicrobianos, bem como a precoce expressão de *peritrofina*, outra proteína relacionada com a proteção do trato digestivo, mostrou que *An. aquasalis* está bem preparado imunologicamente contra esses microorganismos. Esta proteção está envolvida com o hábito alimentar desta espécie e pode também estar associada à sua baixa capacidade vetorial com relação aos plasmódios.

Palavras chave: *Anopheles aquasalis*, biblioteca de cDNA, trato digestivo, malária, RNAi.

Abstract

The importance of midgut proteins of *Anopheles aquasalis* has been elucidated both in digestion process as in immune responses and parasite-host interactions. This project targeted to analyze the midgut genes expression from *An. aquasalis*, an important malaria vector in Brazil, selecting clones from midgut cDNA library of female and male mosquitoes fed only on sugar. Serine proteases were predominant in females besides chitin binding proteins and immunity factors. Male mosquitoes also showed immune defense peptides, however only one digestive protease and one glucosidase. Some genes were selected from these libraries to expression study during mosquito development stages. Trypsin 1, peritrophin 1 and kynurenine 3-monoxygenase expression were up regulated at the midgut 6h after blood feeding, analyzed by real time PCR. Nevertheless, the gene silencing did not change the survivorship of adult females. Serpin gene was expressed in all mosquito development stages but eggs; cecropin gene was expressed in midgut and carcass from male and female, mainly after sugar or blood feeding. Considering the alimentation is the main entrance way of pathogens, the presence of antimicrobial peptides as the early peritrophin expression showed that *An. aquasalis* is immunologically adapted against these microorganisms. This protection is involved in feeding behavior of this specie and can be also related to its low *Plasmodium* vector capacity.

Key words: *Anopheles aquasalis*, cDNA library, midgut, malaria, RNAi.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mosquitos como vetores de doenças – gênero <i>Anopheles</i>	2
1.2. Aspectos gerais da malária	3
1.3. Ciclo da malária	5
1.4. Importância do aparelho digestivo do mosquito	6
1.5. Sistema imune dos mosquitos	8
1.6. Estratégias de combate à malária	9
1.7. Estudos de silenciamento gênico	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Manutenção de <i>Anopheles aquasalis</i>	15
3.2. Obtenção dos tratos digestivos	15
3.3. Extração de RNA	16
3.4. Construção das Bibliotecas de cDNA	16
3.5. Análise dos fragmentos	17
3.6. Sequenciamento dos clones	17
3.7. Seleção dos clones para estudo de expressão gênica e silenciamento.....	18
3.8. Análise da expressão gênica durante os estágios de desenvolvimento do mosquito.....	19
3.9. PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	20
3.9.1. Tratamento com DNase	20
3.9.2. Transcrição Reversa	20
3.9.3. Reação de qRT-PCR	20
3.10. Síntese de RNA dupla fita	23

3.10.1. Inserção da sequência do promotor T7 aos fragmentos selecionados	23
3.10.2. Síntese de dsRNA	24
3.10.3. Microinjeção	25
3.11. Experimentos de Longevidade	25
3.12. Análises Estatísticas	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Biblioteca de cDNA	28
4.2. Análise da expressão dos genes alvo nos estágios de desenvolvimento dos mosquitos.....	35
4.2.1. Cecropina	36
4.2.2. Serpina	37
4.2.3. Tripsina	38
4.2.4. Peritrofina	39
4.2.5. Quinurenina 3-Monooxigenase	40
4.3. Síntese dos dsRNAs	41
4.4. Silenciamento por RNAi	43
4.5. Análise da longevidade	43
5. DISCUSSÃO	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7. BIBLIOGRAFIA	57

- Figura 1: Distribuição dos casos de malária no mundo no ano de 2004. Fonte: WHO, 2007.....4
- Figura 2: Áreas de risco de malária no mundo no ano de 2006. Fonte: WHO, 2007.....4
- Figura 3: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR dos clones selecionados da biblioteca de trato digestivo de fêmeas (A) e de machos (B) de *Anopheles aquasalis*. Colônias foram escolhidas ao acaso e foram submetidas à reação de PCR com os oligonucleotídeos M13F e M13R que flanqueiam o fragmento clonado dos plasmídeos como descrito em Material e Métodos. Em machos, a maioria das bandas apresentaram 500pb, em fêmeas, a menor banda do gel apresentou 550 pb. PM, padrão de tamanho molecular.....30
- Figura 4. Eletroforese em agarose dos produtos da PCR dos clones selecionados para a síntese de dsRNA, utilizando-se os oligonucleotídeos T7-M13 *forward* e *reverse*. Os clones inicialmente selecionados foram: Inibidor de Serino Protease (Ser) com 950 pb, Tripsina 1 (Trip) com 550 pb, Cecropina (Cec) com 850 pb, como mostra a figura A; e Quinurenina 3-monooxigenase (Quin) com 1200 pb e Peritrofina (Per) com 650 pb na figura B. PM, padrão de tamanho molecular.....41
- Figura 5. Eletroforese em agarose dos produtos da síntese do dsRNA dos clones de tripsina 1 (550 pb), cecropina (800 pb), serpina (950 pb), quinurenina 3-monooxigenase (1200 pb) e peritrofina (650 pb). PM, padrão de tamanho molecular.....42
- Gráfico 1: Distribuição funcional dos ESTs encontrados na Biblioteca de Trato Digestivo de Fêmeas, mostrando 41% dos transcritos com funções já identificadas, 39% identificadas como transcritos do gênero *Anopheles* de funções não conhecidas e 21% dos ESTs de baixa similaridade com as sequências do banco de dados do GenBank. Destacam-se nesta biblioteca transcritos relacionados com a digestão de proteínas e de função estrutural.....31
- Gráfico 2: Distribuição funcional dos ESTs encontrados na Biblioteca de Trato Digestivo de Machos, com 32% dos transcritos com funções já identificadas, 46% identificadas como transcritos do gênero *Anopheles* de funções não conhecidas e 23% dos ESTs de baixa similaridade com as sequências do banco de dados do GenBank. Destacam-se na biblioteca de machos transcritos relacionadas com metabolismo, imunidade e digestão de açúcar.....32

- Gráfico 3. Gráfico da expressão de Cecropina em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se CM água com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.....36
- Gráfico 4. Gráfico da expressão de Serpina em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se ovo com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.37
- Gráfico 5. Gráfico da expressão de Tripsina 1 em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se CM água com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.38
- Gráfico 6. Gráfico da expressão de Peritrofina em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se ovo com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.....39

Gráfico 7. Gráfico da expressão de quinurenina 3-monooxigenase em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se ovo com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.40

Gráfico 8. Expressão de quinurenina 3-monooxigenase em trato digestivo e carcaça de fêmeas de *An. aquasalis* após 4 dias da injeção de dsQuin e expressão relativa de tripsina1 em trato digestivo de fêmeas de *An. aquasalis* após 4 dias da injeção de dsTrip e 6 h após da alimentação sanguínea em fêmeas injetadas com dsTrip. Cada barra representa a média entre os três mosquitos das réplicas biológicas, e os erros das barras representam o desvio padrão.....44

Gráfico 9. Comparação do tempo de vida das fêmeas de *Anopheles aquasalis* entre os grupos que receberam injeção de dsRNA com os grupos controle PBS e Sem Injeção. O tempo foi dado em dias e a sobrevivência dada em porcentagem. A seta indica o dia em que os mosquitos receberam alimentação sanguínea. Os dados não revelaram nenhuma diferença estatisticamente significativa.....45

1. Introdução

1.1. Mosquitos como vetores de doenças – gênero *Anopheles*

Há aproximadamente dois séculos (1878), o médico escocês Patrick Manson descobriu que os insetos poderiam veicular parasitas, através da observação do desenvolvimento de filarias (*Wuchereria bancrofti*) no interior de mosquitos (*Culex pipiens quinquefasciatus*). Atualmente, sabe-se que os insetos são transmissores de uma variedade de patógenos, entre eles vírus, bactérias, vermes e protozoários.

Os mosquitos do gênero *Anopheles*, conhecidos popularmente como “mosquitos-prego” por pousarem perpendicularmente à superfície, são insetos de grande importância epidemiológica devido ao seu papel como vetores de doenças ao homem, como a filariose, mas principalmente a malária (Lozovei, 2001)

Esses insetos pertencem à ordem Díptera, subordem Nematóceras, família Culicidae, subfamília Anophelinae. Dentro do gênero *Anopheles* encontram-se três subgêneros, *Anopheles*, *Kertessia* e *Nyssorhynchus*, compreendendo um total de quase 500 espécies, sendo que 70 são vetores de doenças e aproximadamente 20 são importantes transmissoras de malária para o homem (Service, 1996).

Na América do Sul destacam-se como vetores as espécies *An. (A.) pseudopunctipennis* Theobald, 1901; *An. (A.) punctimacula* Dyar & Knab, 1906; *An. (N.) albimanus* Wiedemann, 1820; *An. (N.) albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878; *An. (N.) aquasalis* Curry, 1932; *An. (N.) darlingi* Root, 1926, também encontradas na América Central (AnoBase, 2008). No Brasil, *An. darlingi* é a espécie de maior importância epidemiológica pela sua abundância, ampla distribuição no território nacional, pelo seu alto grau de antropofilia e endofagia e pela sua capacidade de transmitir diferentes espécies de *Plasmodium*. Tem como criadouros preferenciais: água limpa, de baixo fluxo, quente e sombreada, situação muito frequente na Região Amazônica, área endêmica da doença (SVS/MS, 2007). Em outras regiões brasileiras encontram-se *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. marajoara*, entre outras espécies, consideradas como vetores secundários (Lozovei, 2001).

1.2. Aspectos gerais da malária

Em relação às doenças infecciosas transmitidas por insetos, a malária é responsável por 500 milhões de casos clínicos por ano, estimando-se 1,1 milhões de mortes anuais, sendo sem dúvida, a doença tropical causada por parasita mais importante do mundo, matando mais que qualquer outra doença infecciosa, exceto a tuberculose. Apesar do sucesso da erradicação da doença em diversos países, 40% da população mundial (Figuras 1 e 2) ainda habitam áreas de risco (WHO, 2007)

Os agentes causadores de malária são protozoários do gênero *Plasmodium*, pertencentes ao filo Apicomplexa (Rey, 2001). Existem quatro espécies que acometem o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo o *P. falciparum* o responsável pela doença mais severa, devido a sua capacidade de aderir ao epitélio dos capilares, podendo ocasionar falha renal aguda, malária cerebral e edema pulmonar. Os principais grupos de risco são pessoas não imunes, como crianças, viajantes, refugiados e também mulheres grávidas, cujos quadros de anemia severa podem culminar em morte (WHO, 2007).

No Brasil, a malária é considerada um grave problema de saúde pública, principalmente na região da Amazônia Legal, onde ocorrem aproximadamente 99,5% dos casos registrados no país. A alta incidência da malária e os efeitos debilitantes para as pessoas acometidas pela enfermidade nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, reduzem a capacidade produtiva da população e o crescimento econômico, influenciando, portanto no desenvolvimento da região (SVS/MS, 2007).

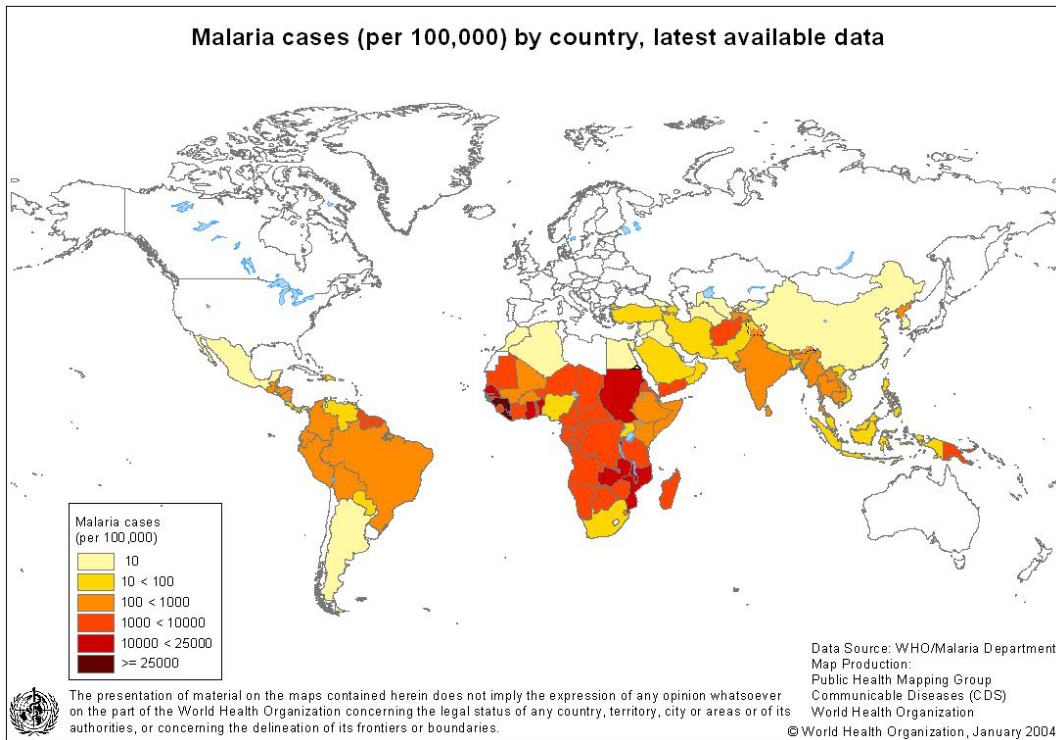


Figura 1. Distribuição dos casos de malária no mundo no ano de 2004. Fonte: WHO, 2007.

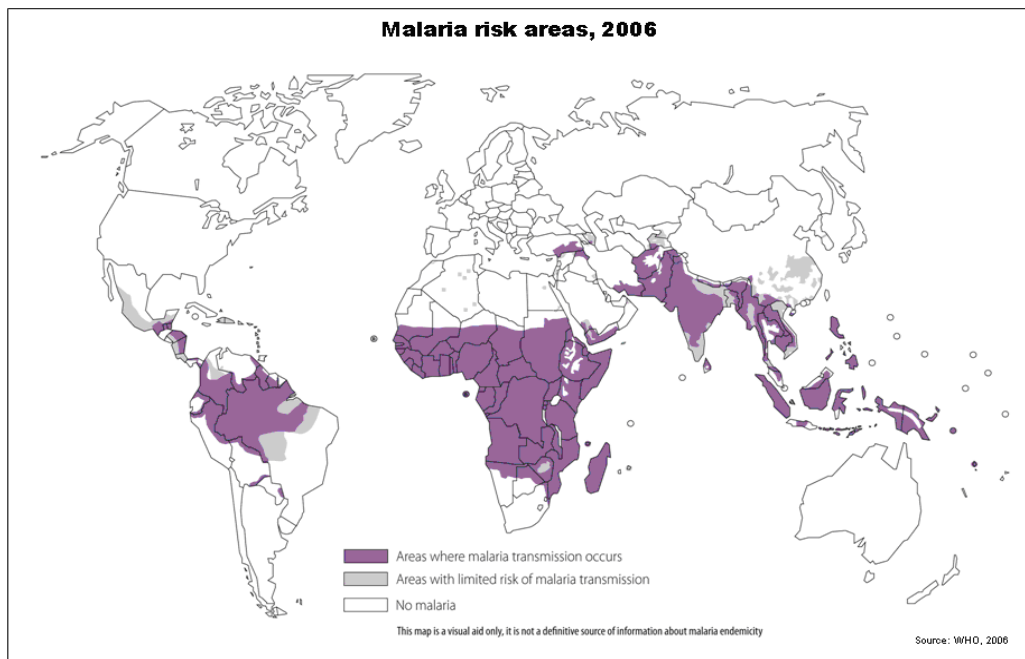


Figura 2. Áreas de risco de malária no mundo no ano de 2006. Fonte: WHO, 2007.

1.3. Ciclo da malária

Para que haja a capacidade de transmissão do patógeno pelo mosquito é necessário que este apresente hábito hematófago e que o agente etiológico encontre um ambiente favorável, que propicie o seu desenvolvimento no interior do hospedeiro vertebrado (Sinden, 1984).

O ciclo de vida do parasita se inicia quando o vetor suga o sangue de um hospedeiro infectado. Junto com o sangue, o mosquito ingere parasitas sob a forma de gametócitos masculinos e femininos. No lúmen do trato digestivo, os gametócitos se transformam em gametas, que se fertilizam e originam o zigoto que, por fim, gera uma forma livre natante denominada oocineto. Por volta de 18 a 24 horas após a ingestão do sangue pelo mosquito, esta forma do parasita penetra o epitélio do trato digestivo e se aloja entre o epitélio e a membrana basal, onde se desenvolve o oocisto. Após um período variável de alguns dias, dependendo da espécie de *Plasmodium* e de condições ambientais, o oocisto se rompe liberando milhares de esporozoítos na hemolinfa, os quais migram especificamente para as glândulas salivares, onde, em uma segunda picada, serão transmitidos para um novo hospedeiro (Sinden, 1984).

O ciclo da doença no hospedeiro vertebrado se inicia com a picada de uma fêmea de *Anopheles* infectada. Antes de sugar o sangue dos capilares, o mosquito injeta uma pequena quantidade de saliva anticoagulante cheia de formas infectantes do *Plasmodium* (são necessários apenas 10 para causar infecção). Em menos de meia hora após a inoculação, os esporozoítos chegam até o fígado, através da circulação e invadem os hepatócitos (ciclo pré-eritrocítico), onde se transformam em esquizontes, maiores e multinucleados, que se dividem por reprodução assexuada, gerando milhares de merozoítos. O ciclo pré-eritrocítico dura de seis (*P. falciparum*) a 16 dias, dependendo da espécie do *Plasmodium*. A célula hepática rompe-se liberando os merozoítos, muitos dos quais são fagocitados e destruídos pelas células de Kupffer. Os sobreviventes invadem as hemácias e dão início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios: o ciclo esquizogônico hemático ou ciclo eritrocítico. Nesta fase, ocorre a formação de trofozoítos, que crescem e

formam o esquizonte, que se divide e gera novos merozoítos. Estes, ao romperem as células, irão parasitar novas hemácias ou se diferenciar em gamontes ou gametócitos, que crescem de forma mais lenta e asseguram a continuidade do ciclo, podendo ser ingeridos pelo mosquito ao se alimentar de sangue (Rey, 2001).

Neste ciclo (eritrocítico), ao serem rompidas as células, além dos parasitas também são liberadas substâncias tóxicas na corrente, o que está diretamente relacionado com o ritmo das crises febris. Os intervalos são regulares e variam de acordo com a espécie do *Plasmodium*: 36 a 48 horas para *Plasmodium falciparum*, 48 horas para *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale* e 72 horas para *Plasmodium malariae* (Rey, 2001).

Dentro da hemácia, o *Plasmodium falciparum* produz proteínas (PfEMP1) que são transportadas para a membrana celular funcionando como adesinas, ligando-se a moléculas presentes na parede dos vasos sanguíneos, tornando mais lenta a circulação dos eritrócitos, evitando sua passagem pelo baço, onde as hemácias são destruídas. A causa da patologia da malária cerebral parece ser a oclusão do fluxo sanguíneo cerebral em microveias por essas células em roseta (Biggs et al., 1990; Pasloske & Howard, 1994; Baruch et al., 1996).

1.4. Importância do aparelho digestivo do mosquito

No trato digestivo do mosquito, as formas sexuais do parasita (micro e macrogametócitos) sofrem mudanças morfológicas que acarretam na fertilização. Dentre estas mudanças, o processo de exflagelação do microgametócito é induzido por alguns fatores presentes nesse órgão: a baixa de temperatura (de 37°C para 25°C), um aumento no pH e por uma substância denominada fator de exflagelação (Carter & Nijhout, 1977; Kawamoto et al., 1991; Martin et al., 1978; Nijhout, 1979; Nijhout & Carter, 1978; Sinden, 1983; Sinden & Croll, 1975). Estudos têm mostrado que o ácido xanturênico, um metabólito do triptofano, desempenha o referido papel de induzir a exflagelação do gametócito masculino (Garcia et al., 1998; Bhattacharyya & Kummar, 2001). Uma enzima envolvida na via de oxidação do triptofano é a quinurenina 3-monooxigenase, codificada pelo gene *cinnabar* (*cn*), cataliza a

hidroxilação da quinurenina em 3-hidroxiquinurenina, e também participa do catabolismo do triptofano e síntese de pigmentos dos omocromos dos mosquitos (Han et al., 2007).

A ingestão de alimento pela fêmea do mosquito induz a produção de enzimas digestivas, como glicosidases, tripsinas, quimiotripsinas, carboxipeptidases, aminopeptidases e outras serino proteases, sendo que as tripsinas são as principais serino proteases responsáveis pela digestão sanguínea em anofelinos (Billingsly & Hecker, 1991).

Além de enzimas, aproximadamente 1h após a alimentação pela fêmea ocorre a formação da matriz peritrófica tipo 1, um envoltório acelular, constituído de quitina, proteínas (como as peritrofinas) e proteoglicanos, que circunda o bolo alimentar proporcionando proteção química, mecânica e contra patógenos (Terra, 1996; Lehane, 1997; Tellam et al., 1998). Existem dois tipos de matriz peritrófica, a do tipo 1 é sintetizada por todas as células do epitélio do intestino médio, frequentemente induzida pela distensão do intestino causada pela ingestão de alimento, e usualmente encontrada em insetos hematófagos apesar de suas larvas apresentarem somente o tipo 2. A do tipo 2 é constitutivamente produzida por um pequeno órgão altamente especializado, denominado cárdia e forma um tubo que reveste toda extensão do trato digestivo (Terra, 1996; Lehane, 1997; Tellam et al., 1998).

Após a geração do oocineto (± 24 horas após a tomada do sangue), este necessita ultrapassar a matriz peritrófica e o epitélio digestivo para se alojar na membrana basal. Para o parasita transpô-la é necessária a ação de uma quitinase, que é secretada sob a forma de pró-quitinase pelo plasmódio e ativada pela ação de uma tripsina produzida pelo mosquito (Huber et al., 1991; Shahabuddin et al., 1993; Shahabuddin et al., 1995; Ramasamy et al., 1997). Sabe-se que a presença de anticorpos contra esta proteína do mosquito leva ao bloqueio da passagem do parasita pela matriz peritrófica. Os parasitas que não ultrapassarem esta barreira em até 30 horas, não são viáveis e acabam sendo digeridos pelas enzimas secretadas pelo mosquito (Shahabuddin et al., 1993).

1.5. Sistema imune dos mosquitos

Os insetos apresentam várias barreiras à infecção, sejam elas anatômicas como cutículas, processos fisiológicos como a formação de matriz peritrófica e síntese de proteases digestivas no intestino médio, ou ativação do sistema imune inato. Sabe-se que insetos vetores apresentam capacidade de defesa humoral e celular direcionada a alvos específicos de uma variedade de microorganismos e macroparasitas (Richman & Kafatos, 1995). Respostas celulares como fagocitose, encapsulação celular e indução de apoptose também podem ser iniciadas através de interações inseto-micróbio, como ocorre na resposta imune humoral (Horton & Ratcliffe, 2001; Michael & Kafatos, 2005).

A imunidade humoral dos mosquitos pode ser dividida em quatro etapas: reconhecimento de moléculas não-próprias através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs); modulação, que leva à amplificação e distribuição do sinal de reconhecimento; ativação de um conjunto de moléculas efetoras entre AMPs (peptídeos antimicrobianos) e cascatas de coagulação; e reabastecimento das moléculas de imunidade pela ativação das vias de transdução de sinal como *Toll* e *Imd* (Michael & Kafatos, 2005; Christophides et al., 2002).

PRRs reconhecem e se ligam a PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). Os PAMPs são compartilhados por vários microorganismos, são essenciais para a fisiologia do micróbio e ausentes na maioria dos organismos superiores. Como exemplo, podemos citar peptidoglicanos, lipopolissacarídeos (LPS), β -1,3glucanos, que são componentes das paredes e membranas dos micróbios. Os PRRs mais bem estudados são as proteínas que reconhecem peptidoglicanos (PGRPs) e proteínas que se ligam a bactérias (GNBPs), eles podem estar ligados às células ou circulantes na hemolinfa (Osta et al., 2004).

O reconhecimento do não-próprio ativa cascata proteolítica de serino proteases que amplificam o sinal e acionam a resposta efetora. Os componentes chave dessa cascata são serino proteases com domínio clip (CLIPs), que ativam as vias de sinalização que levam à síntese de AMPs,

aglutinação da hemolinfa e melanização (Osta et al., 2004; Michael & Kafatos, 2005).

Os sinais de amplificação por cascata de serino proteases estão sob a refinada regulação das serpinas, que inibem as serino proteases por atuarem como substrato suicida, se ligando covalentemente ao centro da enzima (Osta et al., 2004). Representam uma grande família de inibidores encontrada em todos os eucariontes superiores assim como em vírus, possuem uma enorme variedade de funções biológicas e podem ter localização intra e extracelular (Potempa et al., 1994; Michael & Kafatos, 2005).

A flexibilidade da imunidade inata em lidar com uma diversa gama de patógenos (Dong et al., 2006) vem se mostrando uma das grandes razões do sucesso evolutivo dos insetos como o grupo de animais terrestres mais rico em espécies (Osta et al., 2004).

1.6. Estratégias de combate a malária

Nas últimas décadas, novas estratégias de controle a malária têm se desenvolvido devido à emergência de parasitas resistentes a drogas assim como mosquitos resistentes a inseticidas. Um dos principais obstáculos no desenvolvimento de uma vacina efetiva é o polimorfismo genético de muitos dos genes, que poderiam ser candidatos promissores, em populações naturais dos parasitas devido à pressão de seleção imunológica (Riehle et al., 2003).

Duan *et al.* (2008) estudou a estrutura da população de genes que codificam o antígeno da membrana apical de *P. falciparum* (PfAMA1), criando uma vacina que combinasse a coleção de haplótipos ao redor do mundo. Seus resultados mostraram que foi possível induzir proteção contra parasitas que expressam os mesmos alelos ou alelos similares, sugerindo que a inclusão das sequências de cada uma das seis populações (haplótipos) pode resultar em uma vacina que induz imunidade protetora contra uma ampla variedade de parasitas da malária.

Vários alvos para vacinas estão testados atualmente, sejam na tentativa de impedir a transmissão da malária para o homem (alvos no ciclo hepático ou ciclo sanguíneo), ou mesmo bloquear a transmissão para o mosquito vetor

(Carter et al., 2000). Vacinas contra estágios infectantes do mosquito (TBVs – *transmission-blocking vaccines*) consistem de anticorpos que são ingeridos pelo mosquito com a alimentação sanguínea e interferem no desenvolvimento do parasita. Proteínas expressas na superfície dos gametas (Pfs47/48, Pfs230) e oocinetos (Pfs25, Pfs28) têm sido testadas para tais vacinas, que presumivelmente bloqueariam a invasão do oocineto no epitélio digestivo (Carter, 2001; Riehle et al., 2003).

A manipulação genética de bactérias comensais ou simbióticas para alterar a habilidade do hospedeiro em transmitir um patógeno também representa um meio alternativo de prevenção da doença, denominado paratransgene. Neste caso, bactérias seriam modificadas para expressar e secretar peptídeos ou proteínas que bloqueiam a invasão do parasita ou o matam no intestino médio (Yoshida et al., 2001).

Métodos de modificação genética de mosquitos também têm sido desenvolvidos, e genes efetores cujos produtos interferem no desenvolvimento do *Plasmodium* dentro do mosquito vêm sendo identificados (Riehle et al., 2003).

1.7. Estudos de silenciamento gênico

Uma das formas empregadas atualmente para se descobrir a funcionalidade de genes e sua importância, inclusive no controle de determinados patógenos, é através da técnica de silenciamento por RNAi ou RNAs interferentes (Brown & Catteruccia, 2006).

Descrita pela primeira vez por Fire e colaboradores (1998), os autores revelaram a redução específica da expressão de genes individuais por meio de microinjeção de fragmentos de RNA dupla fita (dsRNA - *double-stranded RNA*) correspondente em nematóides da espécie *Caenorhabditis elegans*.

Dentro da célula, o dsRNA é clivado por uma enzima RNase III (denominada Dicer) em pequenos fragmentos dupla fita de 21 a 23 nucleotídeos, sendo então, denominados de siRNAs (*small interfering RNAs*). Em *Drosophila* sp, a isoforma Dicer-2 forma um complexo com a proteína R2D2, que se associa estavelmente ao siRNA, direcionando-o ao RISC (*RNA induced silencing complex*). O siRNA será então reconhecido pelo RISC se

ligando a ele e formando um novo complexo, onde as fitas serão separadas e a fita *antisense*, utilizada como molde para o reconhecimento de mRNAs complementares. Após o reconhecimento, o RISC catalisa a degradação do mRNA alvo impedindo que essa informação seja traduzida no citoplasma da célula (Montgomery et al., 1998; Dykxhoorn, 2003; Liu et al., 2003; Meister & Tuschli, 2004).

A técnica de RNAi vêm sendo empregada para diversas finalidades, como estudos em células-tronco, supressão de genes como terapias para doenças humanas (Zou & Yoder, 2005), ou mesmo estudos do próprio mecanismo de silenciamento em diferentes organismos (Montgomery & Fire, 1998; Hoa et al., 2003; Brown et al., 2003).

2. Objetivos

O presente projeto teve como objetivo estudar a expressão de genes do trato digestivo de *An. aquasalis*, assim como verificar o efeito do silenciamento de genes na longevidade dos adultos.

Lembrando que o intestino médio é um órgão de extrema importância para o inseto, onde ocorrem processos de digestão de alimentos, resposta imune a patógenos e a maior parte do desenvolvimento do *Plasmodium* no interior do mosquito, este projeto se utilizou da construção de bibliotecas de cDNA de trato digestivo de fêmeas e machos de *An. aquasalis* como ferramenta para a seleção de genes a serem estudados mais aprofundadamente. Desta forma, pôde-se discutir sobre o perfil transcricional de cada sexo, assim como a importância de determinados genes para a espécie em questão.

3. Material e Métodos

3.1. Manutenção de *Anopheles aquasalis*

Larvas de *An. aquasalis* foram obtidas a partir de 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 Prof.^a Dr.^a Denise Valle. As larvas são mantidas em bandejas contendo água mineral e sal marinho a 0,2% (p/v), em insetário climatizado a 28 °C, com umidade relativa do ar em $80 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h, sendo alimentadas com ração para peixes Tetramin Pro[®] pulverizada em peneira para granulometria de 150 μm para L1 e 300 μm para as formas maiores. As pupas são 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 permanecem no interior de uma câmara de crescimento tipo BOD a 25 ± 5 °C, com umidade relativa em $85 \pm 5\%$. Para a coleta de ovos, as fêmeas são alimentadas com sangue em camundongos anestesiados. Após a oviposição, os ovos são 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. Obtenção dos tratos digestivos

Os órgãos do trato digestivo foram obtidos através da dissecação dos insetos com a utilização de lupa estereoscópica, após serem anestesiados a frio (4°C).

Os mosquitos foram colocados sobre solução de PBS no momento da dissecação para a manutenção das células intactas, e os tratos estocados em tubos eppendorf sobre nitrogênio líquido, e posteriormente, armazenados à – 70°C até a etapa de extração de RNA.

3.3. Extração do RNA

A extração do RNA foi realizada através do método TRIzol, utilizando-se para cada amostra 500 µl de TRIzol (GIBCO BRL) para romper células e liberar seu conteúdo. Após homogeneizar por 1 min em vortex, adicionou-se 200 µl de clorofórmio 100% gelado, homogeneizando-se vigorosamente por 15 seg. Após 5 min de incubação a temperatura ambiente (TA) a amostra foi centrifugada a 12000 g por 15 min a 4°C. A porção aquosa foi transferida a um novo tubo e a este, adicionados 500 µl de isopropanol 100% para a precipitação do RNA. Uma outra centrifugação foi realizada a 4°C por 8 min e todo sobrenadante resultante foi retirado para a lavagem do pellet com 1 ml de etanol 70%, centrifugando-se mais uma vez a 7500g por 8 min. Após a retirada do sobrenadante e do pellet já estar seco, este foi ressuscitado em 20 µl de água DEPC e deixado em “banho-maria” a 56°C por 10 min.

Em seguida, o produto da extração foi visualizado em gel de agarose 1%, e quantificados com o aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000). Todas as amostras foram armazenadas a -70°C até a sua utilização.

3.4. Construção das Bibliotecas

Para a construção das bibliotecas de cDNA, foram dissecados 210 mosquitos fêmeas e 225 machos ambos alimentados apenas com solução de sacarose, e as reações foram realizadas de acordo com o manual do kit **Creator™ SMART™ cDNA Library Construction** da BD Biosciences.

O referido kit utiliza um *primer* oligo(dT) modificado (CDSIII/3' PCR Primer) para iniciar a reação de síntese da primeira cadeia de cDNA; transcriptase reversa (RT), enzima que adiciona os nucleotídeos sequenciais, e com sua atividade transferase terminal, ao chegar na extremidade 5' do mRNA, um curto fragmento poliC é adicionado seguido de um sítio de restrição da enzima *Sfi* I (as *Sfi* I são enzimas de restrição assimétricas, a *Sfi* IA é inserida na extremidade 5' e a *Sfi* IB, na extremidade 3' da dupla fita de cDNA).

A dupla fita de cDNA foi então submetida a tratamento com proteinase K e, posteriormente, digerida com *Sfi* I.

A transformação e recombinação dos plasmídeos em *E. coli* foram feitas por eletroporação, com utilização de células eletrocompetentes e meio de cultura LB. O plaqueamento de uma parte da ligação foi realizado em placas de 90 mm de ágar LB, contendo 30 µg/ml de cloranfenicol, incubando-as a 37°C overnight. Ao restante da ligação adicionou-se glicerol para concentração final de 15% e as bactérias foram armazenadas a -70°C.

3.5. Análise dos fragmentos

A análise do tamanho dos insertos foi realizada por reação de polimerização em cadeia (PCR). As reações apresentavam um volume final de 25 µl contendo: Tris-HCl 10 mM pH 8.0, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, 0,1% de Triton X-100, 50% de glicerol (v/v), MgCl₂ 2 mM, de dNTPs 0,1 mM (PCR nucleotide mix Invitrogen Life Technologies), 10 pmoles dos oligonucleotídeos 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, parte da colônia é removida da placa com o auxílio de uma ponteira e colocada no interior do tubo de reação de PCR, realizada em termociclador Whatman Biometra® (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 3,5 min e um ciclo de 72°C por 5 min. O material amplificado foi analisado através de eletroforese em gel de agarose corados com brometo de etídeo (Figuras 3A e 3B) e os clones maiores que 500 pb foram selecionados para a etapa de sequenciamento.

3.6. Sequenciamento dos clones

Os produtos de PCR dos clones selecionados foram purificados através da ação da enzima ExoSAP-IT (USB). Para esta reação foram utilizados 2 µl

da enzima para cada 8 µl de amostra, incubados a 37°C por 1h e a 80°C por 20 min.

A reação de sequenciamento foi preparada para um volume final de 20 µl. Os reagentes foram utilizados nas seguintes proporções: 4 µl de 2,5x Save Money (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 4 µl BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 µmol do ONT M13 forward, e 4 µl do DNA e H₂O q.s.p.. As reações foram igualmente realizadas com termociclador Whatman Biometra® (T Gradient). Os ciclos de temperatura foram programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 4 min, com rampa de 1°C/seg.

Os produtos das reações de sequenciamento foram submetidos ao protocolo de precipitação alcoólica. Para cada amostra foram adicionados 80 µl de isopropanol 65% seguindo uma incubação por 20 min em TA. A seguir, foram centrifugadas a 2000 x g por 25 min a TA. O isopropanol foi removido por inversão, adicionando-se, em seguida, 200 µl de etanol 70% e centrifugando-se 5 min a 2.000 x g a TA. Todo o etanol é removido, uma vez que resíduos desta substância podem resultar em manchas fluorescentes, interferindo na leitura do gel. Em seguida, as amostras foram secas em TA e ressuspensas em 3 µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25 mM EDTA pH 8,0 contendo 50 mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação no gel, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 min e rapidamente transferidas para o gelo. As cromatografias de sequenciamento foram realizadas no Sequenciador ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems).

3.7. Seleção dos clones para estudo de expressão e silenciamento

Todas as sequências obtidas foram analisadas através do programa ClustalX (Thompson et al., 1997) para agrupar os transcritos iguais após a retirada dos amplificadores plasmidiais. Para a análise funcional dos mesmos, utilizou-se a ferramenta BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), comparando-se as sequências de nucleotídeos com o banco de dados de

proteínas da plataforma VectorBase (<http://www.vectorbase.org/Tools/BLAST/>) e NCBI.

Os transcritos foram classificados como supostos peptídeos ou proteínas relacionadas com: metabolismo, replicação/transcrição/tradução, mitocondrial/redox, citoesqueleto/estrutural, digestão de proteínas, digestão de açúcares, imunidade e ENSANGs para as proteínas já identificadas em *Anopheles gambiae*, porém sem descrição funcional (Tabelas 1 e 2, Gráficos 1 e 2). As demais sequências foram classificadas como desconhecidas.

A seleção dos clones, identificados através da etapa anterior, como alvos potenciais para o estudo da expressão e processo de *knock-down* foi feita de acordo com suas funções já descritas na literatura, e sua possível relevância na sobrevivência do mosquito e na interação vetor-parasita. Foram escolhidos inicialmente, portanto: cecropina, quinurenina 3-monooxigenase, peritrofina, tripsina1 e serpina.

3.8. Análise da Expressão Gênica durante os Estágios de Desenvolvimento do Mosquito

Para a análise da expressão de cecropina, serpina, tripsina1, peritrofina e quinurenina 3-monooxigenase, foram utilizados três grupos de: 50 ovos; 14 larvas (quatro L1, quatro L2, três L3 e três L4); 10 pupas; 10 mosquitos fêmeas com um a quatro dias de vida, mantidos apenas com água, 10 mantidas com açúcar e 10 mantidas com açúcar e que foram dissecadas 6h após a alimentação sanguínea; 10 machos mantidos com água e 10 machos mantidos com açúcar. Todos os adultos tiveram seus intestinos dissecados conforme descrito no item 3.2, também tendo sido analisadas as carcaças dos mesmos. Seguiu-se, portanto, as etapas de extração do RNA (item 3.3), visualização dos produtos através de gel de agarose 1%, e qRT-PCR (item seguinte 3.9).

3.9. PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

3.9.1. Tratamento do RNA com DNase

Em tubo eppendorf foram adicionados: 8 μ l do RNA total (aproximadamente 1 μ g), 1 μ l de Tampão de Reação 10X para DNase e 1 μ l de DNase e colocados a 37°C. Após 30 min de incubação, adicionou-se 1 μ l de EDTA 25 mM, e em seguida o tubo foi mantido a 65°C por 10 min e resfriado em gelo.

3.9.2. Transcrição Reversa

À reação anterior foi adicionado 1 μ l (0,5 μ g) de oligo dT e deixado a 70°C por 12 min. Em seguida, o tubo foi resfriado e a ele adicionados: 4 μ l de Tampão RevertAid 5X, 1 μ l de dNTP 10 mM, 1 μ l de Transcriptase Reversa RevertAid (40 U/ μ l) e 2 μ l de água DEPC. Após uma gentil homogeneização a reação foi incubada a 42°C por 60 min e inativada através de uma segunda incubação a 70°C por 15 min.

O produto da reação foi acondicionado a – 20°C até o momento de sua utilização para a PCR em Tempo Real.

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

A determinação da expressão dos genes escolhidos foi realizada através de reações em triplicatas (cada triplicata de reação representa uma das três réplicas biológicas, cada qual contendo o número de indivíduos como descrito no item 3.8 de acordo com a fase de desenvolvimento) em placas de 96 poços (Applied Biosystems). Cada reação contou com uma triplicata de controle negativo, constituída da mistura de reagentes e água. Para cada amostra foi preparado inicialmente uma mistura de reação em um volume final

de 30 µl, constituída de 5 µl do cDNA, 0,7 µl dos ONTs específicos para cada alvo a 10 µM para uma concentração final de 200 nM e 17,5 µl de SyBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Desse mix, 10 µl 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 construída para cada amostra.

Para se calcular a eficiência dos oligonucleotídeos, foram feitas quatro diluições das amostras de cDNA: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625. 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. Em alguns casos utilizamos Ct para definir o *crossing point*:

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

A eficiência dos ONTs foram calculadas para cada gene alvo através da fórmula acima.

As sequências dos oligonucleotídeos utilizadas foram as seguintes:

Oligonucleotídeo	Sequências 5' → 3'
Cecropina - F	ATGTGTTCAAAGCGGCCAAG
Cecropina - R	CGAGATGGCCGGTACTAAGG
Quinurenina 3-monooxigenase - F	CGGACGCGATCAATCTGATT
Quinurenina 3-monooxigenase - R	GACGTGATACGGTCGGCACT
Tripsina 1- F	AATCAGAAGCTGGTTGGCGT
Tripsina 1- R	CGAATCCAGTCACGAACGG
Peritrofina - F	GCTTGCCACTGCTGCATGT
Peritrofina - R	TGCTCCGGACAAACCTGTTC
Serpina - F	GAGCCTCAACCTGACCGAGA
Serpina - R	CGTCGTTAAGATCGAGCGAGA

A análise dos genes alvo foi realizada primeiramente em relação às intensidades de expressão de um gene endógeno, que codifica uma proteína ribossomal 49 de *An. aquasalis*. Neste caso, as reações de PCR foram realizadas com o par de ONTs RpaquaF (5' GTGAAGAAGCGGACGAAGAAGTT 3') e RpaquaR (5' TGCATCATCAGCACCTCCAGC3'), nas mesmas condições citadas anteriormente.

No entanto, devido à variação observada na expressão do gene ribossomal das amostras (Gráficos de Cálculo Relativo 3 a 7), considerando que o RNA das mesmas haviam sido quantificadas e normalizadas para a síntese de cDNA, desconfiou-se de que este não seria um bom gene endógeno. Portanto, os valores dos Cts de cada alvo foram recalculados por animal. Aos Cts obtidos de cada triplicata biológica foi somado o valor da

diferença entre log do número de animais por log da eficiência do primer (E), para subtrair o valor do Ct obtido devido ao número de indivíduos (considerando que a cada ciclo a concentração de amostra é aproximadamente dobrada, de acordo com o valor de E). Desta forma, obteve-se o Ct por animal para cada réplica.

Para cada gene estudado, uma amostra foi escolhida para a comparação de quantas vezes mais ou quantas vezes menos aquele gene era expresso (utilizou-se a média das triplicatas das amostras de ovo ou CM água). Essa diferença foi utilizada como expoente de 2. Dos valores resultantes foram calculadas as médias e desvios padrão das triplicatas, gerando os dados utilizados para a construção dos gráficos de Cálculo Absoluto 3 a 7, cujos resultados foram considerados mais confiáveis.

$$Ct/\text{indivíduo} = (Ct) + \frac{(\log N \text{ indivíduos})}{(\log E)}$$

$$D \text{ (diferença)} = (\text{Média Ct/indivíduo da triplicata da referência}) - (Ct/\text{indivíduo da réplica})$$

$$R \text{ (resultado)} = 2^D \rightarrow \text{para cada réplica}$$

$$M \text{ (Média)} = \frac{R1 + R2 + R3}{3} \rightarrow \text{valor utilizado para a construção dos gráficos}$$

3.10. Síntese de RNA dupla-fita

3.10.1. Inserção da sequência do promotor T7 aos fragmentos selecionados

Para realização desta etapa, foram sintetizados oligonucleotídeos com a mesma sequência M13, porém com a adição da sequência do promotor T7 na ponta 5' do primer forward (5' TAATACGACTCACTATAGGGGTAAAACGACGGCCAGGGCCAGT 3') e reverse (5' TAATACGACTCACTATAGGGAACAGCTATGACCATGTTTAC 3').

Da mesma forma que no item 3.5, as reações apresentaram um volume final de 25 µl contendo: Tris-HCl 10 mM pH 8.0, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, 0,1% de Triton X-100, 50% de glicerol (v/v), MgCl₂ 2 mM, de dNTPs 0,1 mM (PCR nucleotide mix Invitrogen Life Technologies), 10 pmoles dos oligonucleotídeos e 1,5U de Taq DNA polimerase (Biotools DNA polimerase). Após a adição de todos os componentes, parte da colônia escolhida foi removida da placa com o auxílio de uma ponteira e colocada no interior do tubo de reação de PCR, realizada em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient). Desta forma, a inserção da sequência do promotor foi realizada através da amplificação do fragmento por PCR, utilizando-se os seguintes ciclos: 94°C por 5 min, 6 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 3,5 min, e 35 ciclos de 94°C por 1 min e 69°C por 4,5 min, e extensão final de 5 min a 72°C.

Em seguida, o produto foi visualizado em gel de agarose 1% (Figura 4A e 4B).

3.10.2. Síntese dos dsRNAs

O produto da amplificação dos clones escolhidos com a utilização de oligonucleotídeos contendo a sequência do promotor T7 seguiu as etapas de síntese do dsRNA, de acordo com o protocolo do kit MEGAscript RNAi.

Para a reação de transcrição foram utilizados: 5 µl da reação de PCR; solução de ATP, CTP, GTP e UTP; tampão de reação T7 10X; mix da enzima T7 e H₂O.

Esses reagentes foram misturados e incubados a 37°C por 2 a 4h, dependendo do tamanho do inserto. Para garantir a hibridação das fitas de RNA, a mistura foi incubada a 75°C por 5 min, e deixada para resfriar a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita uma digestão com RNAase e DNAase I, incubando-se a 37°C por 1h.

A purificação do dsRNA foi efetuada através de colunas providas pelo kit, sendo o produto eluído com Tris-HCl 10 mM pH 7 e EDTA 1 mM, visualizado através de gel de agarose 1% (Figura 5) e quantificado com o aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000).

3.10.3. Micro-injeção

A microinjeção foi realizada intra-toraxicamente, através do aparelho Nanoject II Auto-Nanoliter Injector (Drummond Scientific).

Para o experimento de longevidade, foram injetados 69 nl de RNA dupla fita ou tampão fisiológico (PBS), misturados a uma solução de cor azul.

A adição do corante foi feita para a efetiva confirmação de que o dsRNA ou o PBS haviam sido de fato inoculados nos mosquitos. Para a diluição do corante (corante alimentício constituído de sacarose) foram utilizados 100 mg do mesmo por ml de PBS 1%. As soluções de dsRNA e PBS a serem injetadas foram diluídas com esse corante na proporção 1:1.

Outros dois experimentos de silenciamento também foram realizados. Concomitante ao experimento de longevidade, três réplicas de fêmeas adultas foram injetadas com dsTrip e dissecadas (um mosquito por réplica) seis horas após alimentação sanguínea, realizada pelas mesmas com 10 dias de vida (Gráfico 8). E por último, um experimento para verificar o silenciamento do gene da serpina utilizou-se de três réplicas de oito mosquitos fêmeas, com um a dois dias de vida. As injeções foram aplicadas da mesma maneira, porém sem a utilização do corante alimentício (Gráfico 8).

3.11. Experimentos de Longevidade

Foram utilizados mosquitos com dois ou três dias de vida para a injeção de dsRNA (Tripsina 1, Quinurenina 3-monooxigenase e Peritrofina) e PBS. Os sobreviventes da injeção foram separados em quatro gaiolas com 15 mosquitos fêmeas. Também foram separados em quatro gaiolas de 15 fêmeas como controle sem injeção (SI), porém, estes não foram utilizados para a reação qRT-PCR.

Quatro dias após a injeção um mosquito de cada gaiola teve seu trato digestivo dissecado (item 3.2 e 3.3 de Material e Métodos) para análise de expressão gênica por reação de PCR em tempo real. A quantificação absoluta dos genes alvo pós silenciamento (Gráfico 8) foi realizada através de reações em triplicatas (cada triplicata de reação representa uma de três réplicas

biológicas, cada qual contendo um mosquito) em placas de 96 poços (Applied Biosystems), da mesma forma como explicado no item 9.3. de Material e Métodos.

A alimentação sanguínea foi realizada com 10 dias de vida utilizando-se camundongos anestesiados, por um intervalo de tempo que fosse suficiente para que todas fêmeas se mostrassem ingurgitadas. Não foram colocados copos de postura devido à morte de mosquitos dentro desses copos, o que poderia prejudicar a análise da longevidade dos mesmos.

Todas as gaiolas receberam os mesmos tratamentos, permanecendo no interior de uma câmara de crescimento tipo BOD a 25 ± 5 °C, com umidade relativa em $80 \pm 5\%$, e disposição permanente de solução de sacarose e água. As gaiolas foram examinadas diariamente, retirando-se os insetos mortos até que não restasse mais nenhum.

Os dados da contagem do tempo de vida de cada mosquito foi analisada através do programa SigmaStat, que originou dados de tempo médio de vida entre as gaiolas de cada grupo experimental e criou um gráfico comparativo dos grupos injetados com os controles, fornecendo os valores P significativos, menores que 0,05. Para a criação desses gráficos, os dados de cada grupo (réplicas biológicas) tiveram que ser reunidos em uma única réplica, cuja média de tempo de vida coincidiu ou pouco variou entre as médias feitas entre as quatro gaiolas (Gráfico 9).

3.12. Análises estatísticas

Para comparar as diferenças entre os níveis de expressão gênica, foi utilizado o teste estatístico *One Way ANOVA*. Foram consideradas diferenças estatísticas significantes para $p < 0,001$. O Método de Fisher LSD foi utilizado para todos os procedimentos de comparação múltipla dois a dois. Os dados da análise de longevidade de *An. aquasalis* foram testados através do *Kaplan–Meier Survival Analysis: Log–Rank*.

4. Resultados

4.1 Biblioteca de cDNA

Aproximadamente 550 clones da biblioteca de expressão correspondente ao trato digestivo de fêmeas foram selecionados aleatoriamente para a análise do padrão de bandas através da reação de PCR e visualização em gel de agarose 1% (Figura 3A). O mesmo foi feito para a biblioteca de machos (Figura 3B), porém, esta se mostrou menos eficiente que a de fêmeas, pois a maioria dos clones apresentou tamanho de aproximadamente 500 pb. Dos 700 clones selecionados para a reação de PCR, apenas 136 (22,2%) apresentaram padrão de bandas maior que 500 pb (de 600 a 2100 pb) e foram estes, portanto, sequenciados. Foram obtidas 101 sequências de machos e 169 de fêmeas, sendo então divididas e classificadas de acordo com suas supostas funções.

Transcritos com função de replicação/transcrição/tradução do DNA estavam presentes equivalentemente em ambas as bibliotecas (seis transcritos em machos e oito em fêmeas), assim como os de atividade mitocondrial/redox (três transcritos em machos e oito em fêmeas). Os transcritos relacionados ao metabolismo mostraram-se mais abundantes nos machos, 13 transcritos (12,9%), que nas fêmeas, 11 transcritos (6,5%) como mostram os gráficos 1 e 2.

Apenas uma enzima envolvida na digestão de açúcares foi encontrada na biblioteca de machos. Esta enzima, uma alfa-glicosidase (EX809816), apresentou 74,6% de identidade com a *Agm2*, não tendo sido detectada na biblioteca de fêmeas.

Apesar da alimentação dos machos ser baseada em uma dieta de açúcar, uma suposta enzima envolvida na digestão de proteínas também foi encontrada, diferente do que foi descrito em um transcriptoma de *An. gambiae*, onde nenhuma enzima proteolítica se mostrou presente em machos (Warr et al., 2007). Esta protease teve 57,8% de identidade com o precursor da tripsina 2 (EX809822) de *An. gambiae* e apresentou sequência distinta de um clone para tripsina encontrada em fêmeas, cuja sequência foi similar à tripsina1.

Como já era de se esperar, as fêmeas por serem hematófagas, apresentaram 11,2% dos seus transcritos relacionados com a digestão de

proteínas, entre eles: quatro carboxipeptidases (EX809726 e EX809727), duas tripsinas (EX809761), uma quimiotripsina (EX809757) e 12 outras serino proteases agrupadas em três classes diferentes (EX809753, EX809754 e EX809756), provavelmente relacionadas com a digestão, porém não descartando a possibilidade de possuírem alguma ligação com o sistema de defesa do inseto. Outro grupo funcional de destaque nas fêmeas foi o estrutural (6,5%), não representado nos machos, e que justamente se mostrou intimamente associado com a formação da matriz peritrófica e, portanto, com o hábito hematófago das fêmeas. Neste grupo foram encontradas sete peritrofinas (EX809747, EX809744) e quatro *ICHIT* (EX809739), uma proteína com domínio de ligação a quitina (Dimopoulos et al., 1998). Transcritos relacionados com o sistema imune foram proporcionalmente mais abundantes nos machos (7,9%), representados por quatro cecropinas (EX809807), uma lisozima P (EX809815), uma galectina (EX809813), um peptidil-prolil cis-trans isomerase (EX809819) e uma serino protease (EX809821). Nas fêmeas foram encontradas cinco cecropinas (EX809728), uma gambicina (EX809738), uma serpina (EX809758), uma serino protease (EX809755) e uma proteína denominada *Niemann-Pick type C2* (EX809745), ligante de colesterol que aparenta possuir um domínio de reconhecimento de produtos relacionados à patógenos (VectorBase, 2008), totalizando 5,9% (Gráficos 1 e 2).

Dentre um total de 60,3% de sequências de função desconhecida em fêmeas, 21,3% apresentaram baixa similaridade com transcritos do GENBANK (score < 100 ou valor E maior que 0,05) sendo agrupados, portanto, como desconhecidos, e os outros 39% foram classificadas como *ENSANGs*, representando sequências já identificadas no genoma de *An. gambiae*, porém também de função desconhecida. Em machos, dentro do total de 68,3%, obteve-se 45,5% de *ENSANGs* e 22,8% de desconhecidos (Gráficos 1 e 2). Apenas um dos *ENSANGs* (EX809731), esteve presente em ambas as bibliotecas e com alto nível de expressão, 47 clones em fêmeas e 27 em machos. Apenas uma proteína desconhecida (EX809776) também foi encontrada em ambos os sexos em duplicata.

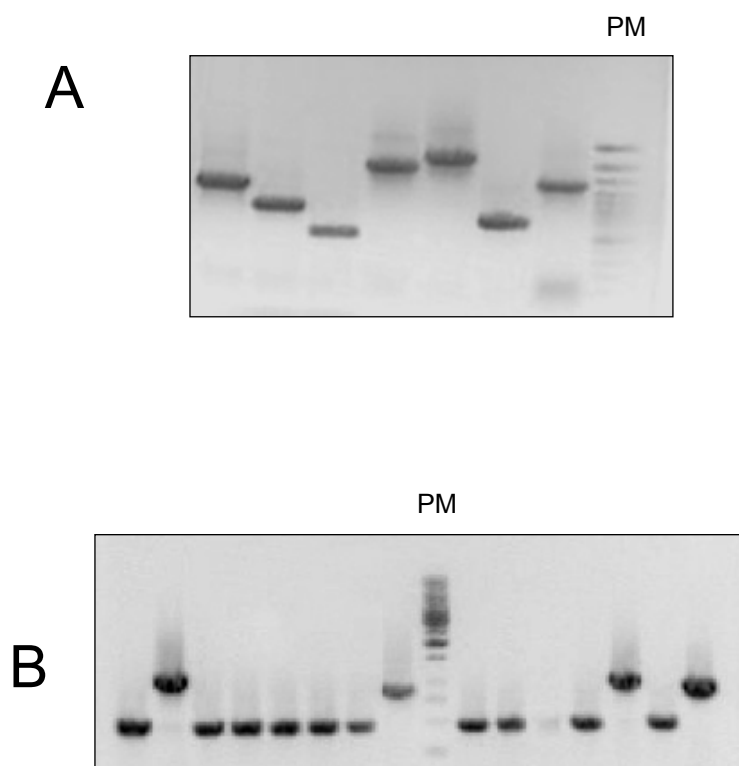


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR dos clones selecionados da biblioteca de trato digestivo de fêmeas (A) e de machos (B) de *Anopheles aquasalis*.

Colônias foram escolhidas ao acaso e foram submetidas à reação de PCR com os oligonucleotídeos M13F e M13R que flanqueiam o fragmento clonado dos plasmídeos como descrito em Material e Métodos. Em machos, a maioria das bandas apresentaram 500pb; em fêmeas, a menor banda do gel apresentou 550 pb. PM, padrão de tamanho molecular.

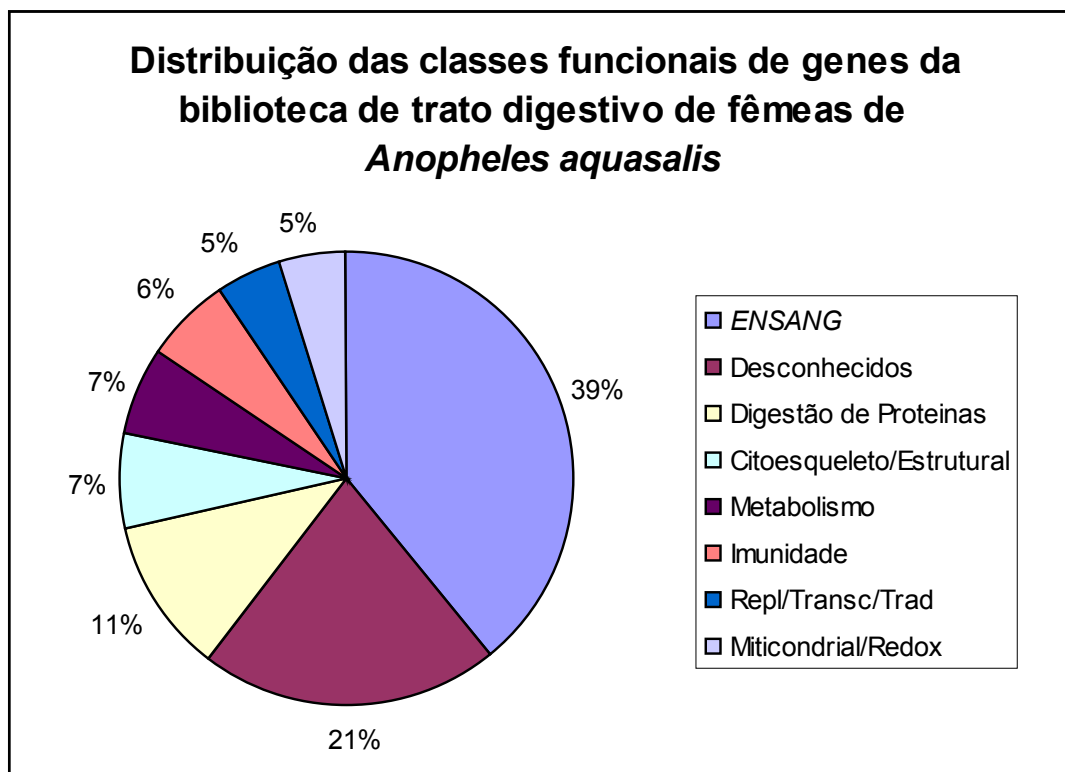


Gráfico 1. Distribuição funcional dos ESTs encontrados na Biblioteca de Trato Digestivo de Fêmeas, mostrando 41% dos transcritos com funções já identificadas, 39% identificadas como transcritos do gênero *Anopheles* de funções não conhecidas e 21% dos ESTs de baixa similaridade com as sequências do banco de dados do GenBank. Destacam-se nesta biblioteca transcritos relacionados com a digestão de proteínas e de função estrutural.

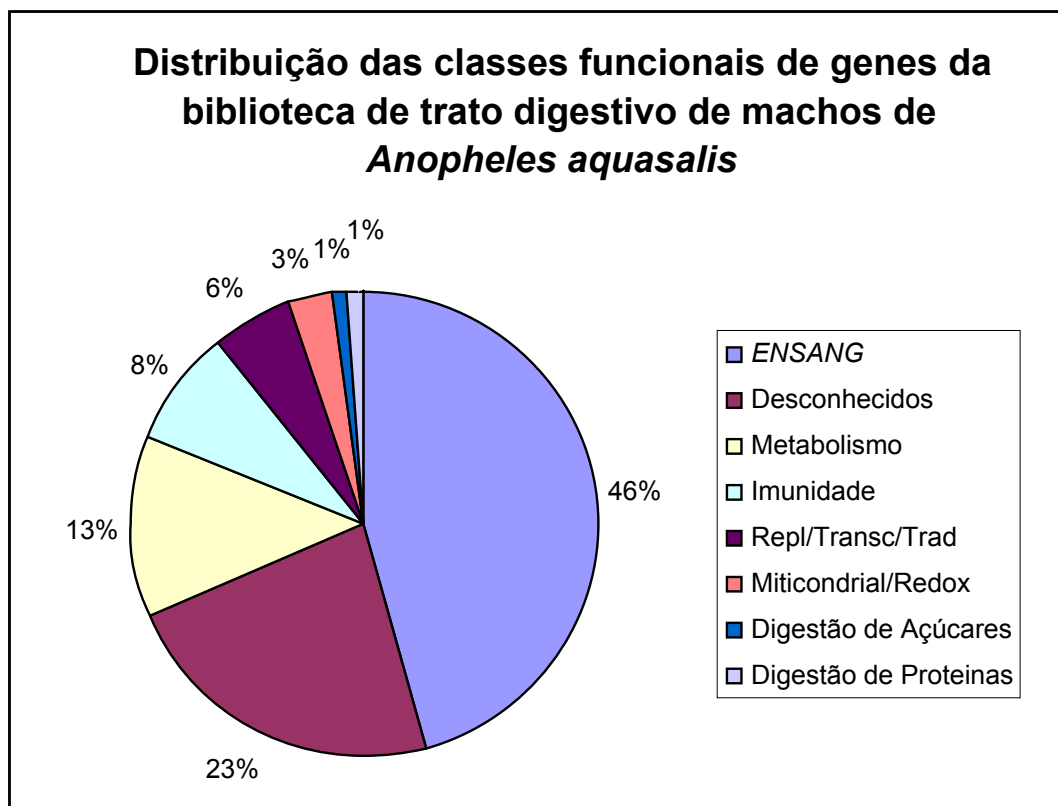


Gráfico 2. Distribuição funcional dos ESTs encontrados na Biblioteca de Trato Digestivo de Machos, com 32% dos transcritos com funções já identificadas, 46% identificadas como transcritos do gênero *Anopheles* de funções não conhecidas e 23% dos ESTs de baixa similaridade com as sequências do banco de dados do GenBank. Destacam-se na biblioteca de machos transcritos relacionados com metabolismo, imunidade e digestão de açúcar.

Tabela 1. Identificação dos clones obtidos da biblioteca de trato digestivo de fêmeas de *Anopheles aquasalis*

Suposta função ou nome da proteína	Nº de clones	Score	Identidade	valor E	Nº de acesso
Metabolismo					
ATP sintase, subunidade d	1	57,8	53%	8,0E-16	EX809763
Cadeia pesada da proteína precursora de ferritina	1	70,5	71%	3,0E-11	EX809736
Dipeptidase Microsossomal	1	44,3	51%	9,0E-06	EX809733
Gama-glutamil hidrolase	1	52,8	71%	7,0E-06	EX809737
Metalotioneina-2	1	213	78%	7,0E-08	EX809740
Metalotioneina-1	3	34,3	46%	7,0E-08	EX809741
Ornitina decarboxilase, <i>antizyme</i>	1	129	76%	8,0E-29	EX809746
Quinurenina 3-monooxigenase	1	308	85%	9,0E-83	EX809751
Ubiquitina	1	68,9	110%	7,0E-28	EX809762
Replicação/Transcrição/Tradução					
Fator de elongação 1-beta2	1	201	91%	1,0E-50	EX809735
Fator de replicação de DNA MCM6	2	300	90%	3,0E-80	EX809732
RNA polimerase	2	77	83%	3,0E-13	EX809752
60S proteína ribossomal L9	1	185	97%	7,0E-46	EX809748
60S proteína ribossomal L44	1	183	97%	3,0E-45	EX809750
L41 proteína ribossomal S18	1	79,7	83%	5,0E-14	EX809749
Mitocondrial/Redox					
Citocromo c oxidase, subunidade III	2	194	80%	1,0E-48	EX809729
Citocrome c oxidase, subunidade VIIC	2	61,6	63%	2,0E-08	EX809730
Dissulfito oxidoreductase	1	47,8	84%	2,0E-04	EX809734
Ubiquinol-citocromo c reductase mitocondrial	2	54,7	75%	1,0E-07	EX809742
Ubiquinol-citocromo c reductase mitocondrial, <i>hinge protein</i>	1	104	62%	2,0E-21	EX809743
Estrutural					
ICHIT	4	94	39,1%	2,0E-04	EX809739
Peritrofina	6	303	59,8%	2,0E-34	EX809747
Peritrofina	1	83	55%	4,0E-04	EX809744
Imunidade					
Cecropina, precursor	5	89,4	88%	7,0E-17	EX809728
Gambicina, precursor	1	117	94%	2,0E-25	EX809738
<i>Niemann-Pick Type C-2</i>	1	127	60%	6,0E-32	EX809745
Serino protease	1	47,8	67%	2,0E-04	EX809755
Serino protease	1	85,1	46%	5,E-16	EX809756
Serpina	1	242	75%	5,0E-63	EX809758
Digestão de Proteínas					
Carboxipeptidase	3	66,6	81%	5,0E-10	EX809726
Carboxipeptidase	1	124	72%	5,0E-28	EX809727
Quimiotripsina	1	237	80%	2,0E-61	EX809757
Serino protease	7	244	74%	2,0E-63	EX809753
Serino protease	5	199	61%	5,0E-50	EX809754
Tripsina	2	77,8	89%	2,0E-13	EX809761

Tabela 2. Identificação dos clones obtidos da biblioteca de trato digestivo de machos de *Anopheles aquasalis*

Suposta função ou nome da proteína	Nº de clones	Score	Identidade	Valor E	Nº de acesso
Metabolismo					
<i>Camp-dependent rap1 guanine-nucleotide exchange factor</i>	2	102	97%	6,0E-21	EX809809
Dimetilamina monooxigenase	2	243	82%	4,0E-63	EX809810
<i>Farnesoic acid O-metil transferase like protein</i>	1	142	56%	6,0E-33	EX809812
Metaloproteinase	1	115	48%	7,0E-25	EX809817
Metalotioneína	4	132	51%	1,0E-10	EX809818
<i>pla2g4b</i>	1	265	83%	6,0E-70	EX809820
Proteína induzida por hormônio juvenil	1	127	52%	2,0E-28	EX809814
UDP-glicose pirofosforilase	1	150	96%	2,0E-35	EX809824
Replicação/Transcrição/Tradução					
Iniciação de tradução eucariótico	1	283	84%	3,0E-75	EX809811
40S proteína ribossomal S15	2	226	87%	4,0E-58	EX809852
40S proteína ribossomal S17	1	163	93%	3,0E-39	EX809853
40S proteína ribossomal S11	1	251	90%	4,0E-72	EX809854
60S proteína ribossomal L22	1	129	73%	8,0E-29	EX809855
Mitocondrial/Redox					
Citocromo c oxidase, subunidade iv	1	146	77%	4,0E-34	EX809856
Citocromo P450	1	143	61%	3,0E-33	EX809857
Ubiquinona, proteína ligante	1	144	81%	2,0E-33	EX809823
Imunidade					
Cecropina, precursor	4	89,4	88%	7,0E-17	EX809807
Galectina	1	159	83%	6,0E-39	EX809813
Lisozima P	1	81,6	65%	2,0E-14	EX809815
Peptidil-prolil cis-trans isomerase	1	165	68%	4,0E-44	EX809819
Serino protease	1	446	74,5%	2,0E-45	EX809821
Digestão de Açúcar					
Maltase Agm2	1	270	74%	2,0E-71	EX809816
Digestão de Proteínas					
Tripsina, precursor	1	145	58%	3,0E-35	EX809822

4.2. Análise da Expressão dos Genes Alvo nos Estágios de Desenvolvimento dos Mosquitos

A partir do resultado das tabelas 1 e 2, foram selecionados os seguintes genes para estudo de expressão e silenciamento: serino protease (tripsina1), peptídeo antimicrobiano (cecropina), quinurenina 3-monooxigenase, peritrofina e serpina.

A análise de expressão desses alvos foram estudadas em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito por qRT-PCR e calculadas através de duas formas: análise de expressão relativa utilizando-se a expressão de um gene ribossomal como controle endógeno e análise de expressão absoluta, como detalhado no item 3.13 de Material e Métodos, tendo seus resultados mostrados através dos gráficos de 3 a 7.

Através da comparação entre os gráficos, análise dos cálculos e conhecimento da literatura, consideramos que os resultados relativos à expressão dos genes por indivíduo eram mais coerentes e, portanto apenas estes foram discutidos.

Observamos que a cecropina foi expressa principalmente pelas formas adultas após alimentação tanto de sacarose quanto de sangue (Gráfico 3). Serpina mostrou-se presente em praticamente todos os estágios, exceto em ovos e trato digestivo de machos (Gráfico 4). Tripsina1 e peritrofina apresentaram um perfil semelhante, específicas de trato digestivo de fêmeas e com expressão aumentada em consequência da alimentação sanguínea (Gráfico 5 e 6), sendo que dentre os estágios imaturos, a peritrofina também foi detectada em pupas (Gráfico 6). Quinurenina 3-monooxigenase esteve presente em todos os grupos, exceto em ovos e machos e também teve expressão aumentada após alimentação sanguínea (Gráfico 7).

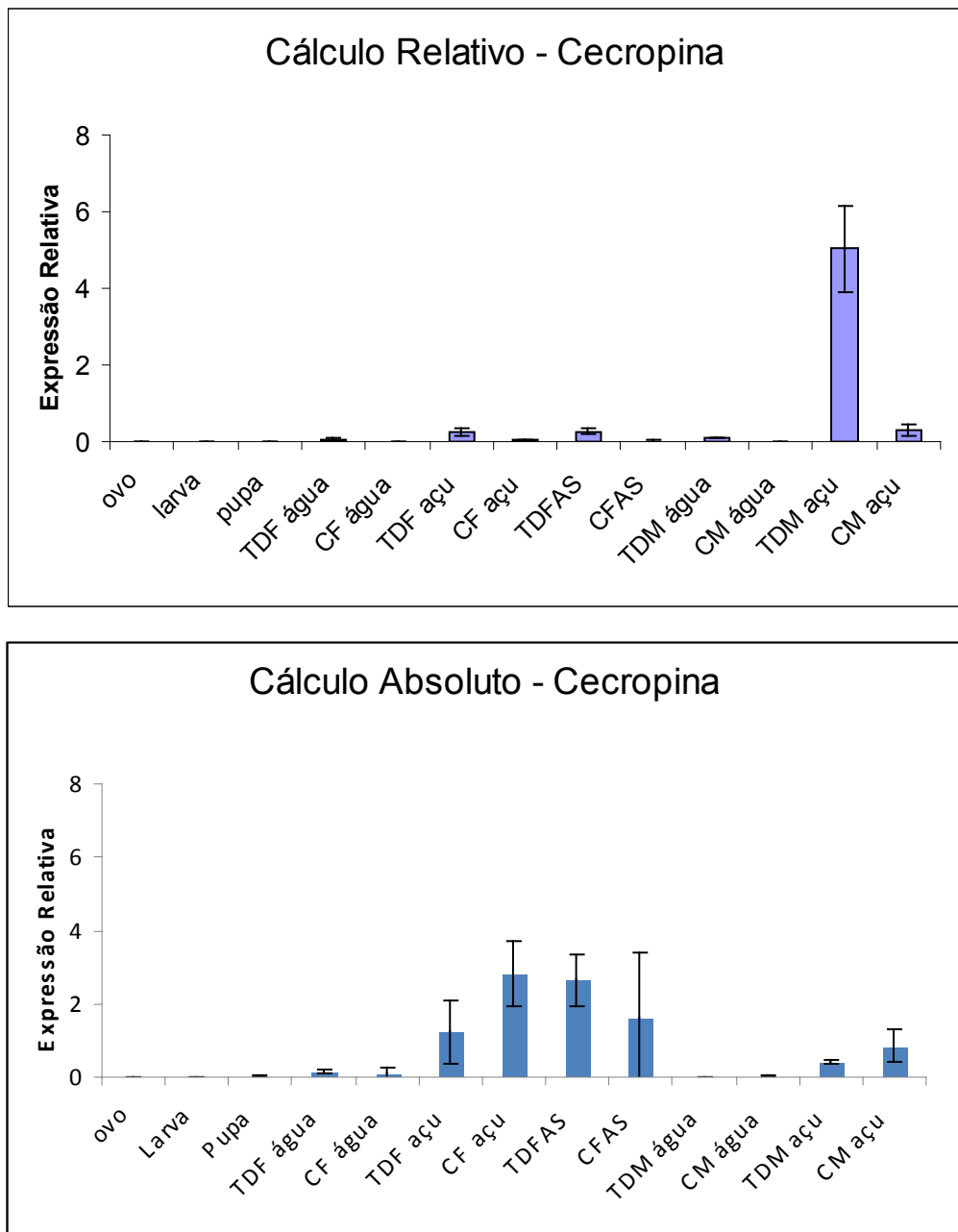


Gráfico 3. Gráfico da expressão de Cecropina em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se CM água com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.

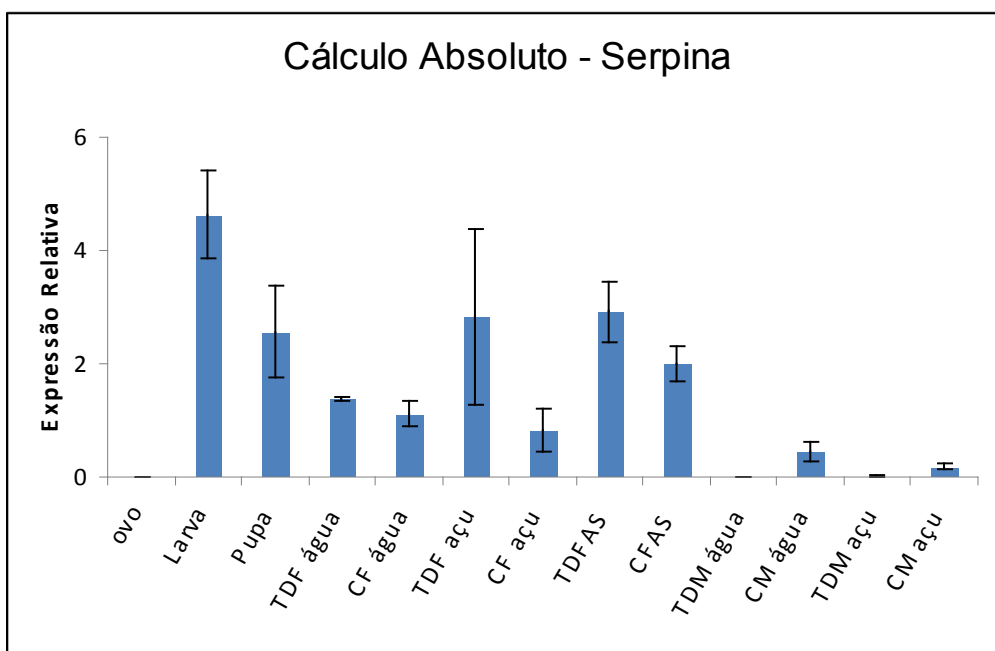
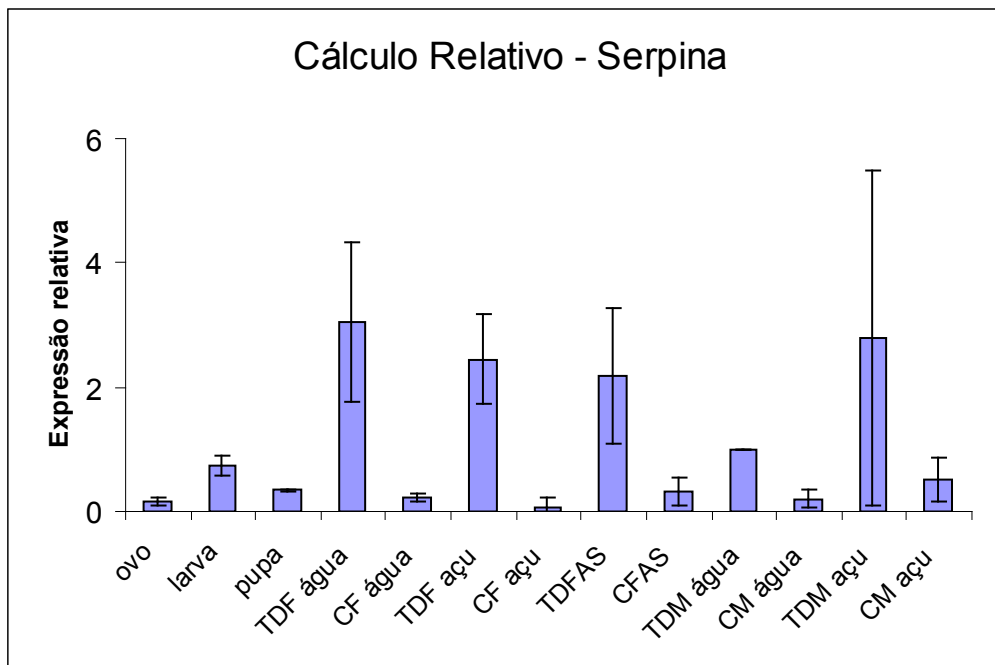


Gráfico 4. Gráfico da expressão de Serpina em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se ovo com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.

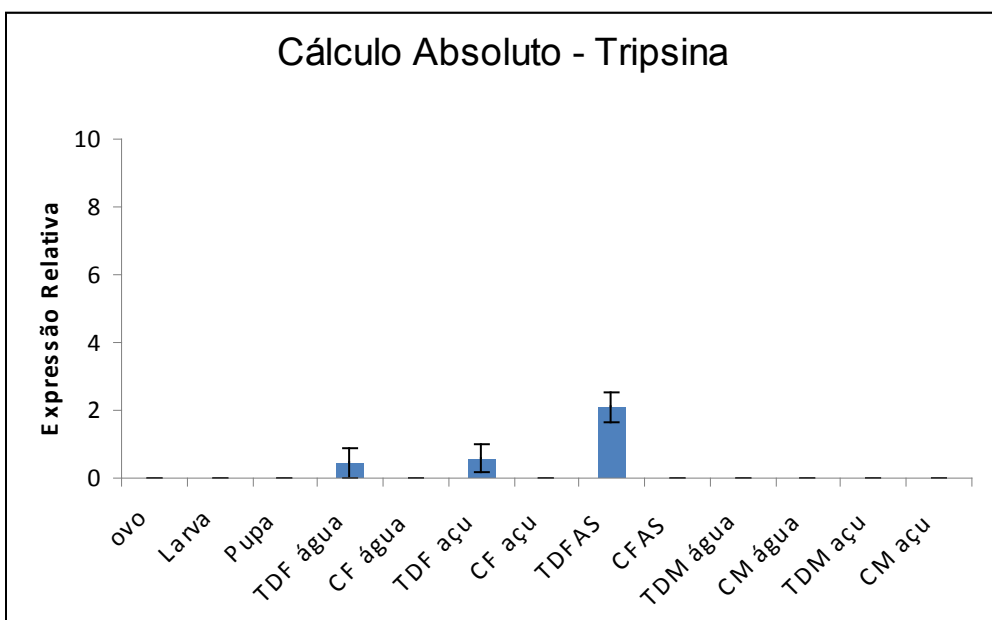
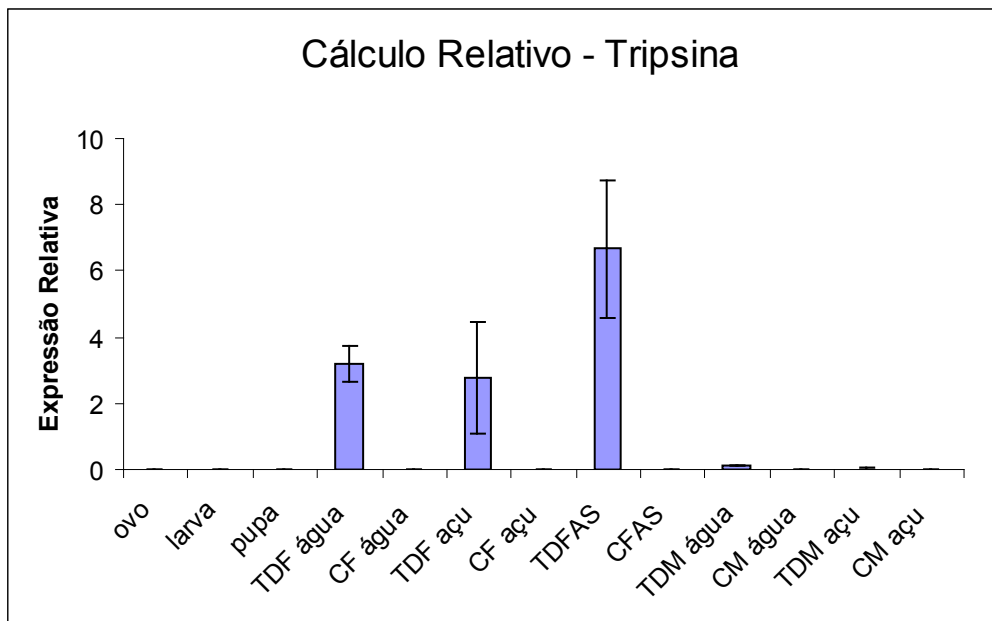


Gráfico 5. Gráfico da expressão de Tripsina 1 em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se CM água com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.

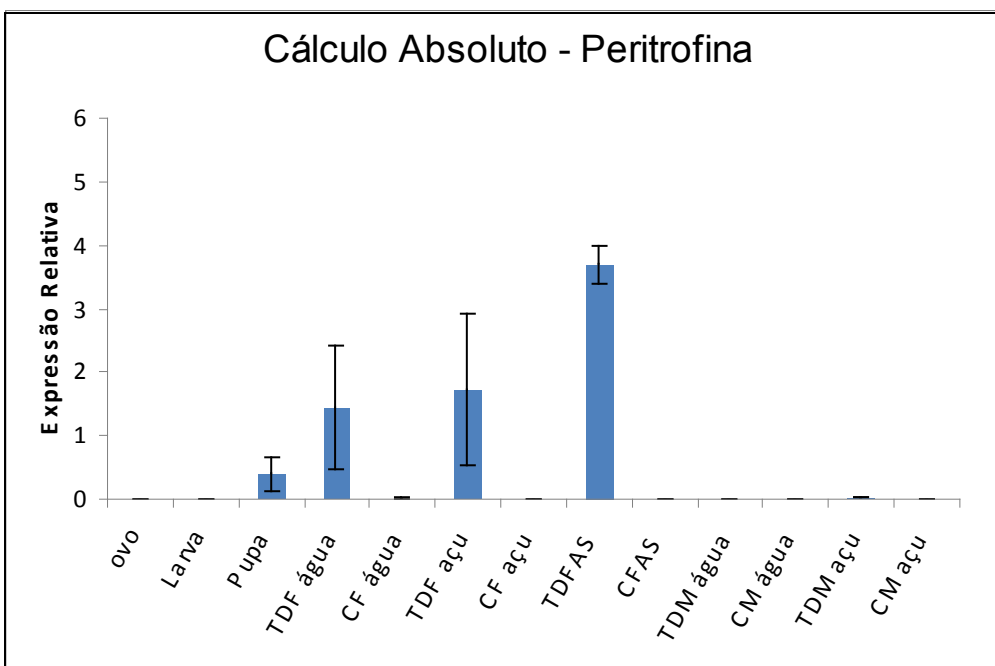
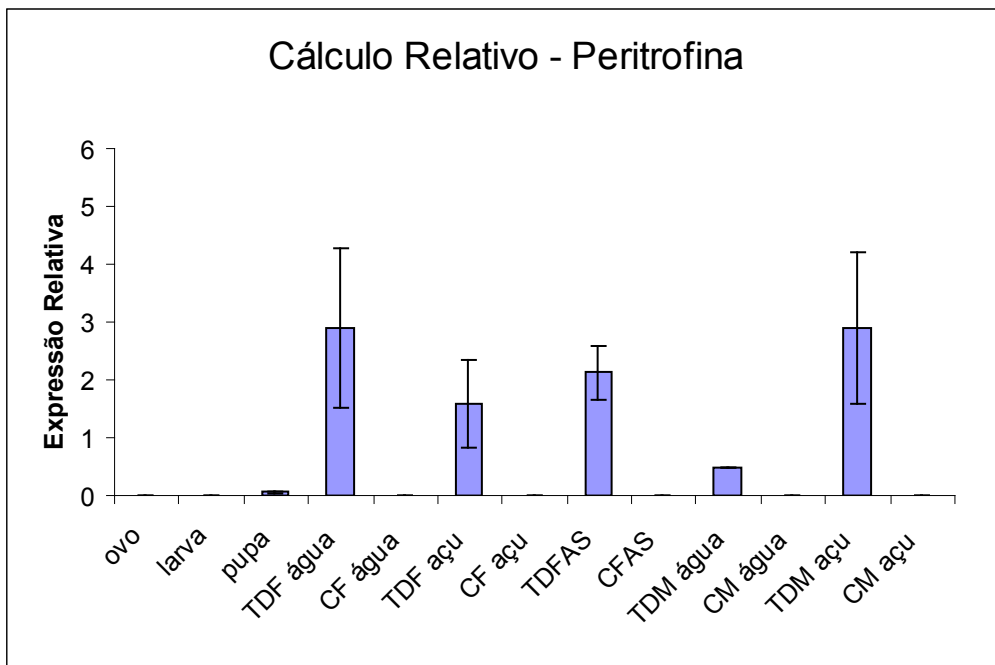


Gráfico 6. Gráfico da expressão de Peritrofina em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se ovo com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.

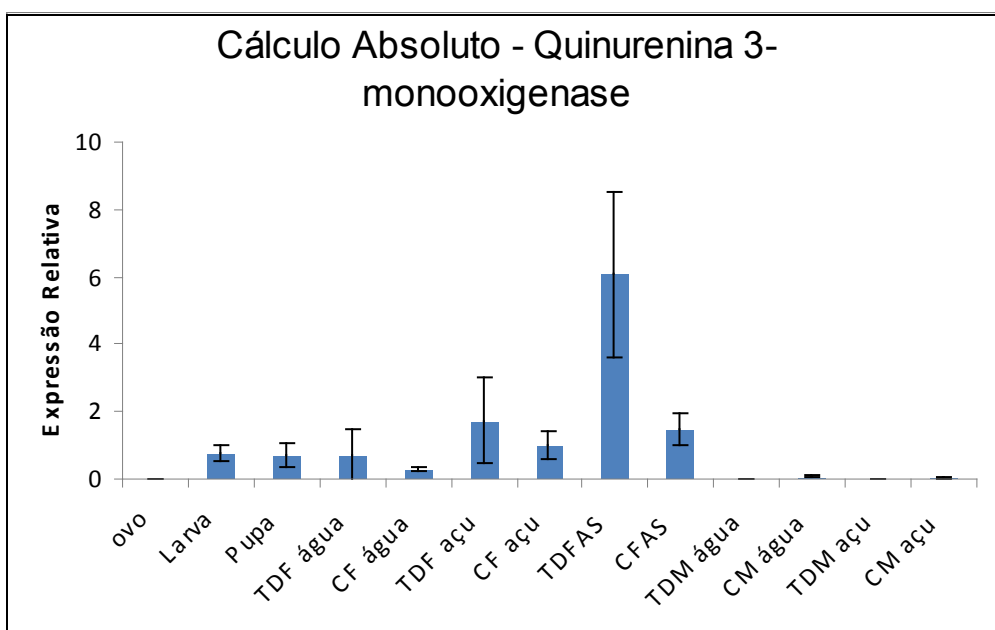
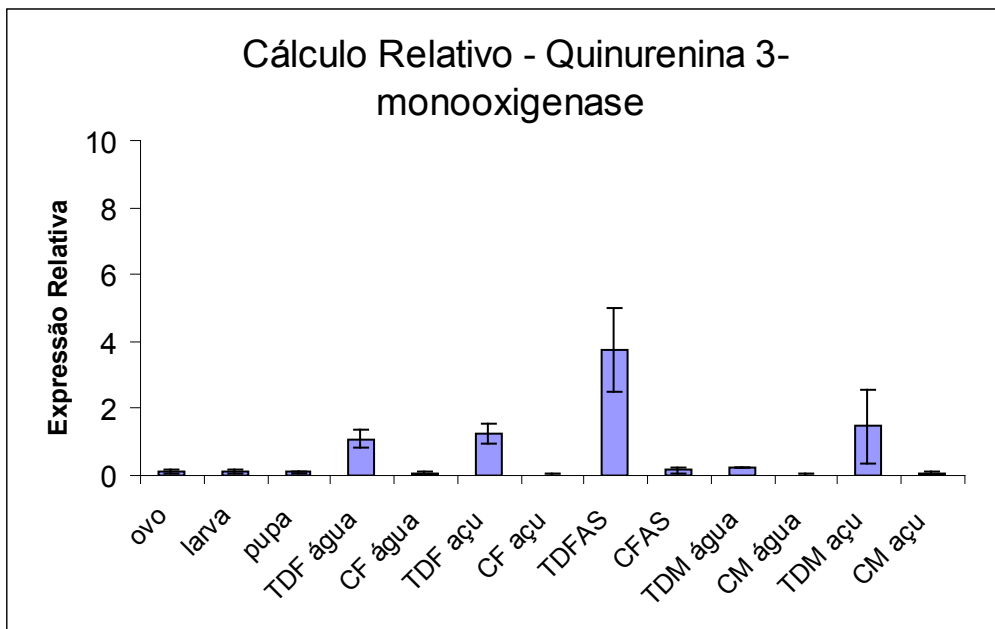


Gráfico 7. Gráfico da expressão de quinurenina 3-monooxigenase em todos os estágios de desenvolvimento de *Anopheles aquasalis*: ovo; larva; pupa; trato digestivo de fêmeas mantidas com água (TDF água), com açúcar (TDF açu), e açúcar e sangue (TDFAS); suas respectivas carcaças (CF água, CF açu, CFAS); machos mantidos com água (TDM água) e com açúcar (TDM açu) e suas respectivas carcaças (CM água e CM açu). O cálculo relativo foi feito com a utilização de um gene endógeno e o cálculo absoluto foi feito por indivíduo comparando-se ovo com todas as amostras. Os erros das barras representam o desvio padrão.

4.3. Síntese dos dsRNAs

A princípio, todos os genes selecionados para o estudo de expressão foram utilizados na síntese de dsRNA.

Para todos os clones foram feitas reações de PCR utilizando primers T7-M13, como descrito no item 8 de Material e Métodos, e os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1%, como mostram as figuras 4A e 4B.

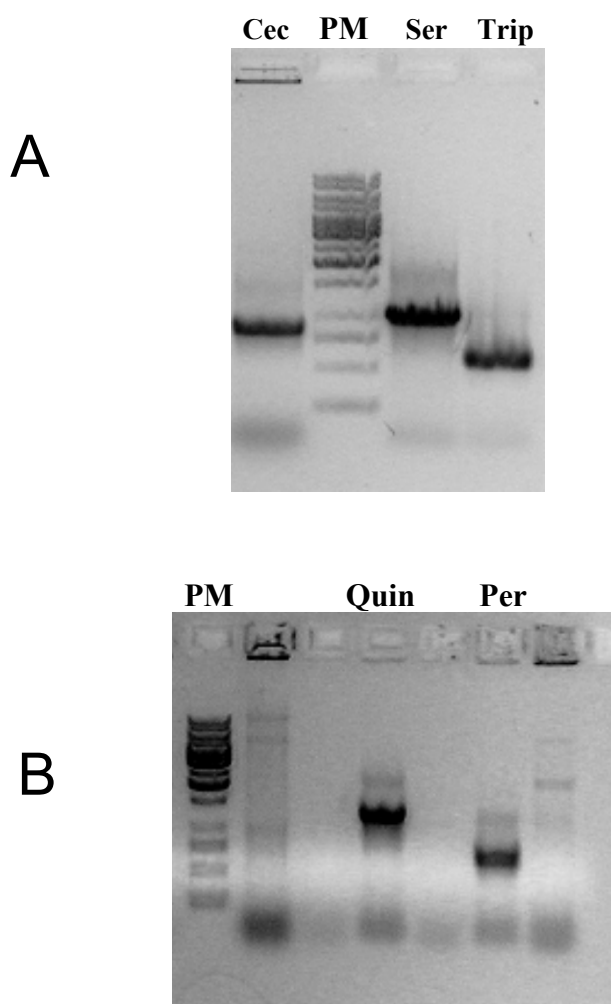


Figura 4. Eletroforese em agarose dos produtos da PCR dos clones selecionados para a síntese de dsRNA, utilizando-se os oligonucleotídeos T7-M13 *forward* e *reverse*. Os clones inicialmente selecionados foram: Inibidor de Serino Protease (Ser) com 950 pb, Tripsina 1 (Trip) com 550 pb, Cecropina (Cec) com 850 pb, como mostra a figura A; e Quinurenic acid 3-monooxygenase (Quin) com 1200 pb e Peritrofinin (Per) com 650 pb na figura B. PM, padrão de tamanho molecular.

Utilizando-se os produtos da PCR da etapa anterior, foram realizadas as reações de síntese do dsRNA, como descrito no item 9 de Material e Métodos, tendo seus respectivos produtos ilustrados na Figura 5.

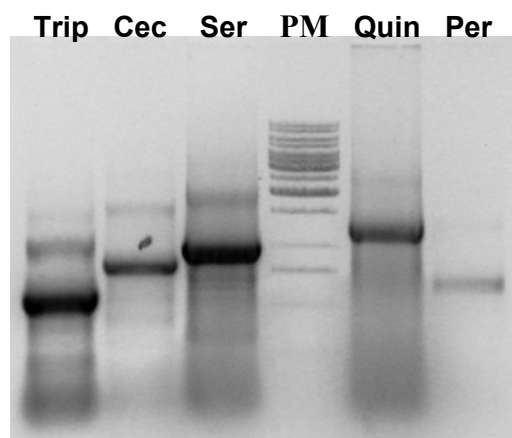


Figura 5. Eletroforese em agarose dos produtos da síntese do dsRNA dos clones de tripsina 1 (550 pb), cecropina (800 pb), serpina (950 pb), quinurenina 3-monooxigenase (1200 pb) e peritrofina (650 pb). PM, padrão de tamanho molecular.

A utilização dos dsRNAs no silenciamento dos alvos tripsina 1, peritrofina e quinurenina 3-monooxigenase foram realizados com o objetivo de avaliar a influência dessas proteínas na longevidade de fêmeas adultas, considerando que esses genes não foram expressos em machos.

A cecropina foi excluída por problemas de contaminação dos oligonucleotídeos do qRT-PCR. E o silenciamento da serpina foi realizado em um experimento separado apenas para a avaliação da eficiência do dsRNA, no caso, sem utilização de corante.

4.4. Silenciamento por RNAi

Todas as análises de silenciamento por qRT-PCR foram realizadas em triplicata biológica. Para os mosquitos do experimento de longevidade, um representante de cada grupo foi dissecado quatro dias após a injeção do dsRNA correspondente, seguido de extração de RNA e síntese de cDNA. O resultado das reações de PCR em tempo real foi ilustrado através do gráfico 8, e mostra a expressão dos genes alvo silenciados em trato digestivo e carcaça de fêmeas de *An. aquasalis*, sendo que a carcaça foi analisada apenas para o gene da quinurenina 3-monooxigenase.

Foram injetados 90,76 ng/injeção de dsQuin, resultando em um silenciamento de 80% no trato digestivo e 98% em carcaça. As fêmeas injetadas com dsTrip receberam 52,96 ng/injeção do dsRNA e sua eficiência foi de 45% em tratamentos digestivos quatro dias após a injeção, e curiosamente de 89% 6h após a alimentação sanguínea. Os mosquitos injetados com dsPeri receberam 4,38 ng/injeção e inesperadamente resultaram em um considerável silenciamento de 52%. E para o gene da serpina, obteve-se uma eficiência de 83%, considerando-se que foram injetados 292 ng de dsSer por injeção (Gráfico 8).

4.5. Análise da Longevidade

A contabilização das mortes dos adultos, realizadas diariamente, não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as fêmeas em relação ao seu controle PBS, e também não mostrou associação com alimentação sanguínea realizada pelas mesmas com 10 dias de vida (Gráfico 9).

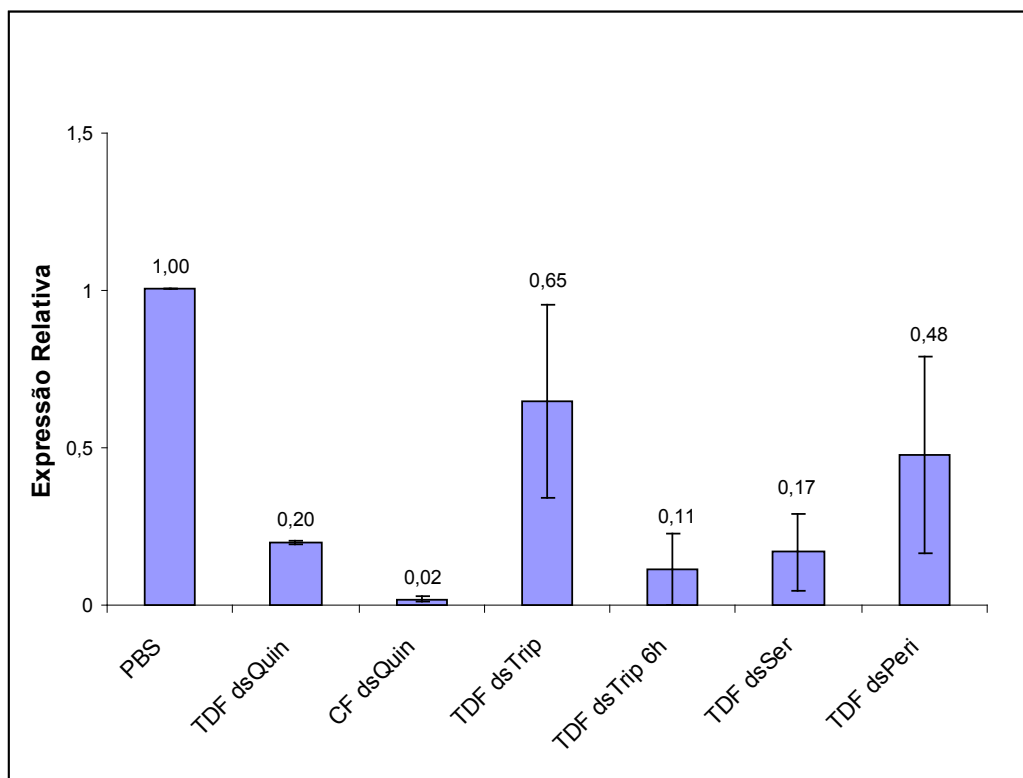


Gráfico 8. Expressão de quinurenina 3-monooxigenase em trato digestivo e carcaça de fêmeas de *An. aquasalis* após 4 dias da injeção de dsQuin e expressão relativa de tripsina1 em trato digestivo de fêmeas de *An. aquasalis* após 4 dias da injeção de dsTrip e 6 h após da alimentação sanguínea em fêmeas injetadas com dsTrip. Cada barra representa a média entre os três mosquitos das réplicas biológicas, e os erros das barras representam o desvio padrão.

Análise de Sobrevivência das Fêmeas

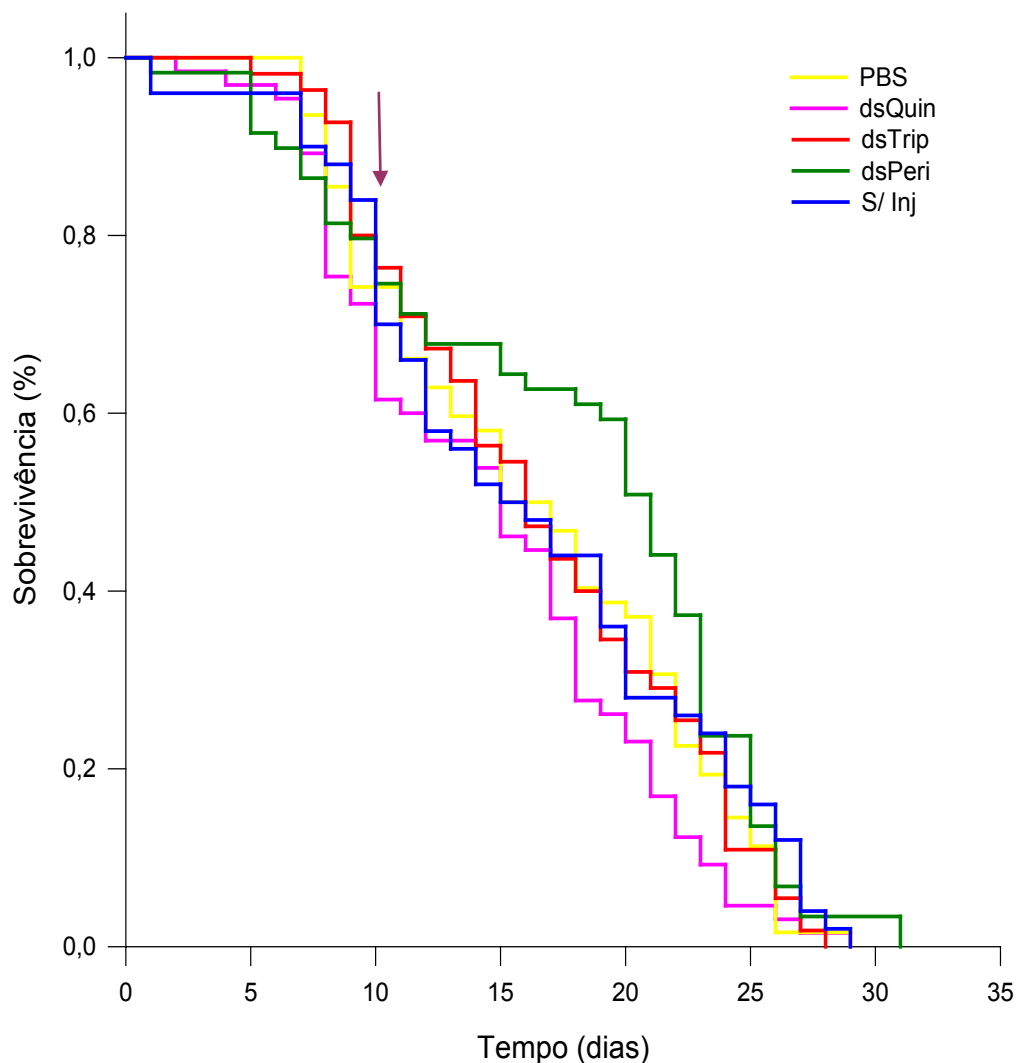


Gráfico 9. Comparação do tempo de vida das fêmeas de *Anopheles aquasalis* entre os grupos que receberam injeção de dsRNA com os grupos controle PBS e Sem Injeção. O tempo foi dado em dias e a sobrevivência dada em porcentagem. A seta indica o dia em que os mosquitos receberam alimentação sanguínea. Os dados não revelaram nenhuma diferença estatisticamente significante.

5. *Discussão*

Para a construção das bibliotecas fez-se necessária a realização de uma etapa de PCR, para a síntese de cDNA. Apesar de haver uma grande amplificação das sequências dos ESTs, acredita-se que esta etapa não tenha sido suficiente para normalizar o número de clones de cada transcrito, e desta forma, podemos inferir que a quantidade de transcritos idênticos encontrados sejam proporcionalmente representativas a expressão dos genes em questão, como ocorreu com cecropina, peritrofina, carboxipeptidase, tripsina, ICHIT. Não desconsiderando que o número de clones sequenciados tenha sido insuficiente para representar o transcriptoma inteiro do órgão estudado, pôde-se perceber, como era de se esperar, que as maiores diferenças entre as bibliotecas de machos e fêmeas residiram justamente no padrão alimentar de cada sexo.

Proteínas da família das serino proteases alcançaram o maior índice de expressão em fêmeas (11,2%), dentre elas, a tripsina que é a enzima majoritária responsável pela digestão sanguínea em anofelinos (Billingsly & Hecker, 1991). Em *An. gambiae*, sete diferentes genes para tripsinas digestivas em adultos (*AnTryp1* a 7) foram descritas (Muller et al., 1995), sendo que dois destes genes, *AnTryp1* (similar ao encontrado na biblioteca de fêmeas) e *AnTryp2*, parecem estar envolvidos diretamente com a digestão do sangue. A análise feita por qRT-PCR demonstrou que o gene tripsina1 de *An. aquasalis* é expresso somente em fêmeas adultas, com aumento de expressão seis horas após a alimentação sanguínea, sugerindo que realmente seja uma protease intimamente relacionada a digestão de sangue sexo-específica (Gráfico 5).

Curiosamente, as fêmeas injetadas com dsTrip e dissecadas seis horas após a ingestão de sangue foram silenciadas mais eficientemente (89%) que as não alimentadas com sangue (35%) como ilustrado através do gráfico 8. Considerando a diferença de expressão entre essas duas situações, esperaria-se o contrario, uma maior eficácia no silenciamento a níveis menores de expressão (Boisson et al., 2006). Diante desse fato, ou podemos dizer que houve algum tipo de diferença na aplicação da injeção, que tenha facilitado ou dificultado a distribuição do dsRNA no organismo do inseto, ou que a maquinaria de silenciamento em *An. aquasalis* necessita de mais de quatro dias para desempenhar sua função mais eficientemente, o que também mostra que o efeito

do silenciamento se mantém por mais de sete dias. Apesar do referido gene ter sido silenciado em 89%, não houve alteração na longevidade dos mosquitos (Gráfico 9), provavelmente devido ao enriquecido arsenal de proteases digestivas apresentado pelas fêmeas e ao fato de que a sacarose constitui a principal fonte de energia de adultos da espécie *An. aquasalis* (Souza-Neto et al., 2007), pouco diferente da espécie *An. gambiae*, que consegue sobreviver bem apenas com dieta sanguínea (Gary & Foster, 2001).

Uma vez que o açúcar representa a principal fonte energética dos mosquitos, principalmente para os machos, glicosidases são de extrema importância para os mesmos. Uma única sequência de 74% de identidade com a maltase *Agm2* foi encontrada na biblioteca de machos. Já estudadas por Souza-Neto et al. (2007), ele demonstrou a atividade de α -glicosidases em intestino médio de fêmeas de *An. aquasalis* e identificou a presença três diferentes isoformas da enzima.

Apesar da dieta dos machos, como dito anteriormente, ser baseada exclusivamente em carboidratos, identificou-se também na referida biblioteca um precursor de tripsina (58% de identidade com *AnTryp2*), que supostamente seria induzida pela alimentação sanguínea em fêmeas (Muller et al., 1995), sugerindo que o gene não é induzido unicamente por ingestão de sangue, ou que se trata de uma protease homóloga controlada por um diferente sinal de indução, fazendo-se necessário um estudo mais aprofundado deste gene na espécie em questão.

Clones que codificam quimiotripsinas (80% de identidade com quimiotripsina 2) e carboxipeptidases (81% de identidade com a carboxipeptidase A) se mostraram presentes em fêmeas antes mesmo da alimentação sanguínea, junto também de outras sete serino proteases pertencentes à família das peptidases S1, relacionada principalmente com o auxílio no processo de digestão (Terra & Ferreira, 1994; Shen et al., 2000; Vizioli et al., 2001; Almeida et al., 2003; Page & Di Cera, 2008).

Carboxipeptidases são exopeptidases que removem um único resíduo de aminoácido da porção C-terminal de proteínas ou peptídeos. As que possuem função digestiva pertencem a uma família de enzimas contendo zinco (clan MC, família M14, <http://merops.sanger.ac.uk/>) e podem ser divididas de acordo com a

especificidade de seu substrato nas classes A e B, encontradas no intestino médio de diversas espécies de insetos fitófagos e hematófagos. Nestes a atividade da classe A é fortemente aumentada em resposta a alimentação sanguínea, sendo a digestão sua principal função. Porém, a expressão da *cpbAg1* (classe B) diminui no intestino médio após a ingestão de sangue, comparando-se ao perfil das tripsinas primárias em *An. gambiae*, cujos níveis de mRNA são aumentados antes dos mosquitos se alimentarem e a produção de enzimas é regulada a nível traducional, sugerindo que participem da via de sinalização que induz a expressão das tripsinas tardias, responsáveis pela principal fase da digestão (Lavazec et al., 2005). Lavazec et al. (2007) identificou duas carboxipeptidases B em intestino médio de *An. gambiae* (CPBAg1 e CPBAg2), mostrando um aumento da expressão de ambas devido à ingestão de gametócitos de *Plasmodium*. Com a utilização de anticorpos CPBAg1, demonstrou redução do desenvolvimento tanto de *P. falciparum* como *P. berghei* sugerindo se tratar de um bom candidato a elaboração de TBVs.

Shen et al. (2000) descreveu o perfil de expressão inverso de uma quimiotripsina-like (AgChyL), em relação ao perfil da tripsina 1e 2, quimiotripsina 1 e 2 e carboxipeptidase A de *An. gambiae*, todos estes induzidos pela alimentação sanguínea. O trabalho sugere que fatores nucleares que regulam a expressão da tripsina tenham efeito oposto na expressão da AgChyL, e que esta pode desempenhar um papel análogo ao das tripsinas primárias em estimular a expressão de outras enzimas digestivas em *An. gambiae*.

As peritrofinas encontradas tiveram 59,8% de identidade com o precursor de peritrofina 1 de *An. gambiae*. De modo geral, as peritrofinas possuem domínio de ligação à quitina e outros domínios cuja configuração geral é similar a das mucinas, e representam um componente essencial para a formação da matriz peritrófica (Terra, 1996). Seu perfil de expressão em *An. aquasalis* foi muito semelhante ao da tripsina 1 (Gráfico 6), exceto por ter sido detectada durante a fase de pupa. Na espécie *An. gambiae*, a expressão de peritrofina 1 (Ag-Aper1) se inicia apenas um dia após a eclosão do mosquito adulto (Shen & Jacobs-Lorena, 1998), e são armazenadas em vesículas secretoras apicais antes da alimentação sanguínea (Devenport et al., 2004).

Talvez devido a sua menor expressão antes da alimentação sanguínea (Gráfico 6), a microinjeção de apenas 4,38 ng do dsRNA correspondente foi suficiente para silenciar o gene em 52%, o que não interferiu na longevidade dos mosquitos. Mesmo que a peritrofina 1 seja um importante componente da PM e sua diminuição acarrete em alterações na sua formação, segundo Billingsley e Rudin (1992) o mosquito é capaz de completar a digestão sanguínea mesmo na ausência da PM. Segundo Terra (1996), espera-se que a digestão seja menos eficiente na ausência da mesma, devido à inibição parcial de hidrolases microvilares e proteínas transportadoras por material não digerido ou por inibidores na refeição, e também devido ao aumento da excreção de enzimas digestivas. Em insetos herbívoros, a PM representa a primeira linha de defesa contra substâncias tóxicas de plantas, reduzindo ou eliminando a absorção de certos aleloquímicos ingeridos durante a alimentação (Barbehenn, 2001).

Outros genes que codificam proteínas ligantes de quitina também se mostraram presentes. ICHIT é uma proteína com dois domínios ligantes de quitina separados por um domínio mucina rico em treonina, codificada por um gene específico do intestino médio, induzido durante a resposta imune. Essas proteínas podem se ligar à superfície quitinosa de microorganismos ou se associarem a matriz peritrófica (PM), que é altamente enriquecida em quitina (Dimopoulos et al., 1998; Dimopoulos, 2001).

Dois tipos de precursores de AMPs foram encontrados, um de gambicina (94% de identidade) e nove clones no total da mesma cecropina. As cecropinas de ambas as bibliotecas apresentaram sequências idênticas e com 88,3% de identidade com o precursor de cecropina B de *An. gambiae*, representando um importante componente do sistema imune do mosquito não só pelo seu padrão de expressão predominante em adultos (Gráfico 3), mas pela quantidade de clones encontrados nas bibliotecas (Tabelas 1 e 2).

Assim como os demais AMPs (defensinas, gambicinas, atacinas), as cecropinas (Xanthopoulos et al., 1988) fazem parte da etapa final da resposta imune humoral e atuam se integrando a célula bacteriana e causando lise e morte por perda de cátions (Durell et al., 1992). São produzidas pelo corpo gorduroso e secretadas na hemolinfa, onde se acumulam em grandes concentrações.

Também podem ser produzidas localmente pela barreira epitelial de vários insetos, provavelmente através da ativação das vias Toll e IMD (Hoffmann, 2003; Osta et al., 2004). Estudos demonstraram a cecropina possui atividade contra numerosas bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos filamentosos e leveduras (Visioli et al., 2000; Hultmark, 2002).

Apesar dos mosquitos não terem sido desafiados imunologicamente para o experimento, eles já apresentavam considerável expressão do precursor de cecropina, demonstrando que o organismo do inseto mantém-se preparado para uma resposta efetiva contra a invasão de patógenos. Da mesma forma, podemos supor que exista outro mecanismo ou AMP de maior importância que a cecropina atuando na defesa das formas imaturas de *An. aquasalis*.

Serino proteases de sistema imune também foram encontradas em ambos os sexos, porém diferentes uma da outra. Em machos, o clone sequenciado obteve 74,5% de identidade com precursor de SP24D, uma proteína similar a proteases quimiotripsina-like, cujos níveis de expressão foram maiores em uma linhagem de machos adultos de *An. gambiae*, refratária ao parasita da malária (Han et al., 1997), o que representa um interessante alvo para futuros estudos de infecção por *Plasmodium*.

Ainda em relação à imunidade, também foram encontradas uma lisozima e uma galectina na biblioteca de machos. Recentemente, foi identificada uma lisozima em *An. gambiae* que funciona como um fator de inibição da melanização (Li & Paskewitz, 2006). Já as galectinas são lectinas capazes de se ligar a açúcares beta-galactosídeos (Pace & Baum, 2004). As lectinas geralmente atuam na imunidade como aglutininas e como opsoninas na ativação da enzima pro-fenoloxidase (Richman & Kafatos, 1995; Dimopoulos et al., 2001). No entanto, foram identificadas duas lectinas C, CTL4 e CTLMA2, cujo silenciamento mostrou uma resposta negativa no desenvolvimento do plasmódio, sugerindo um efeito protetor sobre o parasita contra a melanização (Osta et al., 2004; Hemingway & Craig, 2004).

Entre os ESTs pertencentes à biblioteca de fêmeas, foi encontrado um inibidor de serino protease (serpina) com 75% de identidade à SRPN10, um gene que pode originar quatro diferentes isoformas da serpina (KRAL, RCM, FCM e

CAM) através de *splicing* alternativo (Danielli et al., 2003). As isoformas diferem nas suas especificidades a proteases e também na sua regulação. A invasão das células epiteliais do intestino médio do mosquito por *Plasmodium* promoveu o aumento da expressividade das isoformas RCM e KRAL (Danielli et al., 2005). Através desse trabalho, identificou-se similaridade entre a sequência da serpina de *An. aquasalis* com a isoforma RCM de *An. gambiae*, que foi descrita como a isoforma mais abundante e encontrada predominantemente no intestino médio.

O estudo da serpina em *An. aquasalis* mostrou que, de fato, esta proteína é codificada por um gene altamente expresso em quase todos os estágios de desenvolvimento do mosquito, exceto ovos e trato digestivo de macho (Gráfico 4). A variação observada entre esses estágios foi bastante similar ao perfil expressão da proteína determinado através *immunoblotting*, relatado por Danielli (2003). Através da microinjeção de 292 ng de dsSer seu silenciamento foi testado em fêmeas de *An. aquasalis*, obtendo-se uma eficiência de 83%.

Outro alvo de interesse, que também foi utilizado como objeto de estudo foi o gene que codifica a enzima quinurenina 3-monooxigenase (85% de identidade), encontrado na biblioteca de fêmeas. Como já explicado anteriormente, esta enzima participa do metabolismo do triptofano, cuja via acarreta na síntese de pigmentos omocromos dos insetos, e também na formação do ácido xanturênico (Figura 4), considerado um dos fatores de exflagelação do gametócito (Garcia et al., 1998; Bhattacharyya & Kumar, 2001; Quan et al., 2002; Han et al., 2007).

Transcritos desse gene mostram-se presentes em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito, exceto ovos e trato digestivo de machos, notando-se também um aumento de expressão nas fêmeas 6h após a ingestão de sangue (Gráfico 7), sugerindo uma associação da referida enzima com a ingestão de sangue ou mais especificamente à ingestão do triptofano presente no sangue e sua consequente metabolização.

Fêmeas dsQuin, cuja média de silenciamento foi de 80% no trato digestivo e 98% em carcaça, não mostram alterações relativas ao tempo de vida (Gráfico 9) nem alteração na coloração dos olhos (dados não mostrados).

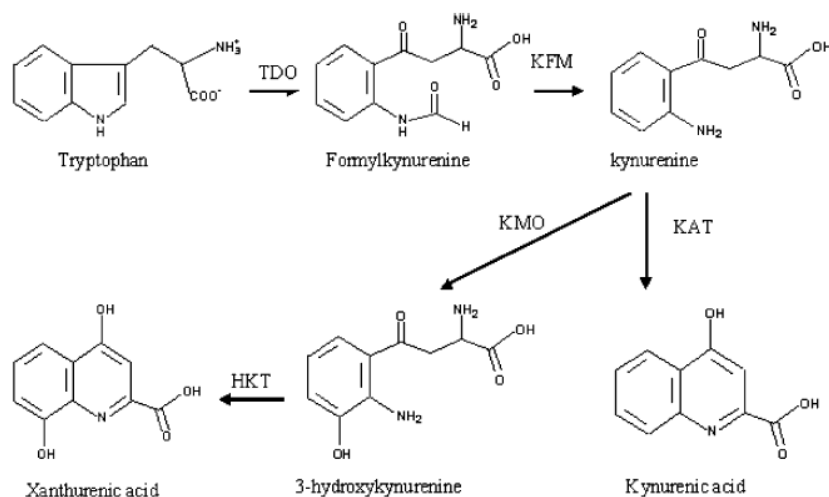


Figura 4. Via bioquímica do triptofano a ácido xanturênico em mosquitos. TDO, triptofano dioxigenase; KFM, quinurenina formamidase; KMO, quinurenina 3-monooxigenase; KAT, quinurenina aminotransferase; HKT, 3-hidroxiquinurenina transaminase. Fonte: Han et al., 2007.

Apesar de poucos ESTs terem sido sequenciados de ambas as bibliotecas, os resultados foram suficientes para demonstrar a grande importância das enzimas digestivas e de fatores ligados à imunidade, considerando inclusive que a classe agrupada como “estrutural” também desempenha funções digestivas e imunológicas.

Mesmo antes da alimentação sanguínea, ou mesmo antes da fase adulta, as fêmeas já se mostraram preparadas tanto para a digestão quanto para a defesa do organismo através do sistema imune. Talvez todo esse preparo anterior represente um grande diferencial para a competência do vetor, o que pode ter feito dos *An. aquasalis* uma espécie que desempenha um papel secundário na transmissão da malária no Brasil.

O fato das pupas já apresentarem expressão do gene da peritrofina, mostra que essa fase já está pronta para um novo hábito alimentar, ou seja, que os adultos eclodem já preparados para a produção da PM, diferentemente da espécie *An. gambiae*, em que um dos constituintes protéicos da PM é expresso

apenas um dia após a eclosão do adulto, podendo representar uma grande vantagem ao desenvolvimento do *Plasmodium* e ao excelente desempenho do *An. gambiae* como vetor da doença, uma vez que está em constante contato com os seres humanos.

6. Considerações finais

Os resultados originados a partir das bibliotecas permitiram inferir uma predominância de serino proteases e proteínas ligantes de quitina, como ICHIT e peritrofina, no intestino médio de fêmeas alimentadas com sacarose. Fatores relacionados à imunidade foram bem representados em ambos os sexos.

As análises de expressão corroboram com a idéia de que estes insetos estão preparados imunologicamente para ingestão de alimentos contaminados, como néctar e outras soluções açucaradas.

Tanto os machos quanto as fêmeas de *An. aquasalis* são dependentes de açúcar (Souza-Neto, 2007), diferente da espécie *An. gambiae* (Gary & Foster, 2001) que conseguem sobreviver apenas com dieta sanguínea. Considerando-se que a maioria dos patógenos encontra-se na natureza e que o sangue deveria ser uma fonte “estérril” de microorganismos, sugere-se que a espécie *An. aquasalis* tenha sofrido uma maior pressão imunológica e estejam melhor preparados para responder contra esses invasores. Isso talvez explicasse o fato das pupas de *An. aquasalis* já apresentarem expressão de peritrofina, uma vez que a PM representa uma importante barreira a patógenos além de auxiliar no processo digestivo. Em contrapartida, *An. gambiae* talvez tenha sofrido uma menor pressão imunológica por ser mais antropofílico e estar menos exposto aos agentes infecciosos vindos através da ingestão de açúcar.

Sabendo-se que a espécie *An. aquasalis* assume um papel secundário na transmissão da malária, acredita-se que as informações apresentadas neste estudo contribuíram para explicar, em partes, a sua menor competência como vetor.

Este trabalho, além descrever características do transcriptoma da espécie, também abre novas perspectivas de pesquisas relacionadas ao vetor e a interação vetor-parasita. Estudos de expressão diferencial de genes de vetores secundários como *An. aquasalis* podem ser de extrema importância na descoberta de fatores de resistência a patógenos, assim como possivelmente, a novos candidatos a TBVs, que representam uma nova estratégia de combate a transmissão da malária.

7. Referências Bibliográficas

- Almeida, R.W., Tovar, F.J., Ferreira, I.I., Leocini, O., 2003. Chymotrypsin genes in the malaria mosquitoes *Anopheles darlingi*. Insect Biochem. Molec. Biol. 33, 307-315.
- Anobase – The *Anopheles* database. Disponível em: <<http://www.anobase.org/species/MalariaSpecies.html>>. Acessado em 20/03/2008.
- Barbehenn, R.V., 2001. Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47, 86-99.
- Baruch, D.I., Gormley, J.A., Ma, C., Howard, R.J., Pasloske, B.L., 1996. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 3497-3502.
- Bhattacharyya, M.K., Kumar, N., 2001. Effect of xanthurenic acid on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles stephensi*. Int. J. Parasitol. 31, 1129-1133.
- Biggs, B., Goozé, L., Wycherley, K., Wilkinson, D., Boyd, A.W., Forsyth, K.P., Edelman, L., Brown, G.V., Leech, J.P., 1990. Knob-independent cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to the leukocyte differentiation antigen CD36. J. Exp. Med. 171, 1883-1892.
- Billingsley, P.F., Hecker, H., 1991. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera:Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidases and α -glucosidase in the midgut. J. Med. Entomol. 28, 865-871.

- Boisson, B., Jacques, J.C., Choumet, V., Martin, E., Xu, J., Vernick, K., Bourgoïn, C., 2006. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Lett.* 580(8), 1988-1992.
- Brown, A.E., Bugeon, L., Crisanti, A., Catteruccia, F., 2003. Stable and heritable gene silencing in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Nucleic Acids Res.* 31(15), 1-6.
- Brown, A.E., Catteruccia, F., 2006. Toward silencing the burden of malaria: progress and prospects for RNAi-based approaches. *BioTechniques.* 40, 38-44.
- Carter, R., Mendis, K. N., Miller, L.H., Molineaux, L., Saul, A., 2000. *Nature Medicine.* 6(3), 241-244.
- Carter, R., 2001. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine.* 19, 2309-2314.
- Carter, R., Nijhout, M.N., 1977. Control of gamete formation (exflagellation) in malaria parasites. *Science* 195, 407-409.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H.M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F.C., 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science.* 298, 159-165.
- Danielli, A., Kafatos, F.C., Loukeris, T.G., 2003. Cloning and characterization of four *Anopheles gambiae* serpin isoforms, differentially induced in the midgut by *Plasmodium berghei* invasion. *J. Biol. Chem.* 278(6), 4184-4193.

- Devenport, M., Fujioka, H., Jacobs-Lorena, M., 2004. Storage and secretion of the peritrophic matrix protein Ag-Aper1 and trypsin in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 13(4), 349-358.
- Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A., Kafatos, F.C., 1998. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *EMBO J.* 17, 6115-6123.
- Dimopoulos, G., Hans-Michael, M., Levashina, E.A., Kafatos, F.C., 2001. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 79-88.
- Dong, Y., Taylor, H.E., Dimopoulos, G., 2006. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol.* 4(7), 1137-1146.
- Duan, J., Mu, J., Thera, M.A., Joy, D., Pond, S.L.K., Diemert, D., Long, C., Zhou, H., Miura, K., Ouattara, A., Dolo, A., Doumbo, O., Su, X., Miller, L., 2008. Population structure of the genes encoding the polymorphic *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1: Implications for vaccine design. *PNAS.* 105(22) 7857-7862.
- Durell, S.R., Raghunathan, G., Guy, H.R., 1992. Modeling the ion channel structure of cecropin. *Biophys J.* 63(6), 1623-31.
- Dykxhoorn, D.M.; Novina, C.D., Sharp, P.A., 2003. Killing the messenger: short rnas that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 457-467.
- Fire, A., Xu, S.; Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.G., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.

- Garcia, G. E., Wirtz, R.A., Barr, J. R., Woolfitt, A., Rosemberg, R., 1998. Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. *J Biol Chem.* 273(20), 12003-12005.
- 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* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 38, 22–28.
- Han, Y.S, Salazar, C.E., Reese-Stardy, S.R., Corne, A., Gorman, M.J., Collins, F.H., Paskewitz, S.M., 1997. Cloning and characterization of a serine protease from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology.* 6(4), 385-395.
- Han, Q., Beerntsen, B.T., Li, J., 2007. The tryptophan pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. *J. Insect Physiol.* 53, 254-263.
- Hemingway, J., Craig, A., 2004. New ways to control malaria. *Science.* 303, 1984-1985.
- Hoa, N.T., Keene, K.M., Olson, K.E., Zheng, L., 2003. Characterization of RNA interference in an *Anopheles gambiae* cell line. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 33, 949-957.
- Hoffmann, J.A., 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature.* 426, 33–38.
- Horton, J., Ratcliffe, N.A., 2003. Evolução da Imunidade – Imunidade dos Invertebrados. Em: Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. *Imunologia.* Editora Manola. 6ª edição. Cap. 13, p. 211-218.
- Huber, M, Cabib E., Miller, L.H., 1991. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88,1-4.
- Hultmark, D., 2003. *Drosophila* immunity: Paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 12–19.

- Kawamoto, F., Alejo-Blanco R., Fleck, S.L., Sinden, R.E., 1991 *Plasmodium berghei*: ionic regulation and the induction of gametogenesis. *Exp. Parasitol.* 72(1), 33-42.
- Lavazec, C., Bonnet, S., Thiery, I., Boisson, B., Bourgouin, C., 2005. *cpbAg1* encodes an active carboxypeptidase B expressed in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Molec. Biol.* 14(2), 163–174.
- Lavazec, C., Boudin, C., Lacroix, R., Bonnet, S., Diop, A., Thiberge, S., Boisson, B., Tahar, R., Bourgouin, C., 2007. Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine. *Infect. Immun.* 75(4), 1635-1642.
- Lehane, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 535-550.
- Li, B., Paskewitz, S.M., 2006. A role for lysozyme in melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae*. *J. Insect Physiol.* 52, 936-942.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.-E., Smith, D.P., Wang, X., 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science.* 301, 1925-1928.
- Lozovei, A.L., 2001. Culicídeos (Mosquitos). Em: Marcondes, C.B., *Entomologia Médica e Veterinária*. São Paulo, Editora Atheneu. 1ª edição. Cap. 6, p. 59-103.
- Martin, S.K., Miller, L.H., Nijout, M.N., Carter, R., 1978. *Plasmodium gallinaceum*: induction of male gametocyte exflagellation by phosphodiesterase inhibitors. *Exp. Parasitol.* 44, 239-242.
- Meister, G., Tuschli, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 431, 343-349.

- Michel, K., Kafatos, F.C., 2005. Mosquito immunity against Plasmodium. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 35, 677-689.
- Montgomery, M.K., Fire, A., 1998. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. *Trends Genet.* 14, 255-258
- Montgomery, M.K., Xu, S., Fire, A., 1998. RNA as a target of Double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 15502-15507.
- Müller, H.M., Crampton, J.M., Dellatorre, A., Sinden, R. and Crisanti, A., 1993. Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. *EMBO J.* 12, 2891–2900.
- Müller, H.M., Catteruccia, F., Vizioli, J., Della Torre, A., Crisanti, A., 1995. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol.* 81(3), 371-385.
- Nijhout, M.N., Carter, R., 1978. Gamete development in malarial parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro. *Parasitology* 76, 39-53.
- Nijhout, M.N., 1979. *Plasmodium gallinaceum*: exflagellation stimulated by a mosquito factor. *Exp. Parasitol.* 48, 75-80.
- Osta, M.A., Christophides, G.K., Kafatos, F.C., 2004. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science.* 303, 2030–2032.
- Osta, M.A., Christophides, G.K.; Vlachou, D., Kafatos, F.C., 2004. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J. Exp. Biol.* 207(15), 2551-2563
- Pace, K.E., Baum, L.G., 2004. Insect galectins: Roles in immunity and development. *Glycoconjugate J.* 19, 607-614.

- Page, M.J., Di Cera, E., 2008. Serine peptidases, classification, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1220-1236.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* (29), 2002-2007.
- Pasloske, B.L., Howard, R.J., 1994. Malaria, the red cell, and the endothelium. *Annu. Rev. Med.* 45, 283-295.
- Potempa, J., Korzus, E., Travis, J., 1994. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 269(23), 15957-15960.
- Quan, G.X., Kim, I., Kômoto, N., Sezutsu, H., Ote, M., Shimada, T., Kanda, T., Mita, K., Kobayashi, M., Tamura, T., 2002. Characterization of the kynurenine 3-monooxygenase gene corresponding to the white egg 1 mutant in the silkworm *Bombyx mori*. *Mol. Genet. Genomics.* 267, 1–9.
- Ramasamy, M.S., Kulasekera, R., Wanniarachchi, I.C., Srikrishnaraj, K.A., Ramasamy, R., 1997. Interactions of human malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *P.falciparum*, with the midgut of *Anopheles* mosquitoes. *Med Vet Entomol.* 11(3), 290-296.
- Rey, L., 2001. Parasitologia. Guanabara Koogan. 3ª edição. Cap. 26, p. 336-348.
- Richman, A., Kafatos, F.C., 1995. Immunity to eukaryotic parasites in vector insects. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 14-19.
- Riehle, M.A., Srinivasan, P., Moreira, C.K., Jacobs-Lorena, M., 2003. Towards genetic manipulation of wild mosquito population to combat malaria: advances and challenges. *J. Exp. Biol.* 206, 3809-3816.

- Riehle, M.M., Markianos, K., Niaré, O., Xu, J., Li, L., Touré, A.M., Podiougou, B., Oduol, F., Diawara, S., Diallo, M., Coulibaly, B., Ouatarra, A., Kruglyak, L., Traoré, S.F., Vernick, K.D., 2006. Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. *Science*. 312, 577-579.
- Service, M.W., 1996. *Medical Entomology*. First Edition. London: Chapman & Hall.
- Shahabuddin, M.; Crisco, M., Kaslow, D.C., 1995. Unique specificity of in vitro inhibition of mosquito midgut trypsin-like activity correlates with in vivo inhibition of malaria parasite infectivity. *Exp. Parasitol.* 80, 212-219.
- Shahabuddin, M., Toyoshima, T., Aikawa, M., Kaslow, D.C., 1993. Transmission blocking activity of a chitinase inhibitor activation of malarial parasite chitinase by a mosquito protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90, 4266-4270.
- Shen, Z., Jacobs-Lorena, M., 1998. A type I peritrophic matrix protein from malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. *J. Biol. Chem.* 273(28), 17665-17670
- Shen, Z., Edwards, M.J., Jacobs-Lorena, M., 2000. A gut-specific serine protease from the malaria vector *Anopheles gambiae* is downregulated after blood ingestion. *Insect Mol. Biol.* 9(3), 223-229.
- Sinden, R.E., Croll, N.A., 1975. Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization of *Plasmodium yoelli nigeriensis*. *Parasitology*. 70, 53-65.
- Sinden, R.E., 1983. The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. *Parasitology*. 86, 7-28.
- Sinden, R.E., 1984. The biology of *Plasmodium* in the mosquito. *Experientia*. 40, 1330-1343.

SVS/MS – Situação epidemiológica da malária no Brasil, ano de 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2007_web.pdf>. Acessado em 04/06/2008.

Souza-Neto, J.A., Machado, F.P., Lima, J.B., Ribolla, P.E., 2007. Sugar digestion in mosquitoes: identification and characterization of three midgut alpha-glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 147(4), 993-1000.

Tellam, R.L., Wijffels, G., Willadsen, P., 1999. Peritrophic matrix protein. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 87-101.

Terra, W.R., 1996. Evolution and function of insect peritrophic membrane. *Ciência e Cultura L. Braz. Assoc. Advan.* 48, 317-324.

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

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F. e Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.

VectorBase – NIAID Bioinformatics Resource Center for Invertebrate Vector of Human Pathogens, 2008. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR003172>>. Acessado em 09.06.2008

Vizioli, J., Bulet, P., Charlet, M., Lowenberger, C., Blass, C., Müller, H.M., Dimopoulos, G., Hoffmann, J., Kafatos, F.C., Richman, A., 2000. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 9, 75-84.

- Vizioli, J., Catteruccia, F., della Torre, A., Reckmann, I., Müller, H.M., 2001. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *Eur. J. Biochem.* 268(14), 4027-4035.
- Xanthopoulos, K.G., Lee, J.-Y., Gan, R., Kockum, K., Faye, I., Boman, H.G., 1988. The structure of the gene for cecropin B, an antibacterial immune protein from *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 172, 371-376.
- Warr, E., Aguilar, R., Dong, Y., Mahairaki, V., Dimopoulos, G., 2007. Spacial and sex-specific dissection of the *Anopheles gambiae* midgut transcriptoma. *BMC Genomics.* 29, 8-37.
- WHO – World Health Organization. Malaria. Fact Sheet 94, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>>. Acessado em: 25/11/2007.
- WHO – World Health Organization. Malaria. Fact Sheet 94, 2007. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/global_cases.jpg>. Acessado em: 04/06/2008.
- Yoshida, S., Ioka, D., Matsuoka, H., Endo, H., Ishii, A., 2001. Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 89-96.
- Zou, G.-M., Yoder, M. C., 2005. Application of RNA interference to study stem cell function: current status and future perspectives. *Biol. Cell.* 97, 211-219.