

BIANCA BURINI KOJIN

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE REGIÕES DA PROTEÍNA CIRCUMSPOROZOÍTA DE *PLASMODIUM*
SP. EM *Aedes aegypti* INFECTADO POR *PLASMODIUM GALLINACEUM***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO
2009

BIANCA BURINI KOJIN

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE REGIÕES DA PROTEÍNA CIRCUMSPOROZOÍTA DE *PLASMODIUM*
SP. EM *Aedes aegypti* INFECTADO POR *PLASMODIUM GALLINACEUM***

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth de Lara Capurro Guimarães

SÃO PAULO
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Kojin, Bianca Burini.

Análise da expressão de regiões da proteína circunsporozoíta de *Plasmodium* sp. em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* / Bianca Burini Kojin. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Parasitologia. Linha de pesquisa: Mosquitos geneticamente modificados.

Versão do título para o inglês: Expression analyses of *Plasmodium* sp. Circunsporozoite protein regions in *Plasmodium gallinaceum* infected *Aedes aegypti*.

Descritores: 1. Mosquitos transgênicos 2. Vírus Sindbis 3. Proteína Circunsporozoíta 4. *Aedes aegypti* 5. *Plasmodium gallinaceum* I. Guimarães, Margareth de Lara Capurro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia III. Título.

ICB/SBIB0204/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bianca Burini Kojin.

Título da Tese: Análise da expressão de regiões da proteína circumsporozoíta de *Plasmodium* sp. em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

Orientador(a): Margareth de Lara Capurro Guimarães.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Campus Universitário "Pádua de Sá" - Ribeirão Preto
Av. Prof. Luiz Pimenta, 245 - CEP. 13063-000 Ribeirão Preto, SP - Brasil
Telefone: (16) (031) 2221.7122 - telefax: (16) (011) 2221.7412
e-mail: icb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **133** nas fls. **38** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Margareth de Lara Caputo-Quimariés**, Coordenadora da Linha de pesquisa "**Controle alternativo de mosquitos vetores**" do qual participaram(aram) os(as) alunos **Fabiana Feitosa, André L. da Costa da Silva, Ricardo V. Araújo, Eliana Burini, João Vicente Camargo e Silva, Ceres M. de Miranda, Thalita Borges**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.10.2006**.

São Paulo, 18 de outubro de 2006.

Prof. Dr. **UBIRATAN FABRES MACHADO**
Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. **PATRICIA CASTELUCCI**
Secretária da CEEA - ICB/USP

**DEDICO ESTA TESE AO AMOR DA MINHA VIDA, IURI
E A MINHA FAMÍLIA**

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer em primeiro lugar aos meus Pais, por todo incentivo e apoio, mesmo nas horas difíceis. É impossível descrever a gratidão por vocês, não só pelo suporte, mas por fazerem a minha vida muito feliz. Vocês são de longe os melhores.

Pai, obrigada por me ensinar a sonhar.

Mãe, obrigada por me ensinar a viver (e o português também!)

Ao meu Irmão, fonte de inspiração e de força. Você representa o sucesso pra mim, não só por ser o melhor advogado do MUNDO, mas por ser a pessoa mais linda que eu convivi nesta vida. E a Fá, por fazer ele feliz. Bem vinda!

Aos meus Maronos, mesmo sem entender muito o que eu tanto fazia na USP até tarde, sempre me apoiaram e me fizeram felizes durante toda a minha vida. Vocês são o meu Sol e a minha Lua e a minha Riqueza.

AO MEU MARIDO, AMOR DA MINHA VIDA, POR ME DAR APOIO E SER SEMPRE MAIS EU. EU SOU SEMPRE MAIS VOCÊ. PRA SEMPRE. TE AMO MAIS QUE TUDO.

Amo vos tanto!

À Profis, por sempre confiar no meu trabalho e me apoiar 100%, você me ensinou o mais importante: a amar muito o que eu faço. Obrigada por fazer do nosso laboratório um ambiente alegre para se trabalhar, eu fui extremamente feliz esses anos.

Ao Bianchi, por me ensinar bioquímica lá no comecinho, (só não sei se fui boa aluna!!!).

Ao Prof. Inverno, por me agredir gratuitamente no corredor sempre que possível. Queria agradecer também por me escutar e aconselhar nos momentos de dúvidas.

À Prof^a. Tânia, por todo o suporte e ser nossa superprotetora.

Ao Prof. Lincoln, por estar sempre preocupado em ajudar e sempre dando uma super atenção.

Ao Prof. Osvaldo, minha vida científica é dividida em A.O. e D.O.

Ao Prof. Anthony James por abrir a porta do seu laboratório para mim, foi uma experiência muito importante.

A todos do James Lab: Nijole, Judy, Alissa, Jennifer, Dolly, Olle, Alisson e Geetika, por me receberem tão bem, me ensinarem tanto e fazerem da minha vida na Califórnia muito feliz.

A todos do laboratório do Prof. Inverno: Dani, Ju, Fernando, Manoel e Maira por sempre ajudarem em tudo.

A todos do laboratório da Prof^a. Sirlei Daffre, principalmente Eliane, Andréa, Cláudia e Rodrigo por me ajudarem tanto com as análises do LC-MS/MS e também pelas aulas de bioquímica.

À Prof^a Silvia Alfieri e seus estudantes, Gabi, Aninha e a Beth.

Ao Prof. Mauro Marelli e Picachu, vocês me estenderam a mão e me valorizaram profissionalmente, nunca vou esquecer disso. E Picachu, você é meu parceiro para sempre!

Às meninas da secretaria: Vilminha, Ângela e Sandra, por estarem sempre dispostas a ajudar e fazerem tudo acontecer.

Ao laboratório da Prof^a. Myrna Bonaldo, pela ajuda na produção do Sindbis.

Às minhas Grandes Amigas: Ro, Dé, Aninha, Lu Catão e Ana Banana, por muuuitos anos estarem sempre comigo. Amo vocês demais.

À Fernandinha, por compartilhar os difíceis caminhos da pós graduação sempre do meu lado, me ensinar sobre vacinas e ser minha amiga incondicionalmente, sou sua amiga incondicionalmente também.

E a todos do Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados:

Neuzinha: você é muito especial e me ensinou a ser uma pessoa melhor.

Ediane: por compartilhar momentos engraçados no insetário.

Lurdes: Sem você o laboratório ficaria um desastre.

Ricardo: por ter me ensinado coisas que a vida científica não conseguiria explicar.

Fabi: por ter alegrado e compartilhado momentos importantes no lab. Só pra lembrar #1 friend!!!!

Andrezinho: por ser você e estar sempre perto. Você me ensinou sobre ciência, amizade, doação e caráter. Você é uma pessoa especial e um cientista brilhante. Obrigada por deixar eu fazer parte da sua vida.

Soraia: nem comento...tão pouco tempo e se tornar tão importante. Você faz a diferença, por ser Soraia, mãe, cientista e a sua história continua!!!!

Danilo: Saudades, Origami e Legging Rosa. Ah, Tsuru!!! Acho que isso você já entende tudo, né?

Johnny: por ter me dado uma amizade tão valiosa.

Dani: por me ensinar a seguir o coração.

Fernana e Tita: minha amigas Mackenzistas, por me apoiarem e serem super companheiras em todos os momentos. Têm ligações que ninguém consegue destruir.

Ceres: Obrigada. Você me ajudou a ser uma mulher mais forte.

Obrigada por me deixarem chamá-los de AMIGOS.

E aos novos cientistas: Laisinha, Valéria, Kelly e Diego: Boa Sorte neste novo caminho.

A ao inestimável apoio da minha amiga do peito FAPESP. Sem você teria ficado impossível a conclusão deste trabalho.

**“ESCOLHA UM TRABALHO QUE AMA E
NÃO TERÁ QUE TRABALHAR UM ÚNICO
DIA EM SUA VIDA”**

KUNG-FU-TZU

RESUMO

KOJIN, B. B. **Análise da Expressão de Regiões da Proteína Circumsporozoíta de *Plasmodium* sp. em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.** Tese - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Mosquitos transgênicos incapazes de transmitir malária podem ser um controle alternativo, mas atualmente não estão disponíveis. O estudo da interação mosquito-patógeno é importante para melhorar o desenho de genes. A proteína circumsporozoíta (CSP) tem dois domínios conservados que podem estar envolvidos na penetração dos esporozoítos na glândula salivar. Nosso objetivo foi expressar peptídeos contendo essas regiões na hemolinfa do mosquito usando o sistema de expressão transiente vírus Sindbis e a tecnologia de transgênese. Se a CSP está envolvida neste processo, os peptídeos competirão com spz impedindo a penetração. Cinco vírus sindbis e quatro linhagens transgênicas foram construídos e desafiados por *P. gallinaceum*. Nossos resultados mostram que os peptídeos não impediram a penetração de spz na glândula salivar, principalmente porque os peptídeos recombinantes não foram produzidos ou detectados. Aprimorar o desenho de genes, usando a otimização de códons e outras tecnologias, será essencial para a expressão de proteínas exógenas em mosquitos transgênicos.

Palavras-chave: Mosquitos transgênicos. Vírus sindbis. Proteína circumsporozoíta. *Aedes aegypti*. *Plasmodium gallinaceum*.

ABSTRACT

KOJIN, B. B. **Expression Analyses of *Plasmodium* sp. Circumsporozoite Protein Regions in *Plasmodium gallinaceum* infected *Aedes aegypti*.** 2009. Ph.D Thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Transgenic mosquitoes that impair malaria transmission can be an alternative control but currently an effective line is not available. A better understanding of mosquito interaction with pathogens is very important to improve refractory transgene design. Circumsporozoite protein (CSP) has two conserved domains that could be involved in spz penetration into mosquito salivary glands. Our aim was to express peptides encompassing these conserved regions in the mosquito hemolymph using Sindbis virus transient expression system and transgenesis technology. If CSP is involved in this process these peptides will compete with sporozoites impairing its penetration. Five Sindbis virus and four transgenic lines were constructed and challenged with *P. gallinaceum*. Our results showed these peptides could not impair sporozoites penetration in salivary glands, mainly because the recombinant proteins could not be produced or detected. Improving transgene design using codon usage and other technologies will be essential for expressing foreign proteins in transgenic mosquitoes.

Key words: Transgenic mosquitoes. Sindbis virus. Circumsporozoite protein. *Aedes aegypti*. *Plasmodium gallinaceum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição global das áreas de risco de transmissão de malária, 2003.....	24
Figura 2. Mapa de risco da malária por município de infecção, Amazônia Legal, 2007.....	25
Figura 3. Distribuição global dos vetores dominantes ou potencialmente importantes da malária.....	26
Figura 4. Ciclo de vida dos mosquitos <i>Anopheles</i> sp.....	27
Figura 5. Representação esquemática do ciclo de vida dos plasmódios.....	28
Figura 6. Representação esquemática da progressão do desenvolvimento do parasita da malária dentro do mosquito.....	29
Figura 7. Estrutura e funções da proteína circumsporozoíta.....	34
Figura 8. Representação esquemática da CSP de <i>Plasmodium</i> sp e os peptídeos recombinantes propostos neste projeto.....	66
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR referentes as construções, GARI, GBRII, GRIIC, FARI e FBRII.....	68
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA dos plasmídeos de clonagem.....	69
Figura 11. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das construções ARI, BRII e RIIC.....	69
Figura 12. Representação esquemática do vetor dsSindbis e da clonagem das construções CSP.....	70
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA dos plasmídeos de subclonagem dsSindbis.....	71
Figura 14. Estratégia de clonagem dos peptídeos recombinantes nos vetores de clonagem e de expressão transiente dsSindbis.....	72
Figura 15. Passos para a produção das partículas virais recombinantes.....	73
Figura 16. Fotomicrografia de células BHK-21 infectadas com dsSindbis recombinante.....	75
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos de mosquitos microinjetados com partículas virais.....	77

Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina e “Western Blot” de fêmeas de <i>A. aegypti</i> microinjetadas com as partículas virais recombinantes.....	79
Figura 19. Representação esquemática e mapa dos sítios de restrição do plasmídeo recombinante <i>pSLfa</i> [AeVg].....	83
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes as construções GARI e FARI.....	84
Figura 21. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão de DNA dos plasmídeos de clonagem TOPO-GARI e TOPO-FARI.....	85
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA dos plasmídeos de clonagem <i>pSLfa</i> [AeVg-GARI] e <i>pSLfa</i> [AeVg-FARI].....	86
Figura 23. Representação esquemática do vetor de transgênese <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP].....	87
Figura 24. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA dos plasmídeos de transgênese <i>piggyBac</i> [3XP3-eGFP-GARI] e <i>piggyBac</i> [3XP3-eGFP-FARI].....	88
Figura 25. Estratégia de clonagem dos peptídeos recombinantes no vetor de transgênese <i>piggyBac</i> [3XP3-eGFP].....	89
Figura 26. Detecção do gene repórter em mosquitos transgênicos para as construções <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-GARI] e <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-FARI] em microscópio de fluorescência.....	93
Figura 27. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes ao DNA genômico das linhagens transgênicas <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-GARI] P#1, P#4, F#8 e mosquitos não transgênicos.....	94
Figura 28. Autoradiografia de “Southern Blot” de DNA genômico da linhagem transgênica <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-FARI] P#3.....	95
Figura 29. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos da linhagem Higgs selvagem.....	96
Figura 30. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos da linhagem <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-GARI].....	97
Figura 31. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos da linhagem <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-GARI].....	98

Figura 32. Perfil cromatográficos (abundancia relativa de ionização x tempo) das frações eluídas provenientes da hemolinfa de <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-GARI] P#1 e selvagem.....	100
Figura 33. Perfil das frações eluídas provenientes da hemolinfa de <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-GARI] P#1 e selvagem.....	101
Gráfico 1. Análise comparativa da infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> em mosquitos <i>Aedes aegypti</i> microinjetados com partículas virais recombinantes referentes à região I dsSin-GARI e dsSin-FARI.....	80
Gráfico 2. Análise comparativa da infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> em mosquitos <i>Aedes aegypti</i> microinjetados com partículas virais recombinantes referentes à região II dsSin-GBRII e dsSin-GRIIC.....	81
Gráfico 3. Análise comparativa da infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> em mosquitos <i>Aedes aegypti</i> microinjetados com partículas virais recombinantes referentes à região II dsSin-FBRII.....	82
Gráfico 4. Análise comparativa da infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> em mosquitos <i>Aedes aegypti</i> transgênicos da construção <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-GARI] das linhagens P#1, P#4 e F#8.....	103
Gráfico 5. Análise comparativa da infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> em mosquitos <i>Aedes aegypti</i> transgênicos da construção <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-FARI] das linhagens P#3.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores das PCRs.....	50
Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores das PCRs utilizados no RT-PCR.....	56
Tabela 3. Número de embriões injetados que geraram prole com presença de GFP nos dois olhos.....	90
Tabela 4. Famílias de machos e pools de fêmeas formados, número de larvas analisadas e números de larvas positivas quanto a presença de GFP nos olhos, resultantes do experimento utilizando a construção <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-GARI].....	91
Tabela 5. Famílias de machos e pools de fêmeas formados, número de larvas analisadas e números de larvas positivas quanto a presença de GFP nos olhos, resultantes do experimento utilizando a construção <i>piggyBac</i> [3Xp3-eGFP-FARI].....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **DNA** – ácido desoxirribonucléico
- **RNA** – ácido ribonucléico
- **mRNA** - ácido ribonucléico mensageiro
- **cDNA** – DNA complementar
- **DNase** – desoxirribonuclease
- **dNTP** – desoxirribonucleotídeo trifosfato
- **IPTG** – isopropil-b-D-tiogalactopiranosídeo
- **X-Gal** – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosídeo
- **kb** – kilobases
- **pb** – pares de bases
- **kDa** – kilodaltons
- **LB** – meio de cultura Luria-Bertani
- **M** – molar
- **mM** – milimolar
- **Kg** - kilograma
- **mg** – miligrama
- **µg** – micrograma
- **ng** - nanograma
- **mL** – mililitro
- **µL** – microlitro
- **GFP** - proteína verde fluorescente
- **eGFP** – proteína verde fluorescente melhorada
- **PBS** – salina tamponada com fosfato
- **PCR** – reação em cadeia da polimerase
- **RT-PCR** – transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
- **UTR** – região não traduzida
- **SDS** – Duodecil sulfato de sódio
- **SDS-Tricina-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina

- **DTT** - ditioneitol
- **TEMED** – N, N, N', N', - tetrametil-etilenodiamina
- **LC-MS-MS** – cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
- **RP-HPLC** - cromatografia líquida de alta performance em fase reversa
- **SPZ** – esporozoítas
- **hsp70** – proteína de choque térmico 70
- **DO** – densidade ótica
- **rpm** – rotações por minuto
- **V** – volts
- **EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético
- **HRP** – peroxidase da raiz forte (*Azadirachta indica*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 OBJETIVO.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 ANIMAIS.....	45
3.2 MANUTENÇÃO DO CICLO <i>IN VIVO</i> DE <i>PLASMODIUM GALLINACEUM</i>.....	45
3.3 PLASMÍDEOS E REAGENTES.....	46
3.4 BACTÉRIAS.....	47
3.4.1 LINHAGENS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> UTILIZADAS.....	47
3.4.2 PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES.....	47
3.4.3 PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES.....	48
3.4.4 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES.....	48
3.4.5 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES.....	48
3.5 CÉLULAS.....	49
3.5.1 LINHAGENS DE CÉLULAS UTILIZADAS.....	49
3.5.2 CULTIVO DE CÉLULAS.....	49
3.6 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	50
3.6.1 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS RECOMBINANTES PELA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR).....	50
3.6.2 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	51
3.6.3 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA NOS VETORES.....	51
3.6.4 PURIFICAÇÃO DE DNA DE PLASMÍDEO.....	51
3.6.5 DIGESTÃO DOS VETORES TE 3' / 2J dsSINDBIS, pSLFA[AeVG] E PIGGYBAC[3XP3-EGFP] ATRAVÉS DE ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO.....	51
3.6.6 DESFOSFORILAÇÃO DOS VETORES TE 3' / 2J dsSINDBIS E PIGGYBAC[3XP3-EGFP].....	52
3.6.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	52

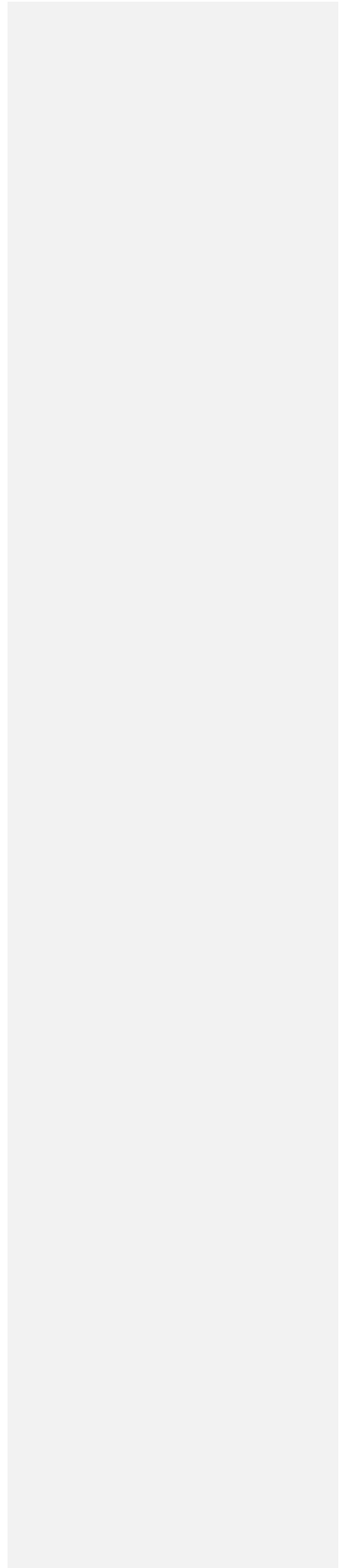
3.6.8 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA DE GEL DE AGAROSE.....	52
3.6.9 SEQÜENCIAMENTO DE FRAGMENTOS DE DNA.....	53
3.7 OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS DSSINDBIS RECOMBINANTES.....	53
3.7.1 PRODUÇÃO DE RNA VIRAL.....	53
3.7.2 TRANSFEÇÃO DE RNA VIRAL EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	53
3.7.3 TITULAÇÃO VIRAL.....	54
3.8 RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO.....	54
3.8.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL.....	54
3.8.2 TRATAMENTO DO RNA TOTAL COM A ENZIMA DNASE.....	55
3.8.3 SÍNTESE DE cDNA E PCR.....	55
3.9 "WESTERN BLOT"	56
3.9.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE TRICINA (SDS-TRICINA-PAGE).....	56
3.9.2 TRANSFERÊNCIA E DETECÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	57
3.10 EXPERIMENTO DE INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM GALLINACEUM</i> EM MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> MICROINJETADOS COM AS PARTÍCULAS VIRAIS DSSINDBIS RECOMBINANTES.....	57
3.11 MICROINJEÇÃO EM OVOS EMBRIONADOS DE <i>Aedes aegypti</i>.....	58
3.12 "SOUTHERN BLOT"	59
3.12.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	59
3.12.2 DIGESTÃO DE DNA GENÔMICO.....	60
3.12.3 TRANSFERÊNCIA POR "SOUTHERN"	60
3.12.4 MARCAÇÃO RADIOATIVA DA SONDA E HIBRIDAÇÃO.....	60
3.13 ANÁLISE DA HEMOLINFA DE FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> POR LC-MS/MS.....	61
3.13.1 EXTRAÇÃO DE HEMOLINFA.....	61
3.13.2 REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	61
3.13.3 DIGESTÃO DOS PEPTÍDEOS COM ENDOPEPTIDASE.....	61

3.13.4 CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA (RP-HPLC) ACOPLADA A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	62
3.14 EXPERIMENTO DE INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM GALLINACEUM</i> EM MOSQUITOS <i>Aedes Aegypti</i> TRANSGÊNICOS.....	63
4 RESULTADOS.....	64
4.1 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS RECOMBINANTES EM SISTEMA DE EXPRESSÃO TRANSIENTE (DSINDIBIS).....	65
4.1.1 CLONAGEM DAS SEQÜÊNCIAS CODIFICADORAS I E II NO PLASMÍDEO pGEM®-T.....	68
4.1.2 SUBCLONAGEM DAS SEQÜÊNCIAS CODIFICADORAS I E II NO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO TRANSIENTE DSINDBIS.....	70
4.1.3 PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS VIRAIS RECOMBINANTES.....	73
4.1.4 DETECÇÃO DE MRNA CODIFICADOR DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM MOSQUITOS <i>Aedes Aegypti</i> MICROINJETADOS COM PARTÍCULAS VIRAIS...	76
4.1.5 "WESTERN BLOT" DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM MOSQUITOS <i>Aedes Aegypti</i> MICROINJETADOS COM PARTÍCULAS VIRAIS.....	77
4.1.6 COMPARAÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM GALLINACEUM</i> EM MOSQUITOS <i>Aedes Aegypti</i> MICROINJETADOS COM PARTÍCULAS VIRAIS RECOMBINANTES.....	78
4.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE <i>Aedes Aegypti</i>.....	83
4.2.1 CONSTRUÇÃO DOS TRANSGENES.....	83
4.2.2 CLONAGEM DA SEQÜÊNCIA CODIFICADORA DA REGIÃO I NO VETOR TOPO® TA CLONING.....	84
4.2.3 SUBCLONAGEM DA SEQÜÊNCIA CODIFICADORA DA REGIÃO I NO VETOR pSLFA[AeVG].....	85
4.2.4 SUBCLONAGEM DA SEQÜÊNCIA CODIFICADORA DA REGIÃO I NO VETOR DE TRANSGÊNESE PIGGYBAC[3XP3-EGFP].....	87
4.2.5 PRODUÇÃO DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE <i>Aedes Aegypti</i>.....	90
4.2.6 PCR DE DNA GENÔMICO DA LINHAGEM PIGGYBAC[3XP3-EGFP-GARI].....	93

4.2.7 "SOUTHERN BLOT" DA LINHAGEM <i>PIGGYBAC</i>[3Xp3-EGFP-FARI].....	94
4.2.8 ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DO TRANSGENE ATRAVÉS DE RT-PCR SEMI QUANTITATIVO.....	95
4.2.9 ANÁLISE DA HEMOLINFA DE FÊMEAS DE <i>AEDES AEGYPTI</i> POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA (RP-HPLC) ACOPLADA A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	99
4.2.10 ANÁLISE COMPARATIVA DA INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM GALLINACEUM</i> DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS OBTIDAS.....	102
5 DISCUSSÃO.....	106
6 CONCLUSÃO.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXOS.....	130



INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI é o controle de doenças transmitidas por vetores. Responsáveis por causarem grande impacto na saúde pública e no desenvolvimento socioeconômico dos países afetados, doenças como a malária, leishmaniose, dengue e febre amarela respondem por mais de 2 milhões de mortes anuais.

Malária, a enfermidade mais representativa entre as doenças transmitidas por vetores, somente no ano de 2006 foi responsável por 247 milhões de casos sendo que estes levaram a 881 milhões de mortes no mundo, a maioria crianças com menos de 5 anos de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WORLD MALARIA REPORT, 2008).

A maior parte dos casos ocorre na região Africana seguida do sudeste da Ásia, no entanto de acordo com a organização mundial da saúde 109 países atualmente são considerados endêmicos para esta doença (Figura 1).

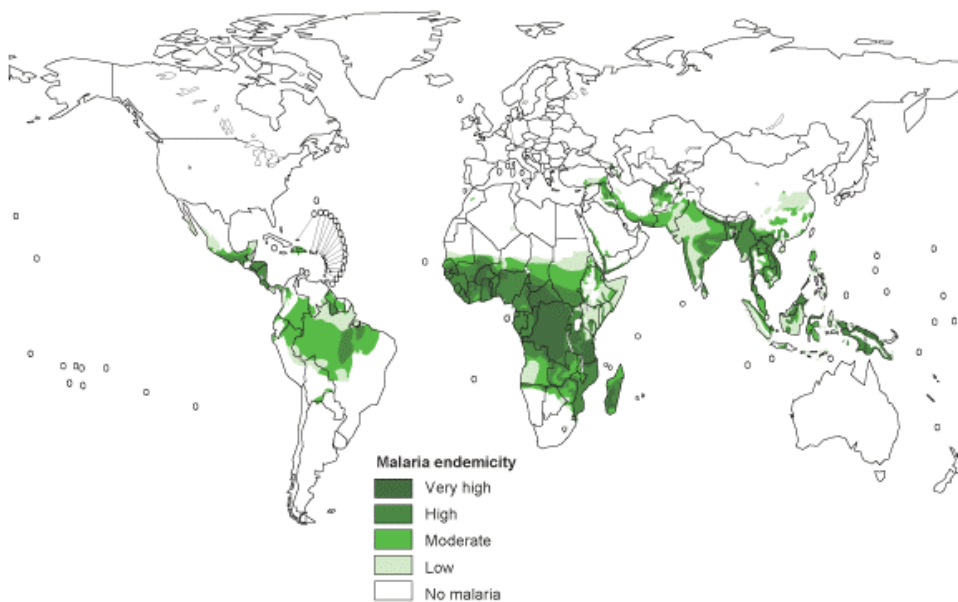


Figura 1. Distribuição global das áreas de risco de transmissão de malária, 2003.
FONTE: Modificado de World Malaria Report 2005.

Aproximadamente 99,5% dos casos de malária no Brasil ocorrem na Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. Foram notificados nesta região no ano de 2007, 457.659 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Na figura 2 podemos verificar o nível de risco de transmissão nos estados do Brasil.

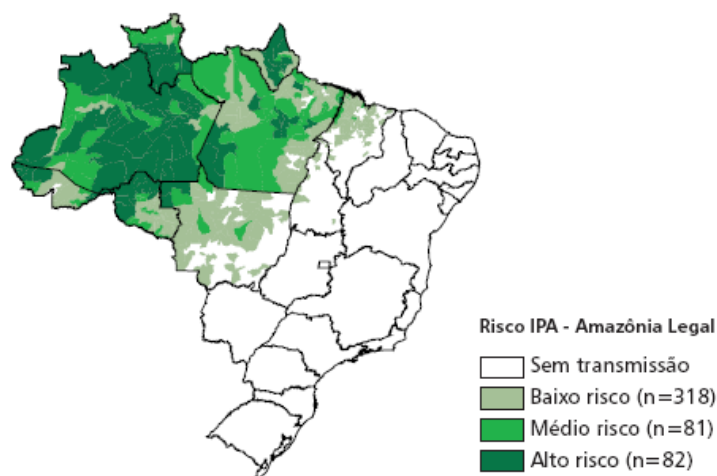


Figura 2. Mapa de risco da malária, Amazônia Legal, 2007.

Baixo risco IPA < 10; médio risco IPA 10-49; alto risco IPA > 50.

FONTE: Modificado de Situação Epidemiológica da Malária no Brasil 2008. (www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf).

Os mosquitos do gênero *Anopheles* são responsáveis pela transmissão do parasita da malária. Existem aproximadamente 430 espécies deste gênero, mas apenas 30 a 40 são capazes de transmitir a doença (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009). Eles estão amplamente distribuídos no mundo e a maioria se encontra nas regiões úmidas dos trópicos e subtropicais. Na figura 3 fica evidenciada a ampla distribuição dos vetores dominantes de regiões endêmicas ou potencialmente endêmicas.

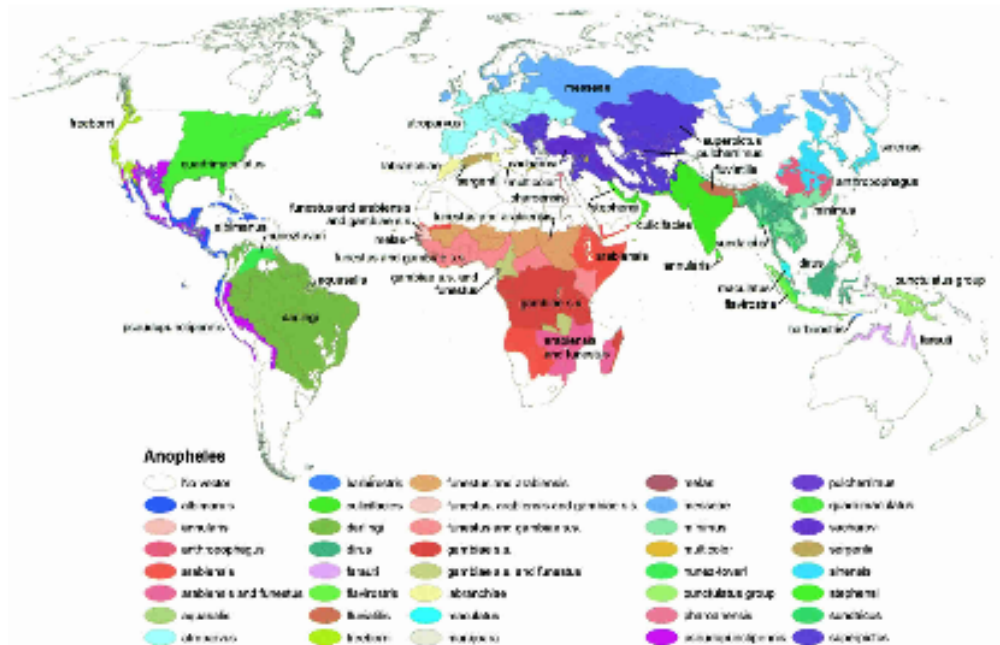


Figura 3. Distribuição global dos vetores dominantes ou potencialmente importantes da malária.

FONTE: Modificado de Kizsewiski, et al. (2004).

Entre as espécies de grande importância transmissora na região Africana se destacam o *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus*. Já o *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis* são as espécies relevantes na região das Américas (REY, 2008).

Os mosquitos são insetos com desenvolvimento holometábolo (metamorfose completa) tendo um ciclo de vida que dura aproximadamente 7 a 9 dias na sua fase larval, 1 a 2 dias de período pupal e após a emergência dos adultos, as fêmeas podem viver aproximadamente 50 dias e os machos adultos vivem de 20 a 30 dias. (Figura 4). Fêmeas adultas necessitam de alimentação sanguínea para a obtenção de nutrientes que serão utilizados na produção dos ovos (processo de vitelogênese). Durante a fase adulta, essas fêmeas estão aptas a oviposição 72 horas após cada alimentação sanguínea.

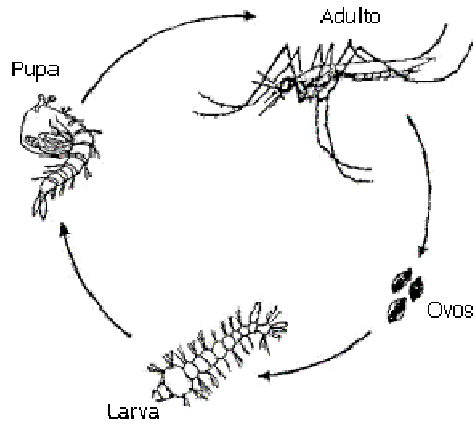


Figura 4. Ciclo de vida dos mosquitos *Anopheles* sp.

FONTE: Modificado de Wiki Educator (www.wikieducator.org/Lesson_10:Malaria).

O agente etiológico desta doença é o parasita pertencente à família Plasmodiidae, e ao gênero *Plasmodium*. Há quase 100 espécies de plasmódios e apenas 4 infectam humanos, dentre eles *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* (REY, 2008). Destas espécies, o *Plasmodium falciparum* é o responsável pela forma grave e pelas mortes atribuídas à malária e é o mais prevalente na África, na região sul do Saara, e em certas áreas do Sudoeste da África e do Pacífico Ocidental. A segunda espécie de malária mais comum é o *Plasmodium vivax*, que é encontrado na maior parte da Ásia, partes das Américas, Europa e Norte da África (WHO, WORLD MALARIA REPORT, 2008).

O ciclo de vida dos plasmódios é extremamente complexo e compreende fases assexuadas e sexuadas. A fase sexuada ocorre dentro do mosquito (hospedeiro definitivo) e a fase assexuada dentro do homem (hospedeiro intermediário) (Figura 5).

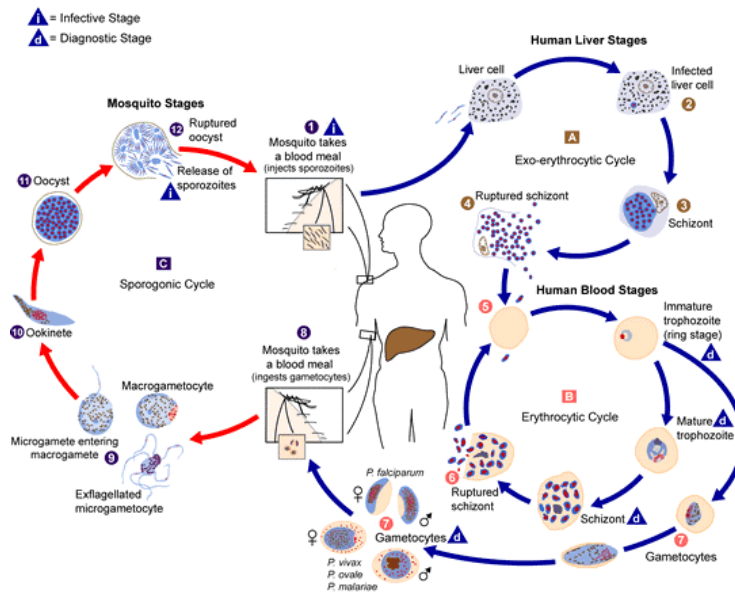


Figura 5. Representação esquemática do ciclo de vida dos plasmódios.

As setas vermelhas indicam o ciclo esporogônico, que ocorre dentro do hospedeiro definitivo, o mosquito. As setas azuis indicam o ciclo tanto eritrocítico quanto o exo-eritrocítico que ocorre dentro do hospedeiro intermediário, o homem.

FONTE: Modificado de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (www.cdc.gov)

Durante a tomada de sangue de um hospedeiro infectado, o mosquito ingere parasitas no estágio sexual - os microgametócitos (machos) e macrogametócitos (fêmeas) - que permanecem no seu trato digestivo por algumas horas onde ocorre exflagelação do microgametócito seguida de fertilização. Após a fertilização, os parasitas sofrem modificações estruturais, resultando numa forma móvel, o oocineto, que penetra pelo epitélio do trato digestivo, alojando-se entre as células epiteliais e a lâmina basal. O oocineto desenvolve-se até a forma de oocisto, que entra em processo de esporogonia, liberando na hemocele do inseto milhares de esporozoítos. Estas formas livres invadem as glândulas salivares, permanecendo nesse órgão até o mosquito tomar outra alimentação sanguínea, infectando assim um novo hospedeiro vertebrado (ECKER et al., 2008) (Figura 6). Uma vez injetados no hospedeiro vertebrado, migram para o fígado e invadem os hepatócitos onde amadurecem em esquizontes que se rompem liberando os merozoítas no sistema

circulatório. No sangue estes invadem os eritrócitos que se reproduzem e geram novos merozoítas. Este ciclo então continua, levando aos sinais clínicos da doença. Alguns merozoítas se diferenciam em gametócitos, que serão ingeridos pelo mosquito, iniciando novamente o ciclo (VAUGHAN; ALY; KAPPE, 2008).

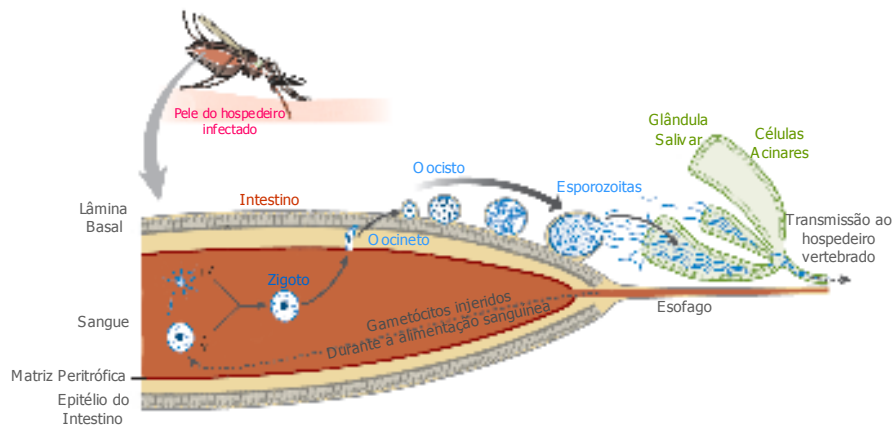


Figura 6. Representação esquemática da progressão do desenvolvimento do parasita da malária dentro do mosquito.
 FONTE: Modificado de Aly, et al. (2009).

O controle da malária, pode ser feito através de tratamento dos pacientes, com a utilização de antimaláricos, ou pelo controle do vetor através de inseticidas residuais dentro das casas; medidas de proteção pessoal como redes impregnadas com inseticidas (BedNets), repelentes e inseticidas domésticos; utilização de larvicidas químicos ou agentes biológicos e por último gerenciamento ambiental (WHO, Vector Control for Malaria and Other Mosquito Borne Diseases, 1995).

Atualmente o controle se faz apenas através de redes impregnadas com inseticidas, utilização de inseticidas residuais dentro das casas (*Indoor Residual Spraying* - IRS) e tratamento dos pacientes (ENAYATI e HEMINGWAY, 2009; WHO, World Malaria Report, 2008).

Mesmo com inúmeras opções de controle, a incidência da malária continua aumentando como resultado das mudanças ecológicas que afetam a composição e densidade das populações dos anofelinos transmissores de malária. O desmatamento, a construção de barragens para fins hidroelétricos, aumento da população humana assim como as migrações, a urbanização, guerras, desastres naturais, mineração, industrialização, agricultura e por último, as mudanças

climáticas, estão causando mudanças ambientais nas áreas endêmicas, incrementando a interação entre as populações humanas e os mosquitos vetores, e com isso trazendo um aumento na incidência da doença (GRATZ, 1999; REITER, 2001; SUTHERST, 2004).

A ausência de uma vacina eficaz contra malária, a propagação de parasitas resistentes às drogas quimioterápicas, assim como o aumento da resistência a inseticidas nas populações de mosquitos vetores (CRAMPTON et al., 1992), faz com que exista a necessidade de desenvolver novas estratégias para o controle da transmissão destes agentes patogênicos.

Uma via razoável para o desenvolvimento de novas estratégias pode ser originada de estudos sobre a fisiologia, imunologia, bioquímica e biologia molecular de insetos vetores. Programas alternativos de controle deverão ser baseados num detalhado entendimento da interação que ocorre entre os parasitas e o hospedeiro vertebrado, assim como com os vetores (HURD, 1994). Uma alternativa mais inovadora para o controle das doenças transmitidas por mosquitos é a manipulação genética das populações naturais visando reduzir a eficácia dos mosquitos como vetores da doença (SEVERSON; BROWN; KNUDSON, 2001).

Essa alternativa se baseia na hipótese da introdução na população de um inseto vetor, portador de um gene que confere resistência contra um patógeno. Para testar esta hipótese, o gene ou alelo que interfere com o desenvolvimento do patógeno ou sua propagação tem que ser descoberto ou desenvolvido, e subseqüentemente inserido no inseto vetor. Após a implementação desta estratégia, deverá ser observado um decréscimo da transmissão da doença (CURTIS e GRAVES, 1988; JAMES, 2001).

Durante a passagem dos plasmódios pelo interior dos mosquitos, vários são os pontos alvo para o bloqueio do ciclo de vida do parasita: as formas intestinais como os gametócitos, zigotos, oocineto e oocisto e as formas presentes na hemolinfa como os esporozoítas. Durante essas transições no desenvolvimento, existem períodos de expansão numérica seguida de gargalos (VERNICK; BARREAU; SEELEY, 1995). De inúmeros gametócitos ingeridos, poucos resultarão em oocistos. No entanto apenas 1 oocisto é capaz de originar 5000 esporozoítas e apenas uma fração destes vão invadir com sucesso as glândulas salivares (ROSENBERG e RUNGSIWONGSE, 1991).

Algumas moléculas já foram testadas contra as formas de maior gargalo do desenvolvimento do parasita, as quais estão presentes no intestino como o oocisto (GOSH et al., 2009; RODRIGUES et al., 2006; DINGLASAN et al., 2007; ITO et al., 2002; MOREIRA et al., 2002), porém nenhuma delas foi capaz de inibir 100% o progresso do ciclo. Nenhuma molécula isoladamente foi capaz de bloquear a transmissão dos parasitas de malária. Uma das idéias associada a esta estratégia é utilizar duas a três moléculas efetoras que atuem por diferentes mecanismos de interação com um único estágio do desenvolvimento ou contra diferentes estágios dos parasitas. Para isso, diferentes moléculas efetoras estão sendo estudadas atualmente em vários laboratórios do mundo, como por exemplo anticorpos recombinantes contra esporozoítos (Dr. Anthony James), peptídeos que interagem com os receptores de trato digestivo e glândulas salivares (Dr. Marcelo Jacobs-Lorena) e peptídeos antimicrobianos que promovem a morte celular de esporozoítas (Dr^a. Margareth L. Capurro).

Os esporozoítas são as formas infectantes dos parasitas da malária, presentes na hemolinfa e na glândula salivar do mosquito *Anopheles* e são únicos quanto à habilidade em invadir dois tipos de células: as da glândula salivar do mosquito e as células do hospedeiro vertebrado, sendo as mais versáteis formas de invasão no ciclo de vida do *Plasmodium* (SINDEN, 1985). Durante a passagem pelo mosquito vetor e hospedeiro vertebrado, o esporozoíto manifesta diversos comportamentos, incluindo locomoção por deslizamento ("gliding motility"), invasão, e migração através das células alvo (KAPPE; KAISER; MATUSCHEWSKI, 2003).

Os mecanismos pelos quais os esporozoítos localizam e invadem a glândula salivar são desconhecidos, embora a especificidade de célula alvo sugira tratar-se de um evento mediado por receptor.

Um estudo mostrou que *Plasmodium knowlesi* é capaz de se desenvolver em oocistos, mas os esporozoítas não conseguem invadir a glândula salivar de *Anopheles freeborni*. Quando as glândulas deste mosquito foram transplantadas para *Anopheles dirus* (mosquito completamente suscetível), *Plasmodium knowlesi* falhou em invadir a glândula transplantada, entretanto foram capazes de invadir as glândulas de *Anopheles dirus* transplantadas em *Anopheles freeborni*, mostrando que a interação esporozoíta-glândula salivar é espécie específica (ROSENBERG, 1985).

Os esporozoítas se ligam preferencialmente a lobo medial e na porção distal dos lobos laterais (STERLING; AIKAWA; VANDERBERG, 1973; PIMENTA; TOURAY; MILLER, 1994; GOLENDÁ; STARKWETHER; WIRTZ, 1990). Anticorpos monoclonais gerados contra proteínas de glândula salivar, além de se ligarem a estas porções da glândula, foram capazes de reduzir o número de parasitas dentro deste tecido (BRENNAN et al., 2000). Outro estudo mostrou que a invasão da glândula salivar de *Aedes aegypti* por *Plasmodium gallinaceum* também foi inibida por anticorpos anti glândula e também por lectinas (BARREAU et al., 1995).

Touray et al. (1992) mostraram ainda que esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum*, uma vez que penetraram na glândula salivar de *Aedes aegypti*, se tornaram incapazes de reinvasir este órgão, mas que esporozoítas de oocistos conseguem realizar a invasão, indicando que existe diferença entre os ligantes de superfície entre esses dois estágios.

Esses dados fortemente suportam a hipótese de que existam receptores específicos presentes na superfície da glândula salivar dos mosquitos que permitem a invasão dos esporozoítas.

Inúmeras proteínas expressas durante a fase de esporozoíta, já foram caracterizadas através de genética reversa (ALY; VAUGHAN; KAPPE, 2009) e três destas proteínas têm demonstrado um papel importante no reconhecimento dos receptores da glândula salivar, a proteína TRAP (Thrombospondin-related anonymous protein), a MAEBL e a proteína circumsporozoíta (CSP) (ROBSON et al., 1998; KAPPE et al., 1998; KRETTLI et al., 1988; NUSSENZWEIG e NUSSENZWEIG, 1986; MÈNARD, 2000).

A proteína TRAP (Thrombospondin-related anonymous protein) é encontrada nos micronemas e na superfície de esporozoítas (ROGERS et al., 1992), e está envolvida na ligação e invasão da glândula salivar de mosquitos (KAPPE et al., 1999; MATUSCHEWSKI et al., 2002; SULTAN et al., 1997; WENGELNIK et al., 1999)

Experimentos de "knock-out" gênico em *Plasmodium berghei* mostraram que TRAP é essencial para a invasão nas glândulas salivares de mosquitos e hepatócitos de camundongos assim como para o "gliding motility" mas não é vital para a formação dos esporozoítas (SULTAN et al., 1997).

Linhagens de *Plasmodium berghei* que possuíam substituições ou deleções nas regiões adesivas, como o domínio A ou TSR foram incapazes de invadir a

glândula salivar, no entanto somente as linhagens contendo alterações no TSR não puderam realizar o "gliding motility", indicando o papel da TRAP no reconhecimento e invasão das glândulas salivares pelo esporozoíta, e que este processo é independente da sua mobilidade (WENGELNIK et al., 1999).

Anticorpos anti Saglina (molécula expressa na superfície dos lobos distais da glândula salivar de *Anopheles*) causaram uma redução de aproximadamente 75% na invasão da glândula por *Plasmodium yoelii* (BRENNAN et al., 2000). Em um outro estudo foi mostrado que o peptídeo SM1 que se liga a superfície da glândula salivar e no epitélio intestinal de *Anopheles stephensi* (GOSH; RIBOLLA; JACOBS-LORENA, 2001) interage com a Saglina e que anticorpos anti SM1 são capazes de reconhecer a proteína TRAP, demonstrando que esse peptídeo compartilha similaridades estruturais com a TRAP e que a relação TRAP/Saglina é crucial para a invasão de esporozoítas na glândula salivar (GOSH et al., 2009).

Outra proteína que tem um papel específico na invasão da glândula salivar e a menos estudada é a MAEBL.

O gene da MAEBL foi primeiramente identificado em parasitas murinos como *Plasmodium yoelii* e *Plasmodium berghei*, e é altamente conservado entre os plasmódios, incluindo *Plasmodium falciparum* (KAPPE et al., 1998). Baseado em similaridades estruturais o MAEBL é classificada como membro de uma família de proteínas adesivas de merozoítas chamada família *eb1* a qual inclui proteínas de ligação a eritrócito codificada por genes de *Plasmodium falciparum* como *eb1-1*, *baeb1*, *peb1*, *jeseb1* e *maeb1* (ADAMS et al., 2001).

Foi inicialmente relatada como uma proteína de merozoíta (KAPPE et al., 1998) mas posteriormente ela foi encontrada fortemente expressa nos esporozoítas e sua expressão bastante reduzida após a invasão da glândula salivar. Utilizando parasitas deficientes para MAEBL, foi mostrado que esta proteína é essencial para invasão da glândula salivar e que diferente da CSP e TRAP, não está envolvida no "gliding motility" e nem na invasão do hospedeiro vertebrado (KARIU et al., 2002).

A CSP é a proteína de superfície mais abundante de esporozoítos infectantes cobrindo uniformemente sua membrana. Ela possui propriedades imunológicas e estruturais similares dentre várias espécies de plasmódios (NUSSENZWEIG e NUSSENZWEIG, 1985).

A CSP é codificada por um gene de cópia única (OSAKI et al., 1983) e é composta de 400 aminoácidos possuindo um largo domínio imunodominante que consiste de pequenos peptídeos repetidos em tandem (domínio central). Flanqueando essa região existem dois domínios que por análise de similaridade entre as seqüências das CSPs de vários *Plasmodium* são altamente conservados. Esses domínios são denominados de região I e região II. Nas porções N-terminal e C-terminal existem trechos de aminoácidos hidrofóbicos que constituem respectivamente o peptídeo sinal e a âncora GPI (Figura 7) (NUSSENZWEIG e NUSSENZWEIG, 1985).

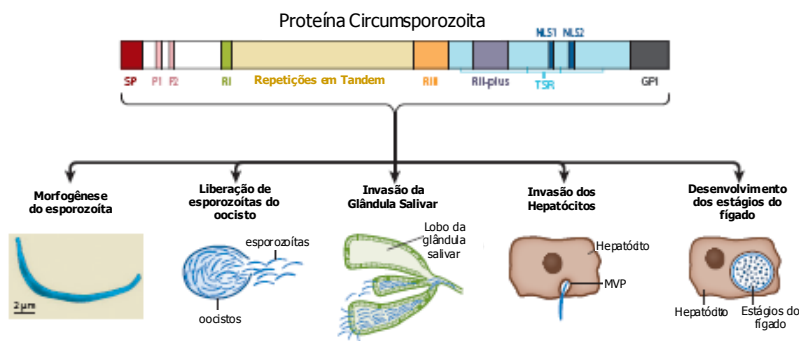


Figura 7. Estrutura e funções da proteína circunsporozoíta.

Representação esquemática da estrutura da CSP contendo, o peptídeo sinal (SP), motivos de exportação de proteína PEXEL/VTS 1 e 2 (P1 e P2), Região I (RI), regiões conservadas de repetição (repetições em tandem), região III (RIII) região II plus (RII), domínio relacionado a trombospondina (TSR) Sinal bipartido de localização nuclear (NLS1 e 2) e âncora GPI (GPI). As múltiplas funções da CSP estão esquematicamente mostradas. MPV: membrana do vacúolo parasitóforo.

A região I é composta da seqüência consenso KLKQP, enquanto que a região II é composta de 20 aminoácidos EWSXCXVTCGXG(V/I)XXRX(K/R) e possui alta similaridade com a repetição tipo 1 da trombospondina (TSP) humana. Existe ainda a região III, importante por formar a α -hélice anfipática e responsável pelo dobramento adequado da vizinhança da região II (KAPPE; BUSCAGLIA; NUSSENZWEIG, 2004).

A CSP é uma proteína multifuncional. Linhagens de *Plasmodium berghei*, nas quais o gene de CSP foi deletado, produziram números de oocistos iguais à linhagem

selvagem, no entanto a formação de esporozoítas foi profundamente inibida, indicando que a CSP é vital para o desenvolvimento do parasita no mosquito (MÈNARD et al., 1997).

Foi mostrado também que esporozoítas de *Plasmodium berghei* mutantes, nos quais a região II foi substituída por alaninas, foram incapazes de sair dos oocistos e invadir camundongos jovens (WANG; FUJIOKA; NUSSENZWEIG, 2005). Além disso CSP está relacionada com a morfogênese do esporozoíto, invasão dos hepatócitos e desenvolvimento dos estágios do ciclo exoeritrocítico (Figura 7) (THATHY et al., 2002; SINNIS e NARDIN, 2002; TEWARI et al., 2002)

A proteína circumsporozoíta por ser a proteína de superfície mais abundante, é uma provável candidata a ser o ligante inicial para o reconhecimento da glândula salivar de mosquitos.

Embasando essa hipótese, Sdjanski, et al. (1997), demonstraram que a CSP se liga à glândula salivar, mais especificamente ao lobo medial e na porção distal dos lobos laterais, e não a outros órgãos banhados pela hemolinfa. Foi mostrado também utilizando o sistema murino, que o peptídeo sintético que corresponde à região I da CSP de *P. berghei*, interfere no processo de ligação do esporozoíto na glândula "in vitro". Esses autores sugerem que a pequena região I, que é composta por 5 aminoácidos, é necessária, mas não é suficiente para atividade inibitória, sendo que alguns resíduos a montante dessa região também são importantes.

Além disso, em estudos mais recentes, utilizando-se peptídeos sintéticos que foram desenhados a partir das seqüências das CSP de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium yoelii* que incluem a região I, foi verificado que o peptídeo KADPPKEAQNKLKQPVAD, quando injetado intratoracicamente em *Anopheles stephensi* infectados por *Plasmodium yoelii*, conseguiu inibir a invasão dos esporozoítos na glândula salivar em até 80% sugerindo que a porção N-terminal da CSP está envolvida no processo de invasão dos esporozoítas na glândula (MYUNG; MARSHALL; SINNIS, 2004).

Tewari et al. (2002) no estudo com linhagens de *Plasmodium berghei* transgênicos mostraram que a deficiência na região I da CSP, não prejudicou nem a motilidade nem a infectividade desses parasitas. Enquanto que a deficiência na região II aboliu a motilidade do esporozoíta e prejudicou dramaticamente sua habilidade de invadir a glândula salivar e infectar o hospedeiro vertebrado,

levantando uma controvérsia sobre qual é a região da CSP que realmente está envolvida no reconhecimento da glândula salivar pelos esporozoítas.

Com os recentes avanços na biotecnologia como a reação em cadeia da polimerase, avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA e na computação, impulsionaram o crescimento da biologia molecular, criando novas áreas de estudo como a genômica, proteômica e a bioinformática.

Dentro deste cenário, a tecnologia de transformação genética, possibilita a introdução de genes exógenos em insetos, tanto temporariamente como permanentemente, com o intuito de identificar ou testar genes. Esta tecnologia permite ainda a alteração genotípica de insetos com o propósito de controle de doenças sem a utilização de reagentes químicos, e portanto sem prejudicar o ambiente.

A transformação genética permanente se tornou uma realidade graças aos estudos genéticos desenvolvidos por Bárbara McClintock que mostravam elementos móveis capazes de regular a expressão de genes de pigmento em milho, inibindo ou modulando sua ação (MCCLINTOCK, 1953). Mais tarde, esses elementos foram denominados elementos de transposição e tiveram um papel crucial na inserção de genes no genoma de insetos.

Somente 29 anos depois foi publicada a primeira transformação de um inseto com a utilização do elemento P de transposição para introduzir genes nas células germinativas de *Drosophila* (RUBIN e SPRADLING, 1982). No entanto o elemento P se mostrou ineficiente em transformar outros insetos, podendo somente ser utilizado para transformação de moscas pertencentes ao gênero *Drosophila*.

A transformação estável de culicídeos tornou-se uma realidade apenas no final da década de 90 com a utilização de dois elementos de transposição, *Hermes* da família de transposons *hTA* proveniente de *Musca domestica* (JASINSKIENE et al., 1998) e o elemento *Mos 1 Mariner* proveniente de *Drosophila mauritiana* (COATES et al., 1998), que foram capazes de transformar *Aedes aegypti*.

Dois outros elementos também foram empregados na transformação de culicídeos, *Minos* proveniente de *Drosophila hydei* (CATTERUCCIA et al., 2000; LYCETT et al., 2004; YOSHIDA e WATANABE, 2006) e *piggyBac*, proveniente de *Trichoplusia nii* (KOKOZA et al., 2001b; PERERA; HARRELL; HANDLER, 2002;

RODRIGUES et al., 2006; NOLAN et al., 2002; GROSSMAN et al., 2001; KIM et al., 2004).

O elemento de transposição *piggyBac*, é da Classe II de transposon (não envolve RNA intermediário no seu mecanismo de transposição), seu tamanho é de 2.5 kb e as suas seqüências invertidas terminais repetitivas tem 13 pb de extensão e a seqüência traduzida possui 2.1 kb (HANDLER, 2001).

Este elemento tem chamado especial atenção por ser um dos melhores candidatos para a transformação de insetos. É caracterizado pela sua alta especificidade na seqüência alvo de inserção (sítios TTAA), mecanismo preciso de integração e amplo espectro de espécies transformadas quando comparado aos outros elementos (HANDLER, 2001).

Para produzir uma linhagem transgênica, além dos elementos de transposição, são necessários: genes marcadores, o gene a ser estudado, eficiência na transformação e eficiência na técnica de transformação.

Os genes marcadores são uma ferramenta que permite a identificação dos indivíduos transformados de uma maneira rápida e eficiente. Primeiramente foram utilizados marcadores através de resistência a antibióticos (MILLER et al., 1987). Porém a utilização destes marcadores pode ser extremamente problemática em insetos, levando a falsos positivos devido a problemas no antibiótico, além disso os insetos realmente transformados podem ser perdidos, caso o nível de expressão do gene não consiga acarretar em resistência ao antibiótico.

Em trabalhos mais recentes foram utilizados marcadores de genes para pigmentação dos olhos de *Aedes aegypti* e *Ceratitis capitata* (LOUKERIS et al., 1995; COATES et al., 1998; JASINSKIENE et al., 1998), mas esse marcador também possuía suas limitações podendo ser somente utilizado em espécies nas quais houvesse mutantes para a cor dos olhos.

Atualmente o gene marcador mais utilizado é o GFP (Green Fluorescent Protein), que possibilita a identificação rápida e confiável de indivíduos transformados.

O gene da GFP foi inicialmente clonado da água viva *Aquorea victoria* (PRASHER et al., 1992) e desde então inúmeras espécies foram transformadas com essa proteína como *Caenorhabditis elegans* (CHALFIE et al., 1994), *Drosophila melanogaster* (YEH; GUSTAFSON; BOULIANNE, 1995), células de mamíferos

(PINES, 1995), levedura (NIEDHENTAL et al., 1996) entre outros, demonstrando sua versatilidade.

O grande avanço para identificação de insetos transformados ocorreu através da GFP dirigida pelo promotor 3XP3, que tem sua expressão em células fotoreceptoras, e confere uma forte expressão permitindo a sua visualização, mesmo com inserções únicas do transgene. O seu pequeno tamanho (~1.3 kilobases) confere uma grande vantagem, pois permite que o transgene seja menor, conferindo taxas maiores de transformação (BERGHAMMER; KLINGLER; WIMMER, 1999).

Toda essa maquinaria para a integração de genes exógenos no genoma de inseto, permitiu que tanto regiões regulatórias quanto seus produtos fossem estudados.

Coates et al. (1999) mostraram que o fragmento de 650 pb a montante do códon de iniciação dos genes de Maltase-like I e Apirase foram capazes de direcionar a expressão nas glândulas salivares de *Aedes aegypti*, de uma maneira sexo-tecido específica, mas com uma expressão abaixo daquela encontrada para o gene endógeno.

A região promotora do gene da Apirase de *Anopheles gambiae* foi analisada em *Anopheles stephensis* e mostrou ter uma expressão estágio-tecido específica, mas, o nível de expressão, além de ter sido abaixo do esperado, apresentou expressão na porção proximal do lobo lateral ao invés da porção distal como no gene endógeno (LOMBARDO et al., 2005). Este mesmo promotor quando analisado em *Anopheles gambiae*, de três linhagens obtidas, apenas uma apresentou a expressão esperada (LOMBARDO et al., 2009).

Até o presente momento o único promotor com forte expressão em glândula salivar, nos locais preferenciais de entrada do esporozoítas, é o do gene codificador da proteína anti-plaquetária (AAPP) de *Anophels stephensi* (YOSHIDA e WATANABE, 2006).

Já no epitélio intestinal, dois promotores foram analisados: o do gene da carboxipeptidase, proveniente de *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, que mostrou ter expressão abundante temporal e tecido específica em *Aedes aegypti* (MOREIRA et al., 2000); e o promotor do gene da proteína 1 da matriz peritrófica de *Anopheles*

gambiae, que também apresentou expressão temporal e tecido específica (ABRAHAM et al., 2005).

O corpo gorduroso é um tecido particularmente interessante para o estudo de moléculas com atividade antiparasita, pois é um tecido com potente ação secretória, (pode expressar abundantemente proteínas exógenas) e que expressa seus produtos na hemolinfa, que é o tecido em que a maioria dos patógenos deve passar durante o seu ciclo.

Neste tecido foi analisado o promotor de vitelogenina de *Aedes aegypti* (KOKOZA et al., 2001a), *Anopheles stephensis* (NIRMALA et al., 2006) e *Anopheles gambiae* (CHEN et al., 2007) e em todos os casos as regiões analisadas, puderam expressar proteínas exógenas com padrão temporal, sexual e espacial similar ao gene endógeno.

Apesar de inúmeras moléculas já terem sido estudadas com efeito anti patógeno ou moléculas com envolvimento no ciclo do parasita (DE LARA CAPURRO et al., 2000; YOSHIDA et al., 1999; GWADZ et al., 1989; SHAHABUDDIN et al., 1998), poucos trabalhos foram publicados utilizando a tecnologia de transformação de insetos para analisar tais moléculas.

Foi demonstrado que a expressão de um anticorpo de cadeia simples, contra CSP, sob o comando do promotor de vitelogenina, conseguiu reduzir de 62-96% o número de esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum* em glândulas salivares de *Aedes aegypti* (JASINSKIENE et al., 2007).

Um outro estudo mostrou que a expressão da proteína fosfolipase A2 do veneno de abelha, sob o comando do promotor de carboxipeptidase em *Anopheles stephensi*, conseguiu reduzir 77-99% o número de oocistos de *Plasmodium berghei* (MOREIRA et al., 2002).

O número de oocistos de *Plasmodium berghei* também está reduzido em *Anopheles stephensi* transgênicos, pela expressão do peptídeo SM1, o qual se liga tanto no intestino quanto na glândula salivar desses mosquitos, sob o controle do promotor da carboxipeptidase (ITO et al., 2002).

O primeiro trabalho utilizando *Anopheles stephensi* transgênicos, que conseguiu uma redução no número de oocistos de *Plasmodium falciparum*, utilizou a expressão de uma lectina tipo C do pepino do mar, *Cucumaria echinata*, também sob o comando do promotor de carboxipeptidase. Neste trabalho, além da redução

do número de oocistos de *Plasmodium falciparum* terem atingido 76%, houve também uma maior redução em relação ao número de oocistos de *Plasmodium berghei* (~78-94%), mostrando a capacidade desta molécula de atingir mais de uma espécie de parasita (YOSHIDA et al., 2007).

Uma possível explicação, para tão poucas moléculas serem utilizadas para estudos em transgênicos, talvez seja a dificuldade em gerar as linhagens e o enorme trabalho para o seu cultivo. Uma alternativa para esse tipo de estudo é a utilização de sistemas de transdução baseados no vírus de RNA denominado Sindbis (SIN), do gênero *Alphavirus* e família *Togaviridae*, como o "double subgenomic Sindbis (dsSIN)".

Eles são vírus envelopados, o RNA genômico tem 11.7 kb de tamanho e é fita simples e esta pode ser traduzida em proteínas estruturais e não estruturais através da sua introdução em uma célula. Esses vírus contêm essencialmente duas regiões que são transcritas a partir da fita negativa de RNA como RNAs subgenômicos (ATKINSON et al., 2001).

Esse tipo de vírus tem permitido a expressão de proteínas heterólogas (DE LARA CAPURRO et al., 2000) e RNAs antisense em *Aedes aegypti* (HANDLER e JAMES, 2000; SANCHEZ-VARGAS et.al., 2004).

Estes sistemas de transdução foram montados a partir da inserção de um promotor seguido de um sítio de múltipla clonagem (MCS) no *Alphavirus*. Quando um gene recombinante é clonado no MCS, o vírus é forçado a transcrever um segundo mRNA subgenômico contendo o inserto (OLSON et al., 1992; PIERRO et al., 2003).

Dentre os modelos experimentais que podem ser utilizados para o estudo de moléculas, podemos citar: infecção de *Anopheles stephensi* pelos parasitas causadores da malária murina *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* e *Plasmodium chabaldi*, assim como a infecção de *Aedes aegypti* por *Plasmodium gallinaceum*.

Existe um senso comum sobre a não importação e manutenção de espécies exóticas de mosquitos, como *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae*, e não há colônia estabelecida da espécie brasileira *Anopheles darlingi*, já o *Anopheles aquasalis*, espécie que possui colônia estabelecida, nunca foi utilizada para a geração de linhagens transgênicas. Portanto, o modelo aqui proposto corresponde à malária aviária. Este modelo, além de ser o mais apropriado para nossas condições

laboratoriais, tem a vantagem de apresentar características clínicas similares à malária humana causada por *Plasmodium falciparum* como a ocorrência de malária cerebral, o que não ocorre com os modelos de malária murina.

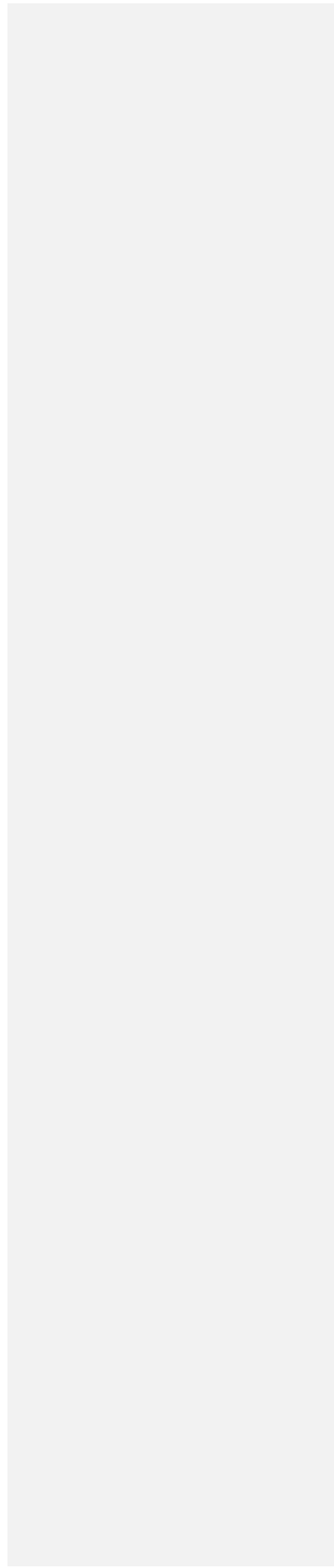
Embora os processos pelos quais os parasitas de primatas e de aves invadem os hospedeiros vertebrados e invertebrados sejam similares, existem algumas diferenças fundamentais entre eles: os esporozoítas da malária de aves podem se desenvolver em mosquitos culicíneos, enquanto que os da malária de primatas somente se desenvolvem em vetores anofelinos. Esporozoítas de malária de aves infectam macrófagos primeiramente para tardiamente invadirem os hepatócitos, enquanto que os esporozoítas de malária de primatas infectam primariamente os hepatócitos.

Essas diferenças biológicas podem estar relacionadas com as diferenças de aminoácidos da CSP. A região I é altamente similar entre as várias espécies de Plasmódios, entretanto em *Plasmodium gallinaceum* esta similaridade é menor, por outro lado a região II de *Plasmodium gallinaceum* é altamente conservada, sendo apenas um aminoácido de diferença na posição 16 (arginina -> lisina) em relação a CSP de parasitas de mamíferos (MCCUTCHAM et al., 1996).

No presente trabalho, com o intuito de acrescentar conhecimento sobre a relação da proteína CSP e suas diferentes regiões com o mosquito, em especial a glândula salivar, foram utilizados dois sistemas de expressão de proteínas - um transiente, o vírus recombinante dsSindibis e o sistema de transformação estável de mosquitos, na tentativa de promover competição entre diferentes peptídeos contendo duas regiões da CSP (I ou II), e esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum* por receptores da glândula salivar de *Aedes aegypti*.



OBJETIVOS



2 OBJETIVO

O objetivo desse projeto foi o estudo da interferência por competição de peptídeos recombinantes que codificam a Região I e Região II da proteína circumsporozoíta (CSP) de plasmódios, na invasão dos esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum* nas glândulas salivares de mosquitos *Aedes aegypti*. Para alcançar esse objetivo, os dois domínios conservados das CSPs das espécies *Plasmodium gallinaceum* e *Plasmodium falciparum* foram clonados e utilizados tanto no sistema de expressão transiente dsSindbis vírus quanto na tecnologia de transformação estável de mosquitos, para tentativa da expressão desses peptídeos na hemolinfa de *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum*. Este é um modelo experimental para testar e desenvolver metodologias básicas que posteriormente poderão ser aplicadas à malária humana e vetores anofelinos.

MATERIAL E MÉTODOS



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (cepa Higgs White-eyes), foram mantidos em colônia no insetário de segurança do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

A temperatura do insetário foi mantida à 27 °C com umidade relativa do ar de 80%, a um fotoperíodo de luz/escuro de 16/8 horas.

As larvas permaneciam até o estágio de pupa em recipientes plásticos com água destilada e alimentadas com ração de peixes moída (Tetramim). As pupas foram então colocadas em copos de plástico vedados por filó para a emergência dos adultos onde se alimentavam em solução de sacarose 10% *ad libitum*.

Para realização de postura das fêmeas, estas foram alimentadas uma vez por semana em camundongos anestesiados durante aproximadamente 30 minutos. Após 3-4 dias os ovos foram recolhidos.

Os *Gallus gallus domesticus* (pintainhos com 1 dia de idade) foram fornecidos pela Granja Kunitomo (Mogi das Cruzes, SP, Brasil) e foram mantidos no Biotério de Aves do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. A temperatura do biotério foi mantida à 26 °C com umidade relativa do ar de 60% a um fotoperíodo de luz/escuro de 12/12 horas. Os animais foram alimentados com água *ad libitum* e ração doada gentilmente pela Prof. Dra. Lucimara Mendes do Laboratório Biovet, livre de antibióticos e antiparasíticos.

Camundongos da linhagem Balb/c, utilizados nos experimentos, foram produzidos e mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

Excluído: Será que a gente tem que colocar os camundongos?????

3.2 MANUTENÇÃO DO CICLO *IN VIVO* DE *PLASMODIUM GALLINACEUM*

A cepa 8A de *Plasmodium gallinaceum* foi gentilmente cedida pela Dr^a. Antoniana Krettlí do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, MG, Brasil. Uma amostra de sangue infectado foi injetada *i.v.* em pintainhos de 2 dias de idade. A

partir do 6º dia após a inoculação, foram feitas lâminas de esfregaço sanguíneo dos pintainhos, coradas com Giemsa para determinar a parasitemia dos mesmos. Quando a parasitemia atingiu entre 5-10%, o pintainho foi anestesiado com cloridrato de xilazina 3 ng/Kg e acepromazina 0,3 ng/Kg. Em seguida foram montados 2 copos com aproximadamente 100 fêmeas de *Aedes aegypti* cada um e os mosquitos foram alimentados com sangue infectado (30 minutos). O pintainho infectado utilizado para alimentar as fêmeas foi sacrificado com CO₂.

Os mosquitos foram anestesiados em CO₂ e mantidos no gelo para separação das fêmeas ingurgitadas. Após sete dias 5-10 tratos digestivos de mosquitos foram dissecados e o material analisado por microscopia de contraste de fase para contagem de oocistos. Treze a vinte dias após a infecção, as fêmeas infectadas foram utilizadas para infectar pintainhos sadios recomeçando o ciclo.

3.3 PLASMÍDEOS E REAGENTES

Os plasmídeos *pGEM*[®]-T Vector (Promega, Madison, WI, USA) (Anexo A) e Topo[®] TA cloning (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Anexo B) foram adquiridos comercialmente. Os plasmídeos:

- *pSLfa*[AeVg], o qual contém a sequência promotora de vitelogenina de *Aedes aegypti* e a região reguladora 3'UTR do vírus SV40, descrito por Kokoza, et al. (2000). (Anexo C, Figura 19), (cedido pelo Dr. Alexandre Rhaikel, da University of California, Riverside, California, EUA)
- vetor doador *piggyBac*[3XP3-eGFP], que contém os braços invertidos do transposon *piggyBac* e contido nele o promotor de olhos 3XP3 direcionando a expressão da proteína fluorescente eGFP, descrito por Horn e Wimer (2000) (Anexo D; Figura 23), (cedido pelo Dr. Anthony James, da University of California, Irvine, Califórnia, EUA).
- vetor auxiliador *phsp*[*piggyBac*], que contém a sequência codificadora da transposase de *piggyBac* dirigida pelo promotor de choque térmico 70 (hsp70) descrito por Handler e Harrell (1999) (cedido pelo Dr. Anthony James, da Universidade da Califórnia Irvine, Califórnia, EUA).
- vetor de expressão transiente TE 3'/2J dsSindbis, que contém a sequência promotora SP6, sequência codificadora das 4 proteínas não estruturais do

vírus Sindbis (NSP1-4), seqüência codificadora do capsídeo (C) e as 2 seqüências codificadoras das proteínas de envelope (PE1-2) descrito por Olson, et al. (1992) (Anexo E; Figura 12) (cedido pelo Dr. Kenneth Olson, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, EUA).

Os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho foram adquiridos comercialmente.

3.4 BACTÉRIAS

3.4.1 LINHAGENS DE *ESCHERICHIA COLI* UTILIZADAS

DH10B – F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR*/*recA1* *endA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara,leu*)7697 *galJ* *galK* λ^- *rpsL* *nupG* λ^- *tonA*

SURE – e14⁻ (*mcrA*⁻) Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 171 *endA1* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* *lac* *recB* *recJ* *sbC* *umuC::Tn5* (*KarI*) *uvrC* [F' *proAB lacI*^f Z Δ (M15 Tn 10 (*Tet*^r) *Amy Camr*]³

3.4.2 PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES

Um inóculo de estoque de bactéria *E. coli* DH10B foi semeado em 500 mL de meio líquido LB (triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 5 g para 1 litro) à 37 °C sob agitação até a cultura atingir uma DO_{600nm} de 0,6. A cultura foi incubada em gelo por 30 minutos seguida de centrifugação por 5 minutos a 7.000 rpm à 4° C. Após a centrifugação o meio de cultura foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 500 mL de água. Este material foi centrifugado novamente como descrito anteriormente e o sedimento ressuspensionado em 250 mL de água. Foi realizada a última centrifugação e o sedimento foi ressuspensionado em 1.5 mL de água contendo glicerol 10%. A solução de bactérias eletrocompetentes foi alíquotada (40 µL/tubo), congeladas e mantidas a -80 °C.

3.4.3 PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES

Um inóculo de estoque de bactéria *Escherichia coli* SURE foi semeado em 500 mL de meio líquido LB à 37 °C sob agitação até a cultura atingir uma DO_{600nm} de 0,6. A cultura foi incubada em gelo por 30 minutos seguida de centrifugação por 5 minutos a 7.000 rpm à 4 °C. Após a centrifugação o meio de cultura foi descartado e o sedimento ressuspensionado em ¼ do volume total de MgCl 0,1 M. Este material foi centrifugado novamente como descrito anteriormente e o sedimento ressuspensionado em ¼ do volume total de CaCl₂ 0,1 M. Foi realizada a última centrifugação e o sedimento foi ressuspensionado em 5,37 mL de uma solução contendo CaCl₂ 0,1 M e glicerol 10%. A solução de bactérias quimiocompetentes foi alíquotada (100 µL/tubo), congeladas e mantidas a -80 °C.

3.4.4 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES

Um volume de 5 µL provenientes das ligações foi adicionado à alíquota de solução de bactérias eletrocompetentes, essa mistura foi colocada em cubetas de 0,2 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e eletroporadas à 2500 V utilizando o eletroporador Cellject Hybaid (Bioscience Technology, Rockaway, NJ, USA). Após a eletroporação foi adicionado 1 mL de LB e as células foram mantidas a 37 °C em agitação suave por 1 hora.

Após este período as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo IPTG 1 mM, ampicilina 100 µg/ml e X-Gal 30 µg/ml ou somente ampicilina, dependendo do experimento.

3.4.5 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES

Um volume de 5 µL proveniente das ligações foi adicionado à alíquota de solução de bactérias quimiocompetentes e mantidos no gelo por 30 minutos. Após este período as bactérias sofreram um choque térmico à 42 °C por 30 segundos e recolocadas em gelo por mais 3 minutos. Foram adicionados 500 µL de meio LB e as células foram mantidas a 37 °C em agitação suave por 1 hora.

Após este período as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina 100 µg/ml.

3.5. CÉLULAS

3.5.1 LINHAGENS DE CÉLULAS UTILIZADAS

- BHK-21, linhagem celular proveniente de rim do hamster Syrian golden *Mesocricetus auratus*.
- C6/36, linhagem celular proveniente de intestino de *Aedes albopictus*.

3.5.2 CULTIVO DE CÉLULAS

Células da linhagem BHK-21 foram cultivada em condições estéreis em meio Leibovitz's L-15 (Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen). A cultura foi feita em frascos de plástico estéreis de 25 cm² em 10 mL do meio de cultivo renovados três vezes por semana em estufas à temperatura de 37 °C na ausência de CO₂. Os frascos foram observados diariamente em microscópio invertido, até a formação de monocamadas confluentes, quando então foram utilizadas nos experimentos.

Células da linhagem C6/36 foram cultivadas em condições estéreis, em meio L-15 (Invitrogen), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Invitrogen). A cultura foi feita em frascos de plástico estéreis de 25 cm² em 10 ml do meio de cultivo renovados duas vezes por semana em estufas à temperatura de 28°C na ausência de CO₂. Os frascos foram observados diariamente em microscópio invertido, até a formação de monocamadas confluentes, quando então foram utilizadas nos experimentos.

3.6 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

3.6.1 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS RECOMBINANTES PELA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)

As amplificações foram realizadas no equipamento termociclador Biometra® (Biometra, Rudolf-Wissel, Goettingen, Alemanha) contendo os seguintes reagentes: Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, contendo MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM dNTPs 0,2 mM, oligonucleotídeos iniciadores 0,2 μM (Tabela 1), DNA molde 10 ng, 2,5 unidades de *Taq* Polimerase (Biotools B&M Labs, Vale de Tobalina, Madrid, Espanha), e água ultra pura q.s.q..

O programa básico utilizado foi: 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, X °C (Conforme os pares de primers – Tabela1) por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos.

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores das PCRs.

Construção	Oligos	Seqüência	T _m °C
GARI	MalG_ARI	5' CTCCTAGCAGGACTAACCACCGGTTGGACTGGTGGAG ACTTTTAAATGAGGTGTGT3'	55 °C
	EtagG_ARI	5' CGGCACCGCGCACCAGCAGGTGAACACCACCATT3'	
GBRII	MalG_BRII	5' CTCCTAGCAGGACTAACCACCGGTTGGACTGGTGGGG AGGAAATGGTGGTGCCCAA3'	
	EtagG_BRII	5' CGGCACCGCGCACCTTCTTATTAGCAGATGTAGA3'	
GRIIC	MalG_RIIC	5' CTCCTAGCAGGACTAACCACCGGTTGGACTGGTGGCC TGAAGGAGGAGATGAAAAA3'	
	EtagG_RIIC	5' CGGCACCGCGCACCAATTATAGCTAAACCTAACGA3'	
FARI	MalF_ARI	5' CTCCTAGCAGGACTAACCACCGGTTGGACTGGTGGGG AAGTTCGTCAAACACAAGG3'	
	EtagF_ARI	5' CGGCACCGCGCACCGTTTGCATTTGGATCAGGATT3'	
FBRII	MalF_BRII	5' CTCCTAGCAGGACTAACCACCGGTTGGACTGGTGGGG AAACCCAAATGCAAACCA3'	
	EtagF_BRII	5' CGGCACCGCGCACCTTCGTCTTTAGGTTTATTAGC3'	
Geral	Etag/APA/XBA	5' GCTCTAGAGGGCCACGCGGTTCCAGCGGATCCGGATA CGGCACC GCGCACC3'	45 °C
	XBA/MAL	5' GCTCTAGAAATGAAGATCTTTGTCCACTTCTAAGCTTC CTCCTAG CAGGACTA3'	
FARI/GARI Transgênicos	BglII_Malt	5' AGATCTATGAAGATCTTTGTTCCA3'	60 °C
	NotI_Etag	5' GCGGCCGCTTAAGCGGTTCCAGCGGATC3'	

3.6.2 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Após cada amplificação pela PCR, os produtos foram purificados através do kit QIAquick® Purification PCR Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) segundo o protocolo do fabricante, para remoção de nucleotídeos livres facilitando as reações subsequentes.

3.6.3 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA NOS VETORES

Diferentes proporções molares de vetor:inserto (4:1; 3:1 e 2:1) foram utilizadas e padronizadas para cada etapa de clonagem. Basicamente as reações de ligação foram realizadas na presença de 1 unidade de T4 ligase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em tampão da própria enzima, durante 16 horas à 14 °C.

3.6.4 PURIFICAÇÃO DE DNA DE PLASMÍDEO

As colônias de bactérias previamente transformadas e plaqueadas, foram semeadas em meio LB contendo ampicilina 100 µg/ml por 12 a 16 horas à 37 °C em agitação. A cultura saturada foi então centrifugada por 30 segundos a 14.000 rpm para sedimentação das bactérias. O meio de cultura foi descartado e o sedimento utilizado para purificação do DNA de plasmídeo utilizando o kit QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN), segundo protocolo do fabricante.

3.6.5 DIGESTÃO DOS VETORES TE 3'/2J dsSINDBIS, pSLFA[AEVG] E pIGGYBac[3XP3-eGFP] ATRAVÉS DE ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO

Aproximadamente 1 µg dos vetores foram utilizadas nas reações de digestão presença de 20 unidades das enzimas abaixo citadas:

- TE 3'/2J dsSindbis – *Xba* I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
- pSLfa[AeVg] – *Bgl* II e *Not* I (New England Biolabs)
- piggYBac[3XP3-eGFP] – *Asc* I (New England Biolabs)

As reações foram mantidas à 37° C por 2 horas.

3.6.6 DESFOSFORILAÇÃO DOS VETORES TE 3'/2J DSINDBIS E PIGGYBAC[3XP3-EGFP]

Após a digestão do DNA de plasmídeo procedeu-se a reação de desfosforilação, para prevenir sua religação, nas condições: 1 µg de DNA de plasmídeo, 1 unidade da fosfatase alcalina CIAP (New England Biolabs) em tampão da própria enzima por 60 minutos à 37 °C. O DNA de plasmídeo desfosforilado foi então purificado com o kit QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN), segundo protocolo do fabricante.

3.6.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel contendo 1% de agarose (Invitrogen) dissolvido em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 50 mM). A mistura foi aquecida em forno microondas até a completa solubilização da agarose sendo então nela acrescentado brometo de etídeo (0,1 µg/ml).

Foi adicionada às amostras de DNA, 1/10 da solução composta de azul de bromofenol 0,025% e glicerol 30% e então aplicadas no gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em sistema horizontal Owleasycast™ E2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com a voltagem e o tempo determinados dependendo do experimento. Para a visualização das bandas foi utilizado o transiluminador ultravioleta UV Transilluminator (UVP, Upland, CA, USA).

3.6.8 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA DE GEL DE AGAROSE

Para prosseguir com as subclonagens foi necessário excisar os fragmentos de interesse dos géis de agarose para a posterior ligação nos vetores, previamente digeridos e desfosforilados. Pequenos pedaços do gel de agarose contendo os fragmentos de DNA foram cortados através de uma lâmina cortante esterilizada e o material foi purificado utilizando o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), segundo protocolo do fabricante.

3.6.9 SEQÜENCIAMENTO DE FRAGMENTOS DE DNA

Os fragmentos de DNA foram seqüenciados com a utilização do Control/Standards Big Dye™ Terminator v 3.0 Sequencing Standard (Applied Biosystems, Washington, UK), segundo protocolo do fabricante. Para cada reação foram utilizados 200 ng de DNA de plasmídeos e 1,6 pmoles dos oligonucleotídeos M13 Forward e M13 Reverse (Invitrogen).

Os parâmetros utilizados para as amplificações foram 96 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 96 °C por 45 segundos, 50 °C por 30 segundos e 60 °C por 4 minutos. O material foi precipitado pela adição de 4 volumes de isopropanol 75% e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi feita uma centrifugação de 30 minutos a 3.100 rpm e o sedimento lavado pela adição de 1 mL de etanol 70%. Foi feita a mesma centrifugação e o sedimento ressuspendido em 1,3 µL de 5 Dye (Applied Biosystems).

Os produtos das reações de seqüenciamento foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (Long Ranger 50% Stock Solution, BMA, Rockland, ME, U.S.A), contendo uréia 6M em tampão TBE 1X a uma voltagem de 1680 V por 7 horas, no seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

3.7 OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS dsSINDBIS RECOMBINANTES

3.7.1. PRODUÇÃO DE RNA VIRAL

Aproximadamente 500 ng de DNA de plasmídeo proveniente das construções obtidas da subclonagem no vetor TE 3'/3J dsSindbis, foram linearizados na presença de 10 unidades da enzima de restrição *Xho* I (New England Biolabs); procedeu-se então a transcrição "in vitro" utilizando o kit AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit (Epicentre, Madison, WI, USA), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.7.2 TRANSFEÇÃO DE RNA VIRAL EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

O RNA produzido foi transfectado na monocamada de células BHK-21 à densidade de 35.000 cels/cm², utilizando Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen)

como veículo. Após 72h, observou-se o efeito citopático nas células, e então, o sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado e conservado em 8% sorbitol.

Para a amplificação das partículas virais, 100 µL da suspensão coletada foi inoculada em uma garrafa contendo monocamada de células C6/36 à densidade de 35.000 cels/cm², mantidas por 4 dias para a amplificação da carga viral.

3.7.3 TITULAÇÃO VIRAL

A titulação das amostras coletadas do sobrenadante das células C6/36, foi feita pelo método de TCID_{50%} (*Tissue Culture Infectant Dose 50%*) e a determinação do título da suspensão viral, pelo método de Hierholzer e Killington (1996). Foram feitas diluições seriadas da suspensão viral original em meio de cultura L-15 sem soro fetal bovino. Os vírus foram então inoculadas em monocamadas de célula BHK-21, adsorvidas em microplacas de 96 cavidades de fundo chato, no volume de 100 µL por cavidade. Foram utilizadas oito cavidades para cada diluição, incluindo o controle negativo, que continha apenas meio de cultura.

As microplacas foram incubadas em estufa à 37 °C em câmara úmida, por até 72 horas e observadas em microscópio invertido diariamente para a constatação do efeito citopático.

3.8 RT-PCR SEMIQUANTITATIVO

3.8.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL

O RNA total de mosquitos inteiros foi extraído utilizando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente foi adicionado 1/5 do volume de clorofórmio e centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo, e, o RNA foi precipitado pela adição de 2,5 volumes de isopropanol, incubado por dez minutos em temperatura ambiente e o material foi novamente centrifugado como descrito acima. Após centrifugação o sedimento foi lavado com etanol 75% seco à temperatura ambiente e dissolvido em 25 µL de água DEPC 0.1%.

3.8.2 TRATAMENTO DO RNA TOTAL COM A ENZIMA DNASE

Após a extração, o RNA foi tratado com a enzima DnaseI AMP Grade (Invitrogen), seguindo protocolo do fabricante. Brevemente, a 1 µg de RNA total foi adicionada 2 unidades da enzima, e deixada por quinze minutos à temperatura ambiente. A reação foi parada no gelo e então foi adicionado EDTA à concentração final 2,5 mM. A amostra foi incubada a 65 °C por dez minutos para inativação da enzima.

3.8.3 SÍNTESE DE cDNA E PCR

A reação de síntese de cDNA e PCR foi feita utilizando o kit *One Step RT-PCR* (QIAGEN) que possui a combinação de duas enzimas - uma responsável pela produção do cDNA (transcriptase reversa) e a outra é uma polimerase modificada (*Hot start polimerase*) que permanece inativa durante a ação da primeira enzima e, só então, é ativada em altas temperaturas, quando o ciclo da PCR é iniciado.

Foram adicionados aproximadamente 100 ng de RNA tratado, dNTP 1 mM, oligonucleotídeos iniciadores 1 µM (Tabela 2), tampão proveniente do kit e *One Step RT-PCR enzyme-mix*. O aparelho termociclador foi utilizado com os seguintes parâmetros: 50 °C por 30 minutos, 95 °C por quinze minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e para finalizar 72 °C por 10 minutos.

Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores das PCRs utilizados no RT-PCR

Construções	Oligos	Seqüência	Fragmento (pb)
FARI	FARI_FOW	5' GGGGAAGTTCGTCAAACACA 3'	222
	FARI_REV	5' CATCCGCTGGTTGCTTTAAT 3'	
GARI	GARI_FOW	5' ACTAACCACCGGTTGGACT 3'	235
	GARI_REV	5' TGGTTGATTAAGATTCGCAACA 3'	
Actina	Ae actinF	5' AAGGCCAACCGTGAGAAGATGACT 3'	400
	Ae actinR	5' GCTCGTTGCCAATGGTGATAC 3'	
Vitelogenina	AeVgRT_FOW	5' ACGTTGAGTTGGGACTGGAC 3'	589
	AeVgRT_REV	5' GGCTGGTAAGCGAATGGATA 3'	
Geral	Etag/APA/XBA	5' AGATCTATGAAGATCTTTGTCCA3'	400
	XBA/MAL	5' GCGGCCGCTTAAGCGGTTCCAGCGGATC3'	

3.9 "WESTERN BLOT"

3.9.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE TRICINA (SDS-TRICINA-PAGE)

O material submetido a este tipo de eletroforese, foi dissolvido previamente em tampão de amostra (Tris 50 mM, pH 6,8, contendo SDS 2% (p/v), DTT 100 mM, glicerol 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,01% (p/v)), aquecido a 95 °C por 5 minutos e centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante aplicado nos géis.

Para a produção dos géis foi utilizado o sistema de mini gel da Bio-Rad (mini protean III), com espaçadores de 0,75 mm de espessura. Foi utilizado o sistema descontínuo, para isso os géis de resolução continham: acrilamida 49.5% T e 6%C, o gel de corrida contendo Tris 3 M pH 8,8, SDS 0,3%, glicerol 10%, persulfato de amônio 0,3% e TEMED 0,06% (Sigma-Aldrich). O gel de empilhamento continha: acrilamida 49.5% T e 3% C, tampão do gel (Tris 3 M pH 8,8, contendo SDS 0,3%), persulfato de amônio 0,5% e TEMED 0,1% (Sigma-Aldrich). O tampão catódico utilizado continha Tris base 0,1 M, tricina 0,1 M e SDS 0,1% e o tampão anódico continha Tris 0,2 M pH 8,9.

A eletroforese foi realizada com voltagem constante igual a 20 V/cm. As proteínas separadas no gel foram coradas por Comassie blue R 0,2% dissolvido em metanol: ácido acético:água (50:10:40, v/v/v) por aproximadamente 1 hora e a solução de descoloração foi composta por etanol:ácido acético:água (25:8:65, v/v/v).

3.9.2 TRANSFERÊNCIA E DETECÇÃO DOS PEPTÍDEOS

As proteínas separadas nos géis de poliacrilamida na presença de tricina foram eletroforéticamente transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad), utilizando o sistema semi-seco *Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad), na presença de uma solução tampão contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037% e metanol 20% como descrito por Harlow e Lane (1988). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% por 16 horas, incubadas com anticorpo comercial anti-Etag (HRP) (Abcam, Cambridge, MA, USA) na concentração de 1:200 durante 3 horas. A visualização das proteínas reconhecidas pelo anticorpo foi feita com o kit *Amersham™ ECL™ Plus Western Blotting Detection Reagents and Analysis System* (GE Healthcare, Little Chalfont, Duckinghamshire, England), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.10 EXPERIMENTO DE INFECÇÃO POR *PLASMODIUM GALLINACEUM* EM MOSQUITOS *Aedes aegypti* MICROINJETADOS COM AS PARTÍCULAS VIRAIS DSINDBIS RECOMBINANTES

Fêmeas adultas de *Aedes aegypti* com 4 dias de idade foram microinjetadas no tórax com 0,5 µL de partículas virais de dsSindbis recombinantes com títulos de 10^6 TCID_{50%} em 100 µL utilizando microagulhas de vidro (capilares de 50 µL), sob lupa estereoscópica. Após 3 dias as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo em *Gallus gallus domesticus* infectado com *Plasmodium gallinaceum*. Para controle do experimento um grupo de mosquitos foi injetado com dsSindbis recombinante expressando a proteína fluorescente verde (GFP) e alimentado no mesmo pintainho.

No 8º dia após o repasto sanguíneo infectado, pares de glândulas salivares foram dissecadas e homogeneizadas individualmente em tampão PBS (NaHPO₄ 7

mM, NaH₂PO₄ 2 mM, pH 7,0, NaCl 140 mM) e o número de esporozoítas foi determinado sob microscopia de fase, em câmara de Neubauer.

3.11 MICROINJEÇÃO EM OVOS EMBRIONADOS DE *Aedes aegypti*

Machos e fêmeas de *Aedes aegypti* após a emergência foram colocados na mesma gaiola para realização da cópula numa proporção de 3♀:1♂. Três dias depois foi oferecido o repasto sanguíneo em camundongos. Após o repasto sanguíneo os mosquitos foram somente alimentados com algodão embebido com sacarose 3 M para que as fêmeas não ovipusessem no algodão.

De três a sete dias as microinjeções foram feitas. Seis a oito fêmeas foram coletadas e colocadas num recipiente plástico, contendo no fundo um algodão molhado em água e papel filtro umedecido por cima, e deixadas em ambiente escuro por aproximadamente noventa minutos. Então as fêmeas foram descartadas, o papel filtro removido e sob lupa estereoscópica os ovos embrionados foram alinhados na mesma orientação, para que a microinjeção fosse efetuada no pólo posterior. Durante o alinhamento os embriões foram constantemente umedecidos com água destilada.

Os ovos embrionados, depois de alinhados foram dessecados por um curto período (aproximadamente 1 minuto) através da pressão de um papel absorvente em sua volta, colados em uma lamínula com uma fita dupla-face não removível (Scotch 3M) e então cobertos com óleo halocarbônico 27 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Estes então foram levados ao microscópio cirúrgico (Laica) modelo S6E para a microinjeção.

A microinjeção foi realizada no aparelho Fento-Jet com um micromanipulador automático, ambos da Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). As agulhas utilizadas foram padronizadas e produzidas por estiramento de capilares de vidro borossilicado (World Precision Instrument, Sarasota, Flórida, USA) no aparelho da Sutter modelo P97 (Sutter Instrument Co., Novato, Califórnia, USA) nas seguintes condições: 1º ciclo - Aquecimento:391, Arranque: 10, Velocidade: 10, Tempo: 190, 2º ciclo - Aquecimento:391, Arranque: 80, Velocidade: 30, Tempo: 130. As pontas das agulhas foram lixadas por 1 minuto no aparelho *KT Brown Type micro-pipette beveler* modelo BV-10 (Sutter).

Para a microinjeção é necessária uma mistura contendo dois plasmídeos, nas seguintes concentrações: 0,3 µg/µL de DNA do plasmídeo doador (que contém o gene que vai ser estudado) e 0,2 µg/µL de DNA do plasmídeo auxiliador (que contém a seqüência codificadora da transposase). Ambos plasmídeos foram purificados através do kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN), centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm através do filtro Millex® GV (Millipore, Japão) e então inseridos nas agulhas com auxílio de uma microponteira.

Após a microinjeção os ovos foram retirados da lamínula e colocados nas paredes de um papel filtro umedecido num béquer com algodão molhado em água por baixo, e deixados por cinco dias em uma sala com temperatura e umidade controladas. Após esse período, os ovos foram colocados em recipientes com água para a sua eclosão.

As pupas foram colocadas individualmente em copos, e após a emergência dos adultos, os machos eram colocados com fêmeas selvagens (família de machos) e as fêmeas eram colocados com machos selvagens (pools das fêmeas). Após três dias foi oferecido o repasto sanguíneo, e novamente três dias depois eram colocados pequenos béqueres contendo água e um papel filtro umedecido dentro para a oviposição. Vinte e quatro a quarenta e oito horas depois as posturas eram retiradas e os ovos colocados em recipientes com água para eclosão.

As larvas eclodidas eram mantidas até aproximadamente o estágio de L4 e então foram analisadas quanto à presença da fluorescência (GFP) nos olhos, tubo neural e papilas anais indicando a inserção do transgêno no genoma do mosquito.

3.12 "SOUTHERN BLOT"

3.12.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Cinco mosquitos das linhagens transgênicas foram utilizados para extração de DNA genômico através do kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) seguindo o protocolo do fabricante.

3.12.2 DIGESTÃO DE DNA GENÔMICO

Aproximadamente 10 µg de DNA genômico foram utilizados para digestão com 50 unidades da enzima *Bgl*II e/ou *Not*I, em tampão apropriado em um volume final de 200 µL, por aproximadamente dezesseis horas. O DNA genômico digerido foi precipitado com 10% do volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e um volume de isopropanol, seguido de centrifugação por cinco minutos a 14.000 rpm e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 70% e seco a 65 °C.

3.12.3 TRANSFERÊNCIA POR "SOUTHERN"

O DNA genômico foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% a 110V por aproximadamente quatro horas. O material foi então transferido para membrana de nylon da Amersham Hybond™-XL (GE Healthcare), por capilaridade como descrito em Sambrook e Russel (2001).

3.12.4 MARCAÇÃO RADIOATIVA DA SONDA E HIBRIDAÇÃO

A sonda utilizada para detecção do transgêne no genoma do mosquito foi um fragmento de 450 pb da proteína GFP. O fragmento foi digerido do plasmídeo TOPO-GFP450 (cedido gentilmente pelo Dr. Anthony James, da Universidade da Califórnia Irvine, Califórnia, EUA) e a banda correspondente foi excisada do gel utilizando o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) e utilizada para marcação com radioisótopo ³²P utilizando o Kit *Mega Prime DNA Labelling System* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante. A sonda foi então desnaturada por cinco minutos a 95 °C e adicionada à solução de pré-hibridação (Na₂HPO₄ 0,3 M pH7,2, contendo SDS 7% e EDTA 1 mM). A membrana foi incubada com esta solução por dezesseis horas a 65 °C.

A membrana foi lavada de acordo com Sambrook e Russel (2001) e exposta a filme auto-radiográfico, e, após três dias de exposição, o filme foi revelado.

3.13 ANÁLISE DA HEMOLINFA DE FÊMEAS DE *Aedes aegypti* POR LC-MS-MS

3.13.1 EXTRAÇÃO DE HEMOLINFA

Foram utilizadas 20 fêmeas adultas de *Aedes aegypti* 48 horas após alimentação sanguínea. Para a extração, duas pernas anteriores das fêmeas do mesmo lado foram arrancadas e ao lado oposto, foram injetados aproximadamente 2 µL de tampão PBS 1X (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) contendo leupeptina 50 ng/ml, pepstatina 5 ng/ml, quimostatina 5 g/ml, PMSF 5 ng/ml e E-64 5 ng/ml) com o auxílio de uma microagulha e lupa estereoscópica. As gotas de hemolinfa contidas no tampão que foram expelidas pelos ferimentos foram coletadas em um capilar de 10 µL contendo 2 µL do mesmo tampão da injeção. O material foi então centrifugado a 8.000 rpm por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado nas reações subseqüentes.

3.13.2 REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Foi adicionado à hemolinfa extraída 20 µl de NH₄HCO₃ 0,4 M, uréia 8 M e DTT 45 mM e incubada a 50 °C por 15 minutos para a redução das ligações dissulfeto. Após o resfriamento da amostra à temperatura ambiente foi adicionado iodocetamida 100 mM para alquilação das cisteínas em tubo protegido da luz.

3.13.3 DIGESTÃO DOS PEPTÍDEOS COM ENDOPEPTIDASE

Após a redução e alquilação dos polipeptídeos contidos da hemolinfa, foi adicionada ao material tripsina à uma concentração final de 12,5 ng/µl e esta amostra foi então incubada a 37 °C por 24 horas sendo então adicionado TFA (ácido trifluoracético) à uma concentração final de 0,046% para a interrupção da reação.

3.13.4 CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA (RP-HPLC) ACOPLADA A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

As amostras digeridas pela tripsina foram desalinizadas e concentradas através em uma cromatografia manual de extração de fase sólida em coluna C₁₈ (10-15 µm, Vydac, USA). Para isso elas foram aplicadas na coluna previamente equilibrada com TFA 0,046% e eluídas em 100 µl de acetonitrila 80%/TFA 0,046% e então concentradas em centrífuga a vácuo refrigerada ThermoSavant, modelo 210 (Thermo Fisher Scientific).

As amostras foram ressuspendidas em 10 µl de solução acetonitrila 5% e ácido fórmico 0,2% e submetidas a uma cromatografia de fase reversa de alta performance (RP-HPLC) acoplada a um espectrômetro de massas. A RP-HPLC foi realizada nas colunas capilares C₁₈ (15 cm x 100 µm) em um cromatógrafo do tipo NanoHPLC, modelo Ultimate LC Packings (Dionex Company, Amsterdam, Netherlands). A coluna C₁₈ capilar foi acoplada a uma nano-fonte de ionização do tipo "eletro-spray" do espectrômetro de massas modelo LCQ Duo™ (Thermo Fisher Scientific). A nano-fonte foi operada em modo positivo, com potencial de "electro-spray" ajustado para 1,8 kV e temperatura do capilar aquecido ajustada para 180 °C. A cromatografia foi realizada com fluxo de 10 µl/minuto e o gradiente de concentração de acetonitrila foi de 5% a 80% em 60 minutos.

Foram realizados dois tipos de cromatografia acoplada à espectrometria de massas. Em ambos os tipos foi utilizado o software Xcalibur® 2.0 (Thermo Fisher Scientific) para a coleta de dados.

No primeiro tipo de análise, análise LC-MS, os dados foram coletados no modo "full-scan", com a relação massa/carga (m/z) entre os valores 300 e 2000. Nesse tipo de análise foram comparados os perfis cromatográficos (abundância relativa de ionização x tempo) entre o as amostras controle e experimental.

O segundo tipo de análise, LC-MS/MS, foi utilizado para o seqüenciamento dos peptídeos trípticos provenientes da digestão das amostras, foi realizado em dois eventos. Primeiramente os dados foram coletados no modo "full scan" e subsequente cada íon com intensidade maior que 1×10^5 contagens foi fragmentado com energia de colisão de 35%. Após a cromatografia, os dados foram

submetidos à análise pelo algoritmo Sequest com o programa BioworksBrowser 3.3 (Thermo Fisher Scientific) e as seqüências obtidas foram comparadas tanto ao banco de seqüências de aminoácidos não-redundante, o qual contém seqüências de diferentes organismos, quanto a um banco de seqüências de *Plasmodium*.

3.14 EXPERIMENTO DE INFECÇÃO POR *PLASMODIUM GALLINACEUM* EM MOSQUITOS *Aedes Aegypti* TRANSGÊNICOS

Fêmeas adultas de *Aedes aegypti* transgênicas e não transgênicas realizaram o repasto sanguíneo em *Gallus gallus domesticus* infectado com *Plasmodium gallinaceum* com parasitemia entre 8 a 11%. No 5º dia após o repasto sanguíneo infectado, uma nova alimentação sanguínea foi oferecida, mas desta vez de camundongos saudáveis, para que o promotor de vitelogenina contido no transgene tivesse uma nova ativação, resultando na expressão das proteínas recombinantes.

No 8º dia após o repasto sanguíneo infectado, período em que os primeiros oocistos formados de *Plasmodium gallinaceum* já iniciaram o rompimento liberando os esporozoítas, pares de glândulas salivares foram dissecados e homogeneizados individualmente em tampão PBS (NaHPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 2 mM, pH 7,0, contendo NaCl 140 mM) e o número de esporozoítas foi determinado sob microscopia de fase, com o auxílio de uma câmara de Neubauer espelhada.

RESULTADOS

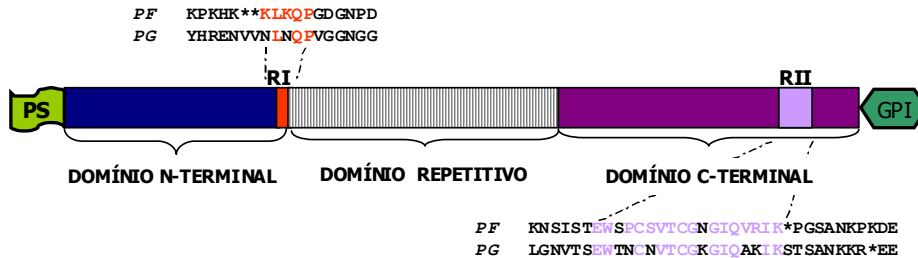


4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS RECOMBINANTES EM SISTEMA DE EXPRESSÃO TRANSIENTE (DSINDIBIS)

Com o intuito de verificar a relação da proteína CSP presente na superfície dos esporozoítas de plasmódios com o reconhecimento de receptores na glândula salivar de *Aedes aegypti*, foi feita a construção de genes híbridos, nos quais a molécula a ser expressa era constituída de diferentes porções contendo a região I ou II da proteína supracitada e os elementos regulatórios explicados abaixo.

Os fragmentos referentes à região I foram denominados ARI, e os fragmentos referentes à região II foram denominados BRII e RIIC. Dependendo da espécie de plasmódio da qual foi amplificada a seqüência da CSP, a letra G (*Plasmodium gallinaceum*) ou F (*Plasmodium falciparum*) foi colocada antes das denominações. Na Figura 8 podemos observar a representação esquemática da proteína CSP, onde estão evidenciadas as regiões conservadas I e II e também a representação esquemática dos peptídeos recombinantes propostos neste projeto.

(A) CSP de *Plasmodium sp*

(B) Peptídeos recombinantes propostos neste projeto

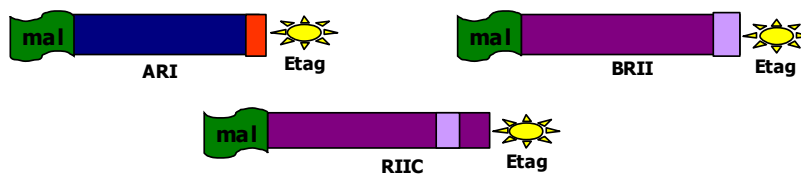


Figura 8. Representação esquemática da CSP de *Plasmodium sp* e os peptídeos recombinantes propostos neste projeto.
 (A) PS: peptídeo sinal da CSP, RI: seqüência dos aminoácidos da região I; RII: seqüência dos aminoácidos da região II; GPI: âncora glicosilfosfatidil-inositol.
 (B) Mal: peptídeo sinal da *Maltase-like I* de *A. aegypti*; em vermelho: Região I; em lilás: região II; Etág: epítipo reconhecido por anticorpo comercial anti-Etag.

Para a amplificação da seqüência dos peptídeos recombinantes e posterior clonagem no sistema de expressão transiente dsSindibis, foram utilizados, como molde, DNA genômico de *Plasmodium gallinaceum* cepa 8A (construções GARI e GBRII, Figura 8) e de *Plasmodium falciparum* cepa 3D7 (construções FARI, FBRII e FRIIC, Figura 8), cedidos gentilmente pelo Dr. Hernando del Portillo Obando, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As ampliações de cada um dos fragmentos foram realizadas em dois passos de forma a obter a inserção da seqüência codificadora do peptídeo sinal da *Maltase-like I* de *Aedes aegypti* (Mal-I) (de 22 aminoácidos) à montante das regiões I ou II da CSP; e da seqüência codificadora do epítipo Etag (14 aminoácidos), à jusante destas regiões (Figura 11). Essa estratégia foi adotada devido ao fato dessas

seqüências serem muito grandes para serem adicionadas em um único oligonucleotídeo.

O peptídeo sinal da maltase é responsável pelo direcionamento das proteínas recombinantes para a hemolinfa de *Aedes aegypti* (JAMES; BLACKMER; RACIOPPI, 1989) e o epítipo Etag codifica uma seqüência peptídica reconhecida pelo anticorpo comercial anti-Etag (HRP) (Abcam), que permite a rápida identificação dos peptídeos recombinantes.

No primeiro passo das amplificações, foram adicionados os últimos nucleotídeos codificadores do peptídeo sinal Mal-I e também os primeiros nucleotídeos codificadores do Etag aos fragmentos da CSP, utilizando os pares de oligonucleotídeos específicos de cada construção (Tabela 1). O produto desta etapa foi purificado como descrito por Material e Métodos item 3.6.2 e aproximadamente 10ng dos produtos de PCR assim obtidos foram utilizados no segundo passo de amplificação.

No segundo passo, foram adicionados os nucleotídeos restantes para completar a seqüência tanto de Mal-I quanto do Etag, além dos sítios de restrição *Xba* I tanto à montante quanto à jusante e o sítio de restrição *Apa* I somente à jusante, utilizando um par de oligonucleotídeos geral a todas as construções (Tabela 1). Este produto final foi novamente purificado antes de prosseguir para as clonagens.

Os produtos resultantes do segundo PCR: GARI, FARI, GBRII, GRIIC e FBRII foram analisados em gel de agarose corado por brometo de etídeo (Material e Métodos item 3.6.7) e estão evidenciados na Figura 9.

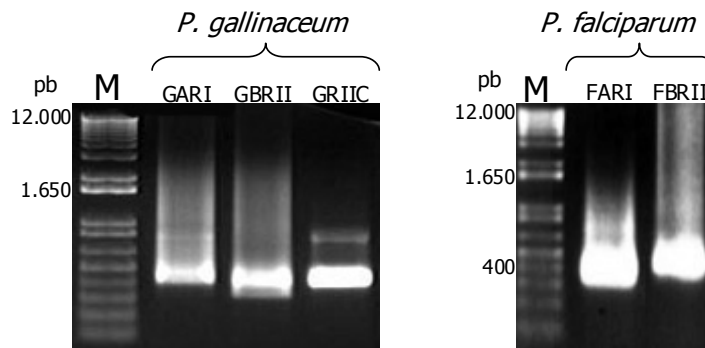


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR referentes às construções, GARI, GBRII, GRIIC, FARI e FBRII. Os fragmentos correspondentes às construções GARI, GBRII, GRIIC (*P. gallinaceum*), FARI e FBRII (*P. falciparum*) foram amplificados por PCR e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e evidenciados por brometo de etídeo. M: marcador de pares de bases 1Kb plus (Invitrogen).

Os fragmentos evidenciados na figura 2 apresentaram o tamanho esperado de aproximadamente 400 pb e foram então submetidos às próximas etapas de clonagem.

4.1.1 CLONAGEM DAS SEQÜÊNCIAS CODIFICADORAS I E II NO PLASMÍDEO ρ GEM[®]-T

Os produtos da amplificação foram purificados e ligados nos braços do vetor de clonagem ρ GEM[®]-T (Promega) seguindo o protocolo do fabricante e então transformados em linhagem de *Escherichia coli* DH10B (Material e Métodos item 3.4.4) gerando as construções para ARI: ρ GEM-GARI, ρ GEM-FARI para BRII: ρ GEM-GBRII e ρ GEM-FBRII e para RIIC: ρ GEM-GRIIC. Os plasmídeos foram recuperados, purificados e digeridos com a enzima de restrição *Xba* I para excisão do inserto, e observados em gel de agarose como mostra a Figura 10. No gel podem ser visualizadas duas bandas: uma superior a qual corresponde ao vetor que possui 3 kb de peso molecular, e a banda inferior que corresponde ao inserto que possui em torno de 400 pb.

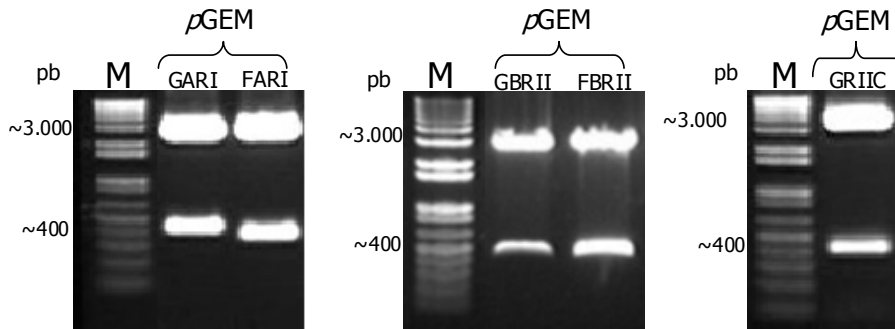


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA dos plasmídeos de clonagem.

O DNA dos plasmídeos das construções ρ GEM-GARI, ρ GEM-FARI (Região II) e ρ GEM-GBRII, ρ GEM-FBRII e ρ GEM-GRIIC (Região II) foram digeridos com a enzima de restrição *Xba* I então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e evidenciados com brometo de etídeo. M: marcador de pares de bases 1 kb plus (Invitrogen).

Os clones selecionados por digestão com enzima de restrição, foram submetidos à reação de seqüenciamento (Material e Métodos item 3.6.9). As seqüências correspondentes às construções propostas estão descritas na Figura 11.



Figura 11. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das construções ARI, BRII e RIIC. Em vermelho, CSP de *P. gallinaceum* (PG); em preto, CSP de *P. falciparum* (PF). Em roxo o peptídeo sinal da maltase; em verde o epítipo Etag; em laranja o sítio de clivagem por *Xba* I; em cinza escuro o sítio de clivagem da *Apa* I. A caixa em amarelo corresponde a Região I e a caixa em cinza corresponde a Região II. As setas indicam o sítio de clivagem do peptídeo sinal Mal-I.

4.1.2 SUBCLONAGEM DAS SEQÜÊNCIAS CODIFICADORAS I E II NO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO TRANSIENTE dsSINDBIS

Para expressar os peptídeos recombinantes propostos neste projeto de uma forma transiente, foi utilizado o sistema de expressão viral dsSindbis. Este vetor contém dois promotores subgenômicos: o primeiro dirige a expressão de 4 proteínas não estruturais e o segundo dirige a expressão das proteínas de capsídeo e as duas proteínas de envelope necessárias para formação do vírus. Na porção 3' foi colocado um terceiro promotor capaz de dirigir a expressão de uma proteína exógena. Na Figura 12 podemos observar a representação esquemática do vetor TE 3'/2] dsSindbis e os sítios de restrição relevantes para a subclonagem.

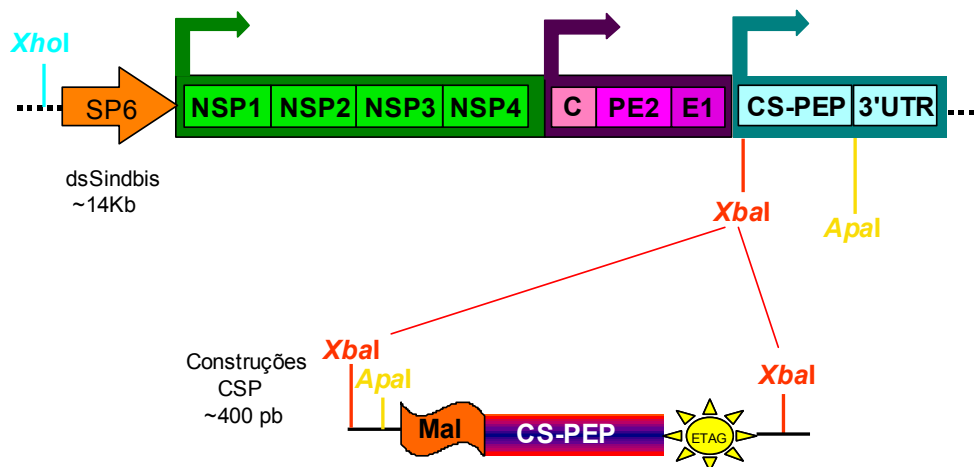


Figura 12. Representação esquemática do vetor dsSindbis e da clonagem das construções CSP.

A seqüência das proteínas recombinantes é inserida no vetor dsSindbis através da enzima de restrição *Xba* I e a conferência da orientação correta é feita através da enzima *Apa* I.

SP6: Seqüência promotora SP6; NSP1,2,3,4: proteínas não estruturais do vírus, C: capsídeo; PE2: proteína de envelope 2, E1: Proteína de envelope 1; CS-PEP: peptídeos recombinantes propostos neste projeto; 3'UTR: região regulatória não traduzida do dsSindbis; Mal: peptídeo sinal da *Maltase-like I* de *A. aegypti* e Etág: epítopo reconhecido por anticorpo comercial anti-Etag.

Após confirmação das seqüências das construções, foi feita a reação de digestão com a enzima *Xba* I e a banda referente ao inserto foi excisada e purificada do gel e o DNA foi ligado nos braços do vetor de expressão dsSindbis como descrito em Material e Métodos (item 3.6.3) utilizando a proporção molar de vetor:inserto de 3:1. A ligação foi transformada em linhagem de *Escherichia coli* SURE gerando as construções para ARI: dsSin-GARI e dsSin-FARI, para BRII: dsSin-GBRII e dsSin-FBRII e para RIIC: dsSin-GRIIC.

O DNA de plasmídeo das construções foi isolado e digerido com a enzima de restrição *Apa* I, para a confirmação da direção da clonagem. Podemos observar na Figura 13 a presença de duas bandas em cada clone: a superior com aproximadamente 14 kb, referente aos braços do plasmídeo dsSindbis e as inferiores com aproximadamente 400 pb correspondentes às construções GARI, FARI, GBRII, FBRII e GRIIC.

Os clones obtidos foram novamente seqüenciados para assegurar que não ocorreram mutações nas seqüências durante o processo de subclonagem.

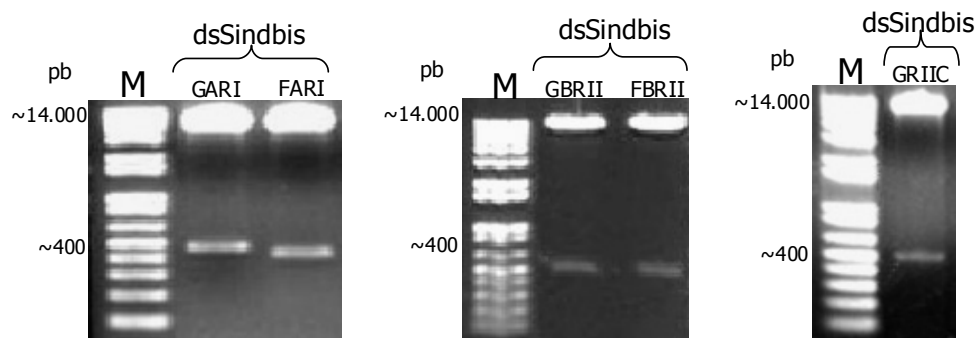


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA dos plasmídeos de subclonagem dsSindbis.

O DNA dos plasmídeos das construções dsSin-GARI, dsSin-FARI, dsSin-GBRII, dsSin-FBRII e dsSin-GRIIC foram digeridos com a enzima de restrição *Apa* I e então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e evidenciados com brometo de etídeo. M: marcador de pares de bases 1 kb plus (Invitrogen).

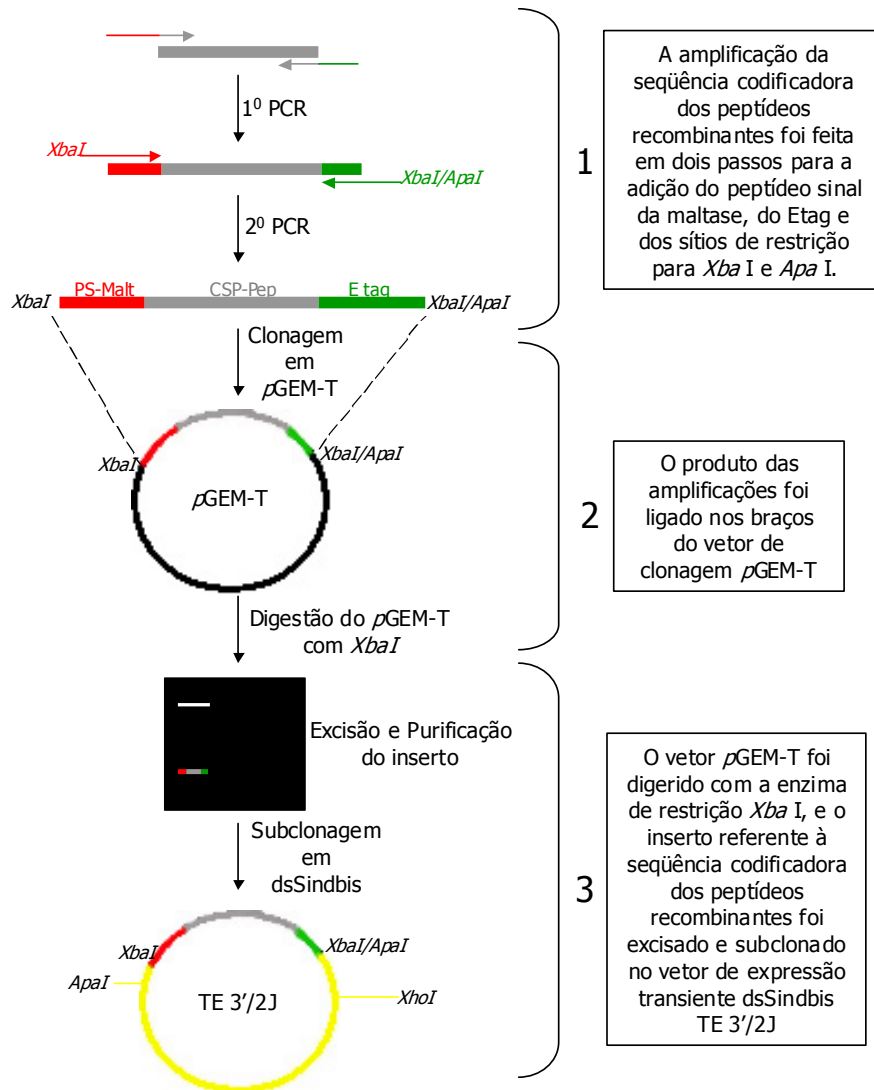


Figura 14. Estratégia de clonagem dos peptídeos recombinantes nos vetores de clonagem e de expressão transiente dsSindbis. PS-Malt: peptídeo sinal da Maltase-like I de *A. aegypti*; CSP-Pep: peptídeos recombinantes; Etag: epítipo reconhecido por anticorpo comercial anti-Etag.

4.1.3 PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS VIRAIS RECOMBINANTES

As construções obtidas dsSin-GARI, dsSin-FARI, dsSin-GBRII, dsSin-FBRII e dsSin-GRIIC, foram linearizadas com a enzima de restrição *Xho* I e procedeu-se à transcrição “*in vitro*”, como descrito em Material e Métodos (item 3.7.1). Na Figura 15 podemos observar os passos para a produção das partículas virais recombinantes.

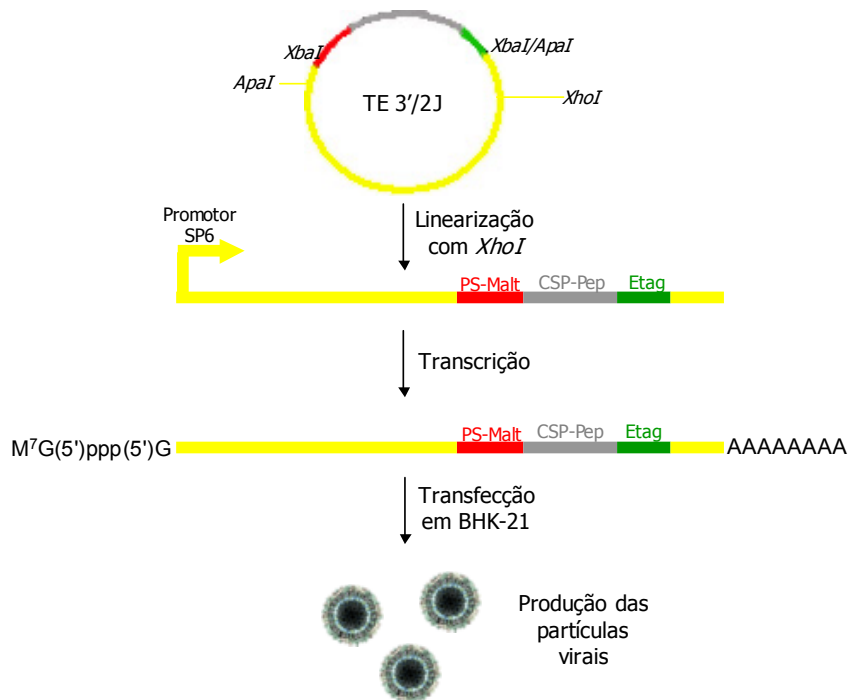


Figura 15. Passos para a produção das partículas virais recombinantes.

Os vetores de expressão transiente dsSindbis TE 3'/2J contendo a sequência codificadora dos peptídeos recombinantes foram linearizados com a enzima de restrição *Xho* I e utilizados para a produção do mRNA. Os mRNAs foram transfectados em células BHK21 e o sobrenadante contendo as partículas virais foi utilizado nos experimentos subsequentes. PS-Malt: peptídeo sinal da *Maltase-like I* de *A. aegypti*; CS-Pep: peptídeos recombinantes; Etag: epítipo reconhecido por anticorpo comercial anti-Etag.

Na figura 16, a fotomicrografia em contraste de fase mostra o efeito citopático em células BHK-21 infectada com o vírus dsSindbis, 24h após infecção. Nas células controle (Figura 16 A e C) se observa as células estreladas, fusiformes com aparência de fibroblastos e aderidas à parede da garrafa com uma confluência de aproximadamente 80%, enquanto que nas células infectadas com dsSindbis-FBRII (Figura 16 B, D, E e F) pôde se observar o efeito citopático nas células, sendo que a maior parte delas estavam mortas e outras se apresentavam arredondadas descolando-se da garrafa. Na Figura 16 E, a fotomicrografia de fluorescência mostra o efeito citopático em células infectadas com dsSindbis-GFP (previamente obtido pelo laboratório) onde a GFP está presente em todas as células, entretanto, observa-se um sinal mais forte, ou seja, maior concentração da GFP nas células arredondadas que estão se descolando da garrafa.

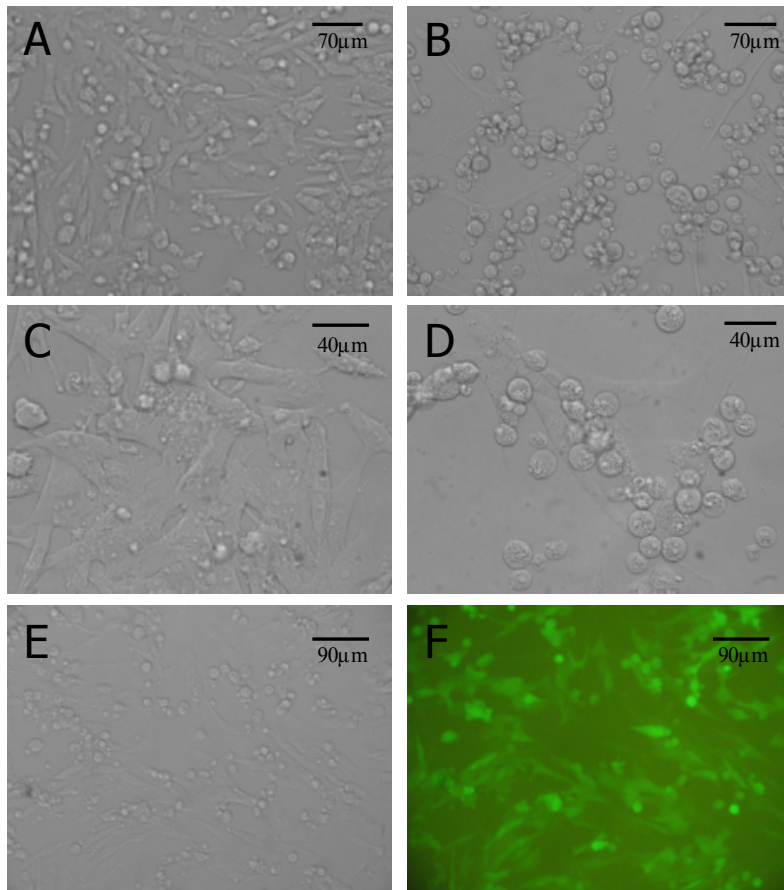


Figura 16. Fotomicrografia de células BHK-21 infectadas com dsSindbis recombinante. A-E. Fotomicrografias em contraste de fase; monocamada de células BHK21, cultivadas com meio de cultura L-15 à 37°C em garrafas de 25cm². A e C. Células controle em menor e maior aumento respectivamente. B e D. Monocamada de células BHK21 infectadas com dsSin-FBRII em menor e maior aumento respectivamente. E. Monocamada de células BHK21 infectadas com dsSindbis-GFP. F. Fotomicrografia de fluorescência de monocamada de células BHK21 infectadas com dsSindbis-GFP.

4.1.4 DETECÇÃO DE mRNA CODIFICADOR DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM MOSQUITOS *Aedes aegypti* MICROINJETADOS COM PARTÍCULAS VIRAIS

Fêmeas das linhagens Higgs selvagem foram microinjetadas intratoracicamente com as partículas virais dsSin-GARI, dsSin-GBRII, dsSin-GRIIC, dsSin-FARI, dsSin-FBRII e como controle negativo foi utilizada a partícula viral dsSin-GFP. Após onze dias, 5 fêmeas foram utilizadas para extração de RNA total e foi realizada a RT-PCR como descrito em Material e Métodos (item 3.8) utilizando o par de oligonucleotídeos Etag/APA/XBA e XBA/MAL (Tabela 2). Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídeo (Figura 17).

Podemos observar que em cada amostra de mosquitos microinjetados com as diferentes partículas virais, foi possível detectar o amplicom correspondente com o tamanho esperado de 400 pb e que portanto o mRNA codificador das proteínas recombinantes ainda estava sendo produzido no dia em que o experimento de comparação da infecção por *Plasmodium gallinaceum* foi realizado. No entanto, na amostra de mosquitos microinjetadas com as partículas dsSin-GARI, pode ser observado duas bandas, uma de tamanho reduzido em relação ao esperado, em torno de 200 pb, e a outra de intensidade bem menor com o tamanho esperado (400 pb) e na amostra de mosquitos microinjetadas com as partículas dsSindbis-FARI visualizou-se uma banda um pouco abaixo do esperado (~370 pb). Como controle negativo do experimento foi utilizado RNA de mosquitos microinjetadas com as partículas dsSin-GFP.

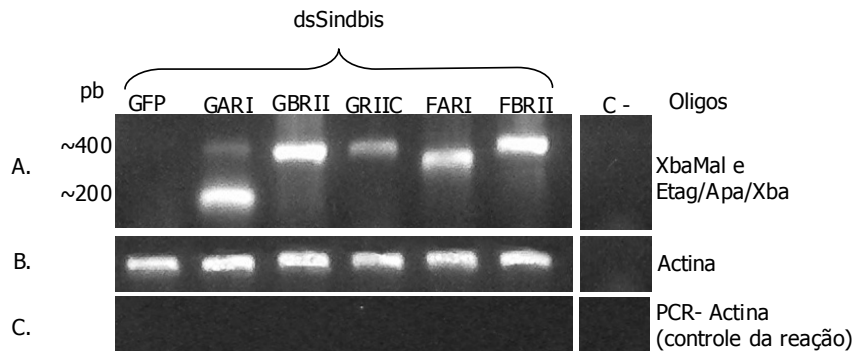


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos de mosquitos microinjetados com partículas virais.

RNAs foram extraídos de fêmeas microinjetadas com dsSin-GFP, dsSin-GARI, dsSin-GBRII, dsSin-GRIIC, dsSin-FARI, dsSin-FBRII, onze dias após a microinjeção e utilizados para a reação de RT-PCR com os primers XbaMal e Etag/Apa/Xba (A), Actina (B). (C) PCR utilizando primers para actina para verificação de DNA contaminante.

4.1.5 "WESTERN BLOT" DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM MOSQUITOS *Aedes Aegypti* MICROINJETADOS COM PARTÍCULAS VIRAIS

Fêmeas de *Aedes aegypti*, onze dias após a microinjeção com as partículas virais recombinantes, foram homogeneizadas em 100 μ L de tampão de amostra, e 20 μ L foram aplicados nos géis de poli-acrilamida na presença de tricina para a separação das proteínas, como descrito em Material e Métodos (item 3.9.1). Foram feitos dois géis idênticos, onde o primeiro foi corado com Comassie blue R (Figura 18 A) e o segundo foi utilizado para a transferência dos polipeptídeos nas membranas de nitrocelulose e a detecção feita pelo anticorpo Etag como descrito em Material e Métodos (item 3.9.2) (Figura 18 B).

Podemos notar na Figura 18 A que o padrão de bandas observadas em fêmeas microinjetadas com dsSin-GFP, é o mesmo observado em fêmeas microinjetadas com dsSin-GARI, dsSin-GBRII, dsSin-GRIIC, dsSin-FARI e dsSin-FBRII não podendo ser visualizada uma banda diferencial entre o grupo controle e os experimentais. O mesmo ocorreu quando este material foi submetido ao experimento de "western blot" com o anticorpo Etag (Figura 18 B), que também não

apresentou uma banda diferencial. Como controle positivo foi utilizada uma linhagem transgênica VgN2scFv (cedido pelo Dr. Anthony James, da Universidade da Califórnia, Irvine) que expressa um anticorpo anti-CSP acoplado ao Etag, sob o comando do promotor de vitelogenina de *Aedes aegypti* (JASISNKIENE et al., 2007).

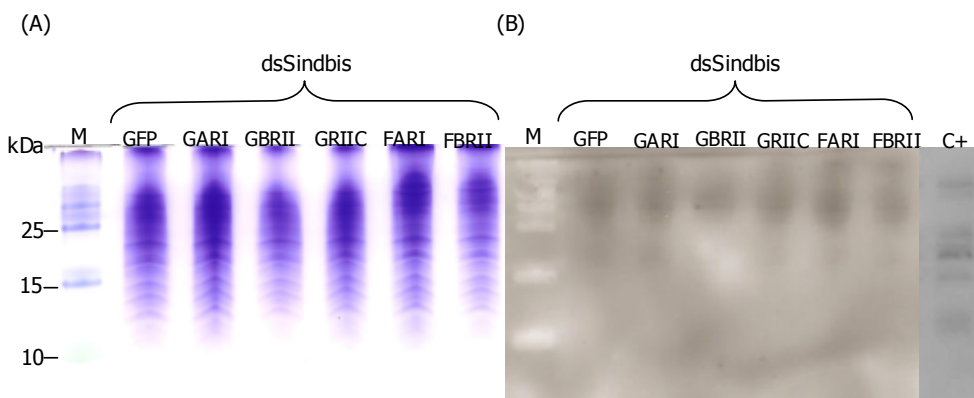


Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina e “Western Blot” de fêmeas de *A. aegypti* microinjetadas com as partículas virais recombinantes. (A) Fêmeas de *A. aegypti* microinjetadas com as partículas virais recombinantes dsSin-GFP, dsSin-GARI, dsSin-GBRII, dsSin-GRIIC, dsSin-FARI e dsSin-FBRII foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina e coradas com Comassie blue R. (B) As proteínas do gel descrito acima foram transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas a “western blot” com o anticorpo Etag. M: marcador de peso molecular *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas Life Sciences, Burlington, Ontário, Canadá), C+ controle positivo linhagem transgênica VgN2scFv, * banda de ~30kDa, reconhecida pelo anticorpo anti-Etag.

4.1.6 COMPARAÇÃO DA INFECÇÃO POR *PLASMODIUM GALLINACEUM* EM MOSQUITOS *AEDES AEGYPTI* MICROINJETADOS COM PARTÍCULAS VIRAIS RECOMBINANTES

Fêmeas adultas de *Aedes aegypti* com 4 dias de idade foram microinjetadas no tórax com as partículas virais de Sindbis recombinantes dsSin-GARI, dsSin-FARI, dsSin-GBRII, dsSin-FBRII e dsSin-GRIIC e dsSin-GFP (controle negativo), como descrito em Material e Métodos (item 3.10). Após 3 dias as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo em *Gallus gallus domesticus* infectado com *Plasmodium gallinaceum*. Para controle do experimento um grupo de mosquitos foi injetado com

dsSindbis recombinante expressando a proteína fluorescente verde (GFP) e alimentado no mesmo pintainho.

No 8º dia após o repasto sanguíneo infectado, pares de glândulas salivares foram dissecadas e homogeneizadas individualmente em PBS e o número de esporozoítas foi determinado sob microscopia de fase, em câmara de Neubauer (Gráficos 1, 2 e 3).

Podemos notar que nos mosquitos microinjetados com as construções respectivas à Região I, dsSin-GARI e dsSin-FARI o número de esporozoítas foi similar ao grupo controle, microinjetado com dsSin-GFP (Gráfico 1). O mesmo ocorreu com os mosquitos microinjetados com as construções respectivas à Região II, dsSin-GBRII, dsSin-GRIIC e dsSin-FBRII, o número de esporozoítas foi similar ao controle microinjetado com dsSin-GFP (Gráficos 2 e 3). Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico Mann-Whitney, sendo que nenhum grupo apresentou uma diferença significativa em relação ao controle.

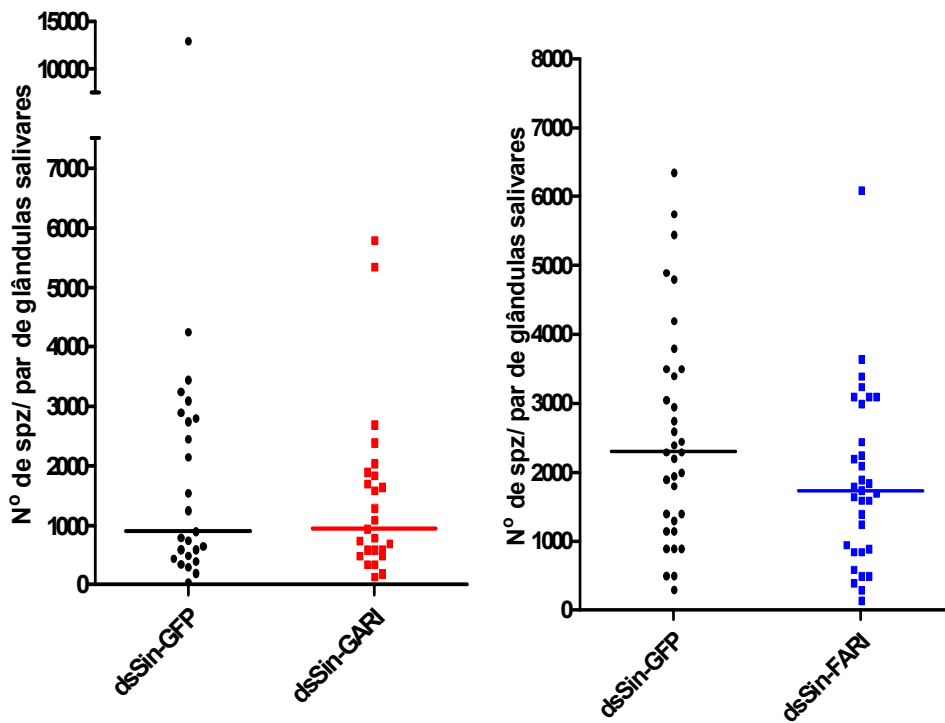


Gráfico 1. Análise comparativa da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em mosquitos *Aedes aegypti* microinjetados com partículas virais recombinantes referentes à região I dsSin-GARI e dsSin-FARI.

Fêmeas de *Aedes aegypti* foram microinjetadas com dsSin-GARI e dsSin-FARI, 3 dias depois alimentadas em pintainhos infectados com *Plasmodium gallinaceum* e 8 dias depois glândulas salivares foram dissecadas e os esporozoítas contados em microscopia de fase.

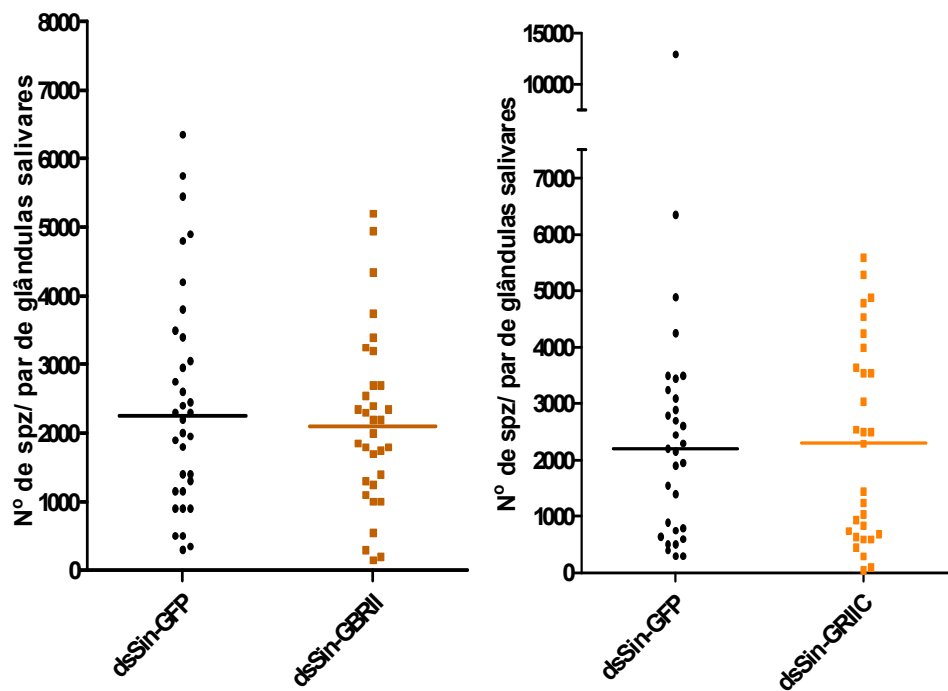


Gráfico 2. Análise comparativa da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em mosquitos *Aedes aegypti* microinjetados com partículas virais recombinantes referentes à região II dsSin-GBR11 e dsSin-GRIIC.

Fêmeas de *Aedes aegypti* foram microinjetadas com dsSin-GBR11 e dsSin-GRIIC, 3 dias depois alimentadas em pintainhos infectados com *Plasmodium gallinaceum* e 8 dias depois glândulas salivares foram dissecadas e os esporozoítas contados em microscopia de fase.

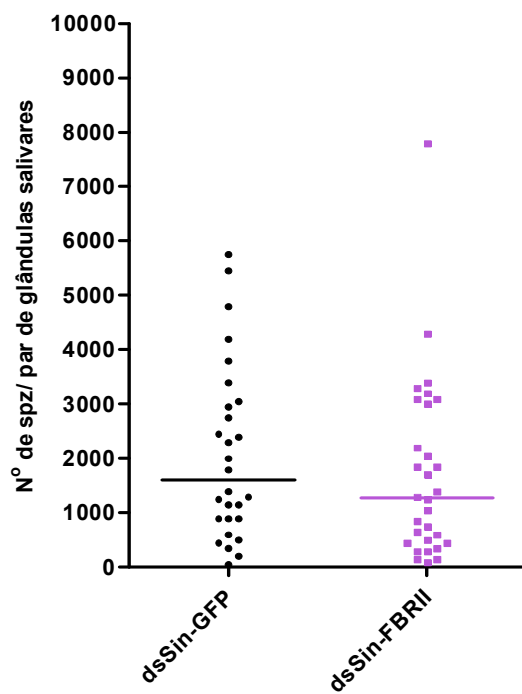


Gráfico 3. Análise comparativa da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em mosquitos *Aedes aegypti* microinjetados com partículas virais recombinantes referentes à região II dsSin-FBR11. Fêmeas de *Aedes aegypti* foram microinjetadas com dsSin-FBR11, 3 dias depois alimentadas em pintainhos infectados com *Plasmodium gallinaceum* e 8 dias depois glândulas salivares foram dissecadas e os esporozoítas contados em microscopia de fase.

4.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE *Aedes aegypti*

4.2.1 CONSTRUÇÃO DOS TRANSGENES

Para a obtenção de uma linhagem transgênica que fosse capaz de expressar proteínas exógenas, no caso as proteínas recombinantes propostas neste projeto, foi feita a síntese gênica. Para dirigir a expressão dos peptídeos recombinantes após a alimentação sanguínea foi utilizado o promotor de vitelogenina de *Aedes aegypti* e para dar estabilidade do mRNA foi utilizada a porção 3'UTR do vírus SV40, ambos contidos no plasmídeo ρ SLfa[AeVg] (KOKOZA et al., 2000) (Figura 19). O peptídeo sinal da maltase foi utilizado para o direcionamento da proteína para a hemolinfa (descrito anteriormente). Por fim, para a inserção do transgene no genoma do mosquito, foi utilizado o elemento de transposição *piggyBac* contido no vetor *piggyBac*[3XP3-eGFP]. Neste vetor está contida também a seqüência promotora 3XP3 responsável pelo direcionamento da proteína eGFP nos olhos dos mosquitos, facilitando a seleção dos mosquitos transgênicos.

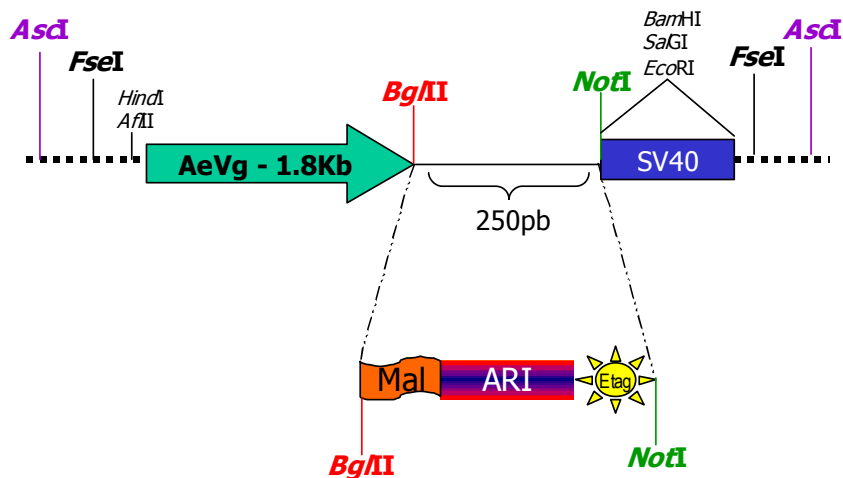


Figura 19. Representação esquemática e mapa dos sítios de restrição do plasmídeo recombinante ρ SLfa[AeVg].

AeVg-1.8Kb: seqüência promotora da vitelogenina de *Aedes aegypti*; SV40: seqüência do 3'UTR do vírus SV40.

Mal: Peptídeo sinal da *Maltase-like I* de *Aedes aegypti*; ARI: porção referente ao peptídeo ARI proposto neste projeto que contém a região I da proteína circumsporozoita de *Plasmodium* sp.; Etag: epítipo reconhecido por anticorpo comercial anti-Etag.

As porções de interesse referentes à região I denominadas ARI (Figura 8), foram novamente amplificadas pela PCR a partir dos vetores obtidos previamente neste projeto denominados ρ GEM-GARI, ρ GEM-FARI (Figura 13), para a inserção dos sítios de restrição *Bgl* II e *Not* I necessárias para a clonagem direcionada nos vetor ρ SLFA[AeVg] (Figura 19). Na Figura 20 podemos observar o perfil eletroforético do produto da amplificação por PCR das duas construções supracitadas.

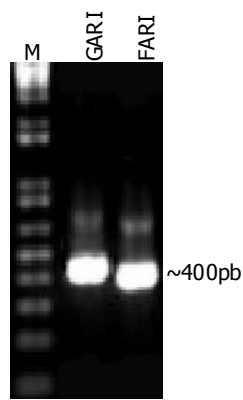


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes às construções GARI e FARI.

Os cDNA correspondentes às construções ARI de *P. gallinaceum* (GARI) e de *P. falciparum* (FARI) foram amplificados pela PCR e os produtos das reações submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e evidenciados com brometo de etídeo. M: marcador de pares de bases 1Kb plus (Invitrogen).

Os fragmentos amplificados apresentaram o tamanho esperado de aproximadamente 400 pb e foram então submetidos às próximas etapas de clonagem.

4.2.2 CLONAGEM DA SEQÜÊNCIA CODIFICADORA DA REGIÃO I NO VETOR TOPO® TA CLONING

O produto da amplificação foi purificado e ligado nos braços do vetor de clonagem TOPO® TA cloning (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante e, então, transformado em linhagem de *Escherichia coli* DH10B gerando as construções: TOPO-GARI, TOPO-FARI. Os DNAs dos plasmídeos foram purificados,

digeridos com a enzima de restrição *Bgl* II e *Not* I e, então, submetidos à eletroforese em gel de agarose (Material e Métodos Item 3.6.7). A Figura 21 mostra duas bandas no perfil eletroforético, evidenciadas por brometo de etídeo. A primeira (~3 Kb) corresponde aos braços do plasmídeo TOPO® TA cloning linearizado, e a segunda corresponde ao inserto e possui em torno de 400 pb.

Os clones, selecionados pelo padrão da enzima de restrição, foram submetidos à reação de sequenciamento antes de prosseguirem as subclonagens.

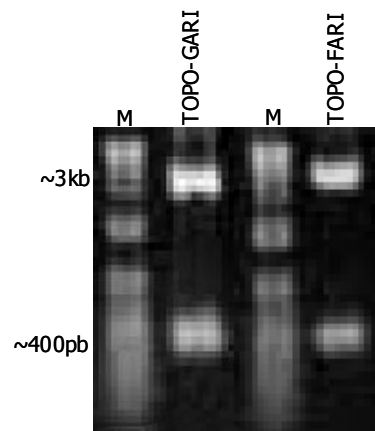


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão de DNA dos plasmídeos de clonagem TOPO-GARI e TOPO-FARI.

O DNA dos plasmídeos das construções TOPO-GARI e TOPO-FARI foram digeridos com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Not* I, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e evidenciados com brometo de etídeo; M: marcador de pares de bases 1Kb plus (Invitrogen).

4.2.3 SUBCLONAGEM DA SEQÜÊNCIA CODIFICADORA DA REGIÃO I NO VETOR *pSLfa*[AeVg]

O DNA do plasmídeo *pSLfa*[AeVg] (Figura 19), foi transformado em linhagem de *Escherichia coli* DH10B e, após ser recuperado por preparação de DNA de plasmídeos, foi linearizado com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Not* I.

O DNA dos plasmídeos das construções TOPO-GARI e TOPO-FARI foram também submetidos à reação de digestão com a enzima *Bgl* II e *Not* I e os fragmentos (~400pb) foram excisados e purificados dos géis. O DNA foi ligado nos

braços do vetor descrito acima. Após a ligação, a linhagem de *Escherichia coli* DH10B foi transformada gerando as construções: ρ SLfa[AeVg-GARI] e ρ SLfa[AeVg-FARI].

A Figura 22 A mostra o produto das digestões dos plasmídeos gerados digeridos com a enzima *Bgl* II e *Not* I. Nos géis podem ser observadas duas bandas: uma superior que corresponde ao peso molecular esperado para o vetor ρ SLfa[AeVg] em torno de 5,6 kb (3,4 kb do próprio vetor e 2,2 kb do promotor de vitelogenina e o 3'UTR do vírus SV40) e a banda inferior, que corresponde ao peso molecular esperado para o inserto liberado, com peso molecular em torno 400 pb.

Para a excisão de todo o transgene, este mesmo plasmídeo foi digerido com a enzima *Asc* I. Na Figura 22 B podemos observar o padrão de digestão com essa enzima em que são observadas duas bandas: uma superior com peso molecular esperado para o vetor ρ SLfa[AeVg] em torno de 3,4 Kb e outra inferior que corresponde ao peso molecular esperado para o inserto liberado em torno 2,6 Kb.

Os clones obtidos foram novamente seqüenciados para assegurar que não ocorreram mutações em suas seqüências durante todo o processo.

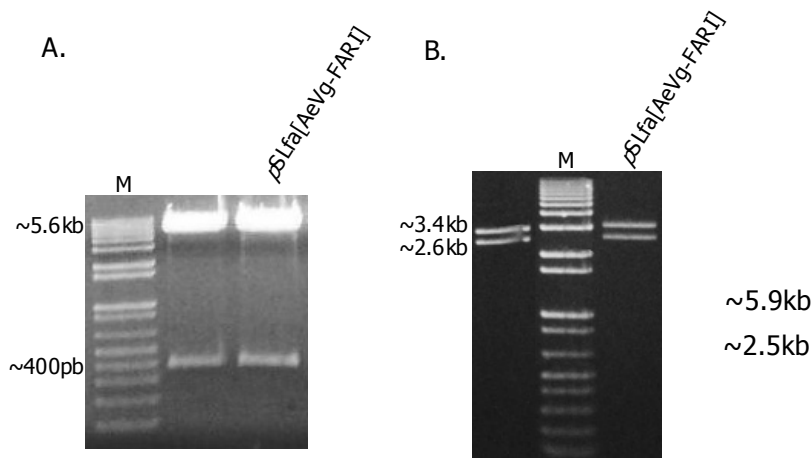


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA dos plasmídeos de clonagem ρ SLfa[AeVg-GARI] e ρ SLfa[AeVg-FARI].

O DNA dos plasmídeos das construções ρ SLfa[AeVg-GARI], ρ SLfa[AeVg-FARI], foram digeridos com a enzima de restrição *Bgl* II, *Not* I (A) e *Asc* I (B), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e evidenciados com brometo de etídeo. M: marcador de pares de bases 1Kb plus (Invitrogen).

4.2.4 SUBCLONAGEM DA SEQÜÊNCIA CODIFICADORA DA REGIÃO I NO VETOR DE TRANSGÊNESE *PIGGYBAC*[3XP3-eGFP]

O DNA do plasmídeo *piggyBac*[3Xp3-eGFP], que contém as seqüências invertidas do transposon *piggyBac* e o promotor de olho 3XP3 dirigindo a expressão da proteína fluorescente (Figura 23), foi transformado em linhagem de *Escherichia coli* DH10B (Material e Métodos item 3.4.4). Após ser recuperado por preparação de DNA de plasmídeos, foi feita a linearização com a enzima de restrição *Asc* I e a desfosforilação (Material e Métodos item 3.6.6) para prevenir sua religação.

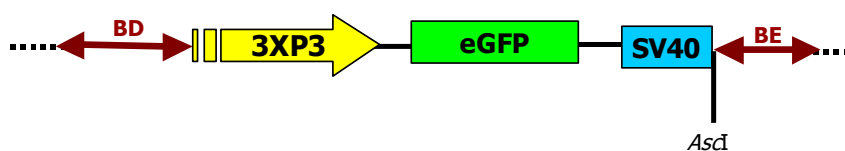


Figura 23. Representação esquemática do vetor de transgênese *piggyBac*[3Xp3-eGFP]. BD: braço direito do elemento de transposição *piggyBac*; 3xP3: promotor de olhos, eGFP: gene que codifica a proteína fluorescente verde, SV40: 3'UTR do vírus SV40, BE: braço esquerdo do elemento de transposição.

O DNA dos plasmídeos das construções *pSLfa*[AeVg-GARI] e *pSLfa*[AeVg-FARI] foi também submetido à reação de digestão com a enzima *Asc* I e os fragmentos (~2,6 Kb) foram excisados e purificados dos géis, como descrito em Material e Métodos (item 3.6.8). Em seguida, o DNA foi ligado nos braços do vetor de transgênese *piggyBac*[3Xp3-eGFP] previamente digeridos com a mesma enzima. Após a ligação a linhagem de *Escherichia coli* DH10B foi transformada gerando as construções: *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] e *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI].

A Figura 24 mostra o produto das digestões dos plasmídeos *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] e *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI]. Nos géis podem ser observadas duas bandas: uma superior que corresponde ao peso molecular esperado para vetor *piggyBac*[3Xp3-eGFP] em torno de 5.9kb e outra inferior, que corresponde ao peso

molecular esperado para o inserto liberado, em torno 2.5Kb. Todos os transgenes tiveram suas seqüências confirmadas.

Todos os passos posteriores para a clonagem dos peptídeos recombinantes no vetor de transgênese *piggyBac*[3XP3-eGFP] estão mostrados na Figura 25.

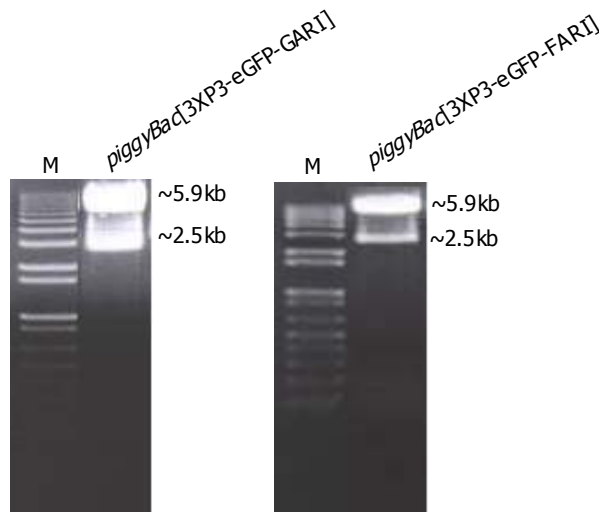


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA dos plasmídeos de transgênese *piggyBac*[3XP3-eGFP-GARI] e *piggyBac*[3XP3-eGFP-FARI]. O DNA dos plasmídeos das construções *piggyBac*[3XP3-eGFP-GARI] e *piggyBac*[3XP3-eGFP-FARI] foram digeridos com a enzima de restrição *Asc* I, foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e evidenciados com brometo de etídeo. M: marcador de pares de bases 1Kb plus (Invitrogen).

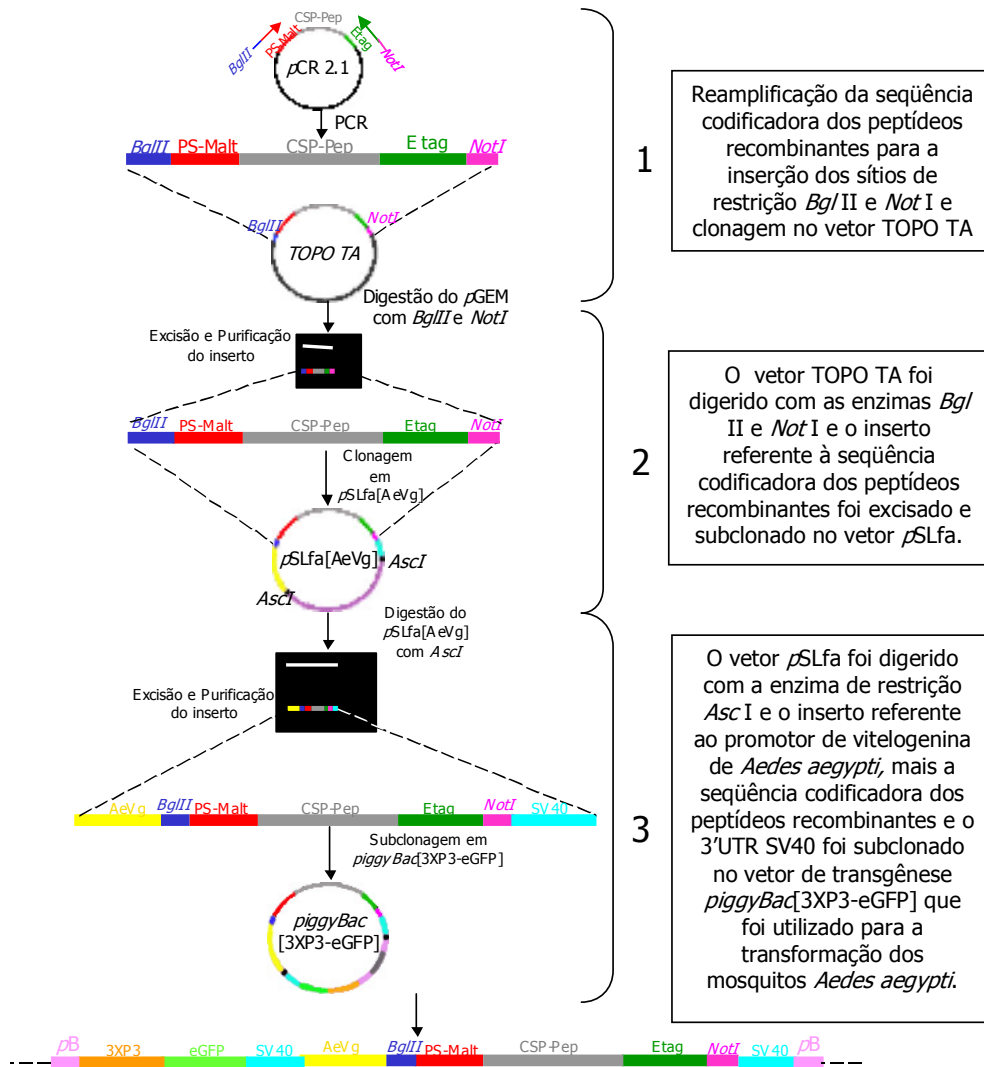


Figura 25. Estratégia de clonagem dos peptídeos recombinantes no vetor de transgênese *piggyBac*[3XP3-eGFP].

PB: seqüência invertida do transposon *piggyBac*, 3xP3: promotor de olhos, eGFP: gene que codifica a proteína fluorescente verde, SV40: 3'UTR do vírus SV40, AeVg: promotor do gene de vitelogenina de *A. aegypti*; PS-Malt: peptídeo sinal da *Maltase-like I* de *A. aegypti*; CS-Pep: peptídeos recombinantes; Etag: epítipo reconhecido por anticorpo comercial anti-Etag.

4.2.5 PRODUÇÃO DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE *Aedes Aegypti*

No experimento cujo plasmídeo utilizado foi o *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI], 1098 embriões foram microinjetados e destes 111 larvas foram recuperadas apresentando uma taxa de eclosão de 10% (Tabela 3).

Foram obtidas 27 famílias de machos que foram identificadas por F#X (onde x representa número dado às famílias conforme foram montadas) e 6 grupos ou "pools" de fêmeas que foram identificados por P#X (onde x representa número dado aos "pools" conforme foram montadas) (Tabela 4). As fêmeas provenientes das famílias e dos grupos realizaram dois repastos sanguíneos.

No total, foram analisadas em torno de 3.248 larvas sendo que 1 larva pertencente a F#8 (família de machos número 8), 10 larvas pertencentes a P#1 (pool de fêmeas número 1) e 66 larvas pertencentes a P#4 (pool de fêmeas número 4) apresentaram o fenótipo esperado com a expressão de GFP em ambos os olhos, como apresentado na Tabela 3 e 4.

Tabela 3. Número de embriões injetados que geraram prole com a presença de GFP nos dois olhos.

Construção Microinjetada	Nº de embriões microinjetados	Larvas (% de eclosão)	Larvas analisadas	Larvas positivas
<i>pBac</i> [AeVg-GARII]	1098	111 (10%)	3.248	77
<i>pBac</i> [AeVg-FARII]	885	315 (35%)	50.480	8

Tabela 4. Famílias de machos e pools de fêmeas formados, número de larvas analisadas e números de larvas positivas quanto à presença de GFP nos olhos, resultantes do experimento utilizando a construção *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI].

Famílias de machos (F#X)	Larvas analisadas	Nº Larvas positivas para GFP	Pools de fêmeas (P#X)	Larvas analisadas	Nº Larvas positivas para GFP
F#1	350	0	P#1	100	10
F#2	70	0	P#2	20	0
F#3	80	0	P#3	20	0
F#4	2	0	P#4	150	66
F#5	130	0	P#5	0	0
F#6	200	0	P#6	0	0
F#7	0	0			
F#8	1	1			
F#9	400	0			
F#10	200	0			
F#11	200	0			
F#12	80	0			
F#13	130	0			
F#14	0	0			
F#15	200	0			
F#16	30	0			
F#17	50	0			
F#18	150	0			
F#19	150	0			
F#20	50	0			
F#21	0	0			
F#22	150	0			
F#23	300	0			
F#24	0	0			
F#25	20	0			
F#26	0	0			
F#27	15	0			
Total	2959	1	Total	290	76

No experimento cujo plasmídeo utilizado foi o *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI], oitocentos e oitenta e cinco embriões foram microinjetados, destes trezentos e quinze larvas foram recuperadas apresentando uma taxa de eclosão de 35% (Tabela 3).

Foram obtidas 4 famílias de machos constituídos por F#1: 41 machos microinjetados com 410 fêmeas; F#2: 19 machos microinjetados com 190 fêmeas selvagens; F#3: 50 machos microinjetados com 500 fêmeas selvagens e F#4: 48 machos microinjetados com 480 fêmeas selvagens. Foram obtidos 3 pools de fêmeas constituídos por P#1: 34 fêmeas microinjetadas com 40 machos selvagens; P#2: 61 fêmeas microinjetadas com 61 machos selvagens; P#3: 62 fêmeas microinjetadas com 62 machos selvagens (Tabela 5). As fêmeas provenientes das famílias e dos pools realizaram entre três e quatro repastos sanguíneos.

No total foram analisadas aproximadamente 50.480 larvas e 8 larvas pertencentes ao P#3 (Tabela 3 e 5), apresentaram o fenótipo esperado com a expressão de GFP em ambos os olhos (Figura 26 A). A expressão do GFP nos olhos, também pôde ser observada nos estágios de pupas e em adultos. As larvas que apresentaram a fluorescência em um só olho ou no abdômen foram descartadas.

Tabela 5. Famílias de machos e pools de fêmeas formados, número de larvas analisadas e números de larvas positivas quanto à presença de GFP nos olhos, resultantes do experimento utilizando a construção *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI].

Famílias de machos (F#X)	Larvas analisadas	Nº Larvas positivas para GFP	Pools de fêmeas (P#X)	Larvas analisadas	Nº Larvas positivas para GFP
F#1	21.550	0	P#1	1.350	0
F#2	14.750	0	P#2	355	0
F#3	4.200	0	P#3	1.225	8
F#4	7.050	0			
Total	47.550	0	Total	2.930	8

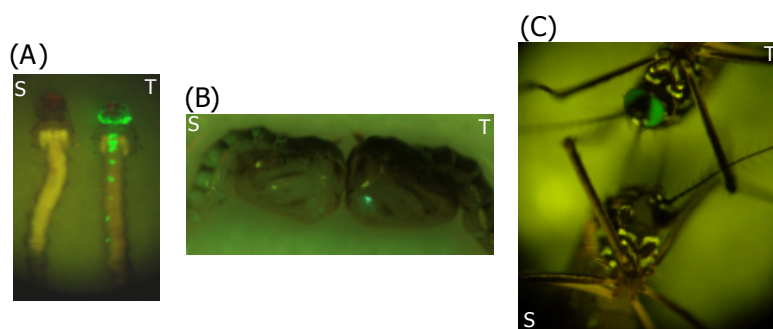


Figura 26. Detecção do gene repórter em mosquitos transgênicos para as construções *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] e *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] em microscópio de fluorescência.

O GFP foi detectado nos dois olhos nos estágios de larva (A), pupa (B) e nos adultos (C) em mosquitos transgênicos (T) e não em mosquitos selvagens (S). E apenas nas larvas transgênicas, o GFP pode ser detectado na papila anal e no tubo neural.

4.2.6 PCR DE DNA GENÔMICO DA LINHAGEM *PIGGYBAC*[3XP3-EGFP-GARI]

Foram utilizados para extração de DNA genômico seis mosquitos da linhagem transgênica *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1, P#4 e seis mosquitos não transgênicos (controle negativo), como descrito em Material e Métodos (item 3.12.1). Deste material 1 μ L foi utilizado para a reação de PCR descrito em Material e Métodos item 3.6.1, sendo utilizado o par oligonucleotídeos GARI_FOW e GARI_REV (Tabela 2).

Na Figura 27 podemos observar o perfil eletroforético do produto da amplificação por PCR proveniente da extração de DNA genômico das linhagens supracitadas.

Podemos verificar que, para todas as linhagens, houve amplificação comprovando que ocorreu a inserção do transgene no genoma, o que não aconteceu com a amplificação proveniente de mosquitos não transgênicos, utilizada como controle negativo. Podemos observar também que, para as linhagens *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1, P#4, a amplificação gerou um fragmento de

tamanho esperado, em torno de 200 pb. Já a linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] F#8 a amplificação gerou um tamanho maior que o esperado, em torno de 1000 pb.

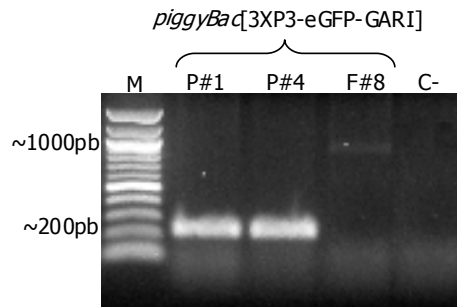


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes ao DNA genômico das linhagens transgênicas *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1, P#4, F#8 e mosquitos não transgênicos.

Os fragmentos de DNA correspondentes às construções GARI foram amplificados pela PCR utilizando-se DNA genômico das linhagens transgênicas *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1, P#4, F#8 sendo os produtos das reações submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e evidenciados com brometo de etídeo. M: marcador de pares de bases Quick-Load 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs), C-: controle negativo no qual foi utilizado DNA genômico de mosquitos não transgênicos.

4.2.7 "SOUTHERN BLOT" DA LINHAGEM *PIGGYBAC*[3XP3-EGFP-FARI]

Cinco mosquitos da linhagem transgênica *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3 e cinco mosquitos não transgênicos, foram utilizados para extração de DNA genômico, como descrito em Material e Métodos (item 3.12.1). Aproximadamente 10 µg de DNA genômico foram utilizados para digestão com a enzima *Bgl* II e/ou *Not* I, por aproximadamente dezesseis horas. Após a digestão, o DNA genômico foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% a 110V por aproximadamente quatro horas. O material foi transferido para a membrana de nylon e hibridado com a sonda referente ao fragmento do GFP, como descrito em Material e Métodos (item 3.12.3 e 3.12.4).

Na Figura 28, podemos observar uma única banda de 10 Kb referente à linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3, indicando que apenas uma cópia do transgene foi inserida no genoma do mosquito.

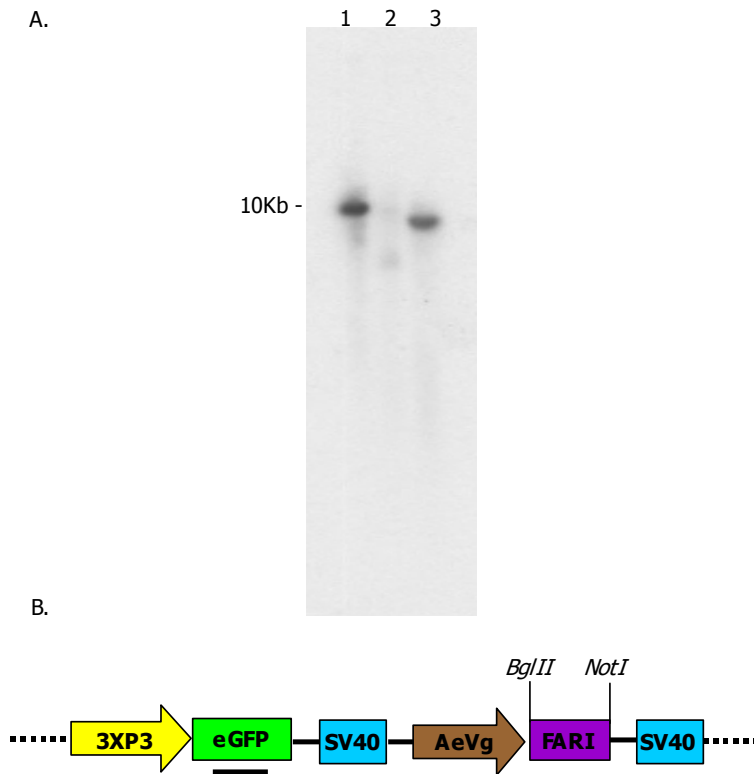


Figura 28. Autoradiografia de "Southern Blot" de DNA genômico da linhagem transgênica FARI-pBac P#3.

A- O DNA genômico da linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3, foi digerido com a enzima *Bgl* II (1), *Bgl* II e *Not* I (2) e *Not* I (3), submetido a gel de agarose 0.8%, transferido para membrana de Nylon e incubado com a sonda GFP.

B- Esquema geral do transgene FARI - a barra inferior indica a porção utilizada para gerar a sonda radioativa.

4.2.8 ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DO TRANSGENE ATRAVÉS DE RT-PCR SEMI QUANTITATIVO

Dez fêmeas de cada linhagem: *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1, P#4 e F#8 e *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3 e selvagem foram utilizadas para extração de RNA

total, nos pontos não alimentadas (NBF), vinte e quatro (24h), quarenta e oito (48h) e setenta, duas horas (72h) após repasto sanguíneo e machos (somente para a linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI]), como descrito em Materiais e Métodos (item 3.8.1). Após a extração, o RNA foi tratado com a enzima DnaseI e realizou-se o RT-PCR. Na figura 14 podemos observar os produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos de *Aedes aegypti* selvagem.

Pode-se notar que não houve amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos da linhagem selvagem Higgs, quando foram utilizados oligos específicos para os genes GARI e FARI (Figura 29 A e B), mostrando que esses oligos são específicos para os transgenes correspondentes. No entanto, quando utilizados os oligos específicos de vitelogenina, no ponto 24h, fica evidenciado uma forte banda que diminui de intensidade nos pontos 48h e 72h (Figura 29 C). O mesmo para o controle positivo em que foram utilizados os pares de oligos para actina, que também apresentou níveis normais de expressão (Figura 29 D). (Figura 29 D).

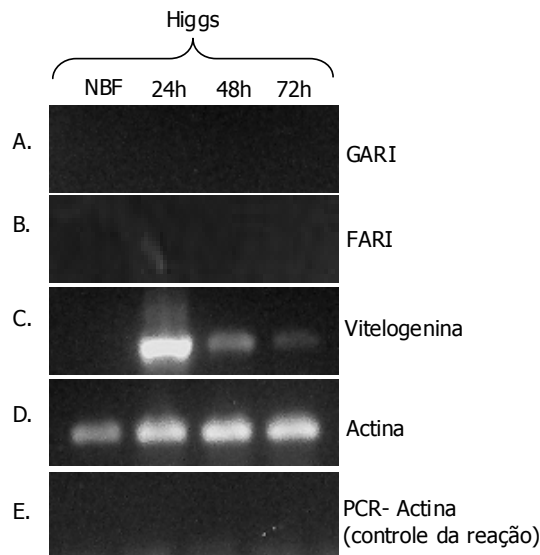


Figura 29. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos da linhagem selvagem Higgs.

RNAs foram extraídos de fêmeas, nos pontos: não alimentadas (NBF), 24h, 48h e 72h após alimentação sanguínea foram utilizados para a reação de RT-PCR com os primers para os genes GARI (A), FARI (B), vitelogenina (C), actina (D). (F) PCR utilizando primers para actina para verificação de DNA contaminante.

Na Figura 30 podemos observar os produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos da linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1, P#4 e F#8.

Surpreendentemente, nenhuma das três linhagens apresentou o padrão de expressão do transgene esperado, não havendo amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos na qual foram utilizados oligos específicos para o gene em questão (GARI) em nenhum dos pontos extraídos, com exceção da linhagem P#1 que mostrou uma fraca expressão do transgene 24h após alimentação sanguínea. No entanto, quando foram utilizados os oligos específicos de vitelogenina, no ponto 24h, fica evidenciada uma forte banda que diminui de intensidade nos pontos 48h e 72h (Figura 30 B), indicando o padrão de expressão esperado para a vitelogenina endógena, demonstrado na linhagem selvagem Higgs (Figura 29 C). O controle positivo utilizado, a actina, também apresentou níveis normais de expressão (Figura 30 C).

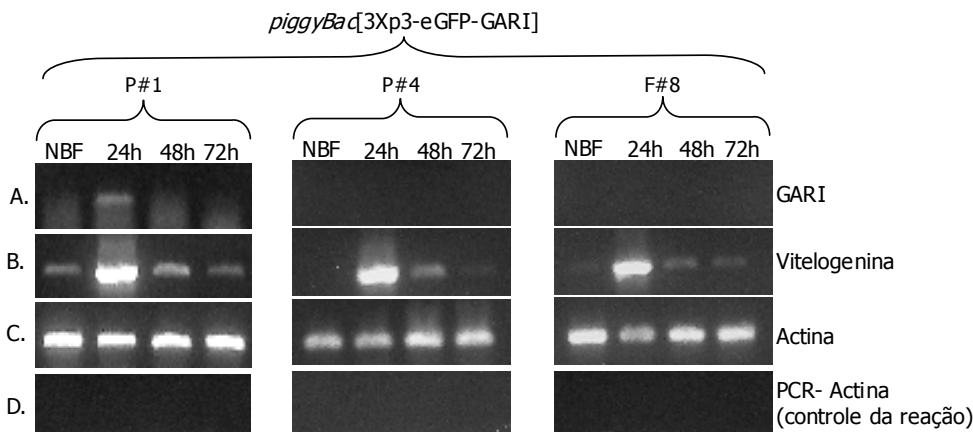


Figura 30. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos da linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI]. RNAs foram extraídos de fêmeas das linhagens P#1, P#4 e F#8, nos pontos não alimentadas (NBF), 24h, 48h e 72h após alimentação sanguínea e utilizados para a reação de RT-PCR com os primers para o gene GARI (A), vitelogenina (B), actina (C). (F) PCR utilizando primers para actina para verificação de DNA contaminante.

Na Figura 31 podemos observar os produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos da linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3. No ponto 24h fica evidenciada uma forte banda que diminui de intensidade nos pontos 48h e 72h (Figura 31 A) e ausente nos machos, quando utilizados os oligos para a construção FARI. Este resultado nos indica a produção de mRNA relativo ao transgene e segue um padrão esperado semelhante ao padrão do gene endógeno de vitelogenina, como mostrado na figura 29 C para linhagem selvagem Higgs.

Quando utilizados os oligos específicos de vitelogenina, o perfil transcricional do gene endógeno foi o esperado; no ponto 24h ficou evidenciada uma forte banda que diminui de intensidade nos pontos 48h e 72h e fica ausente nos machos (Figura 31 B). O mesmo segue para o controle positivo actina, que também apresentou níveis normais de expressão (Figura 31 C).

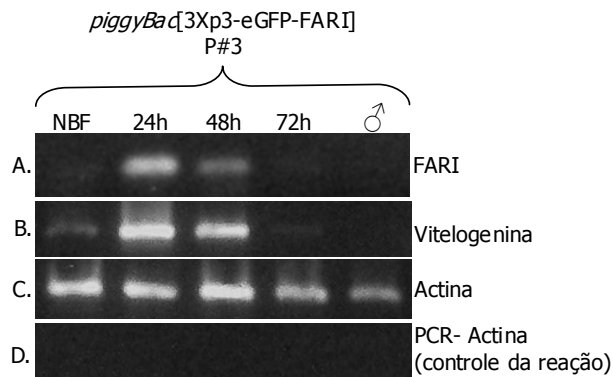


Figura 31. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir de fitas de cDNA provenientes dos RNAs extraídos da linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI]. RNAs foram extraídos de fêmeas das linhagens P#1, P#4 e F#8, nos pontos: não alimentadas (NBF), 24h, 48h, 72h após alimentação sanguínea e nos machos, então foram utilizados para a reação de RT-PCR com os primers para o gene FARI (A), vitelogenina (B), actina (C). (D) PCR utilizando primers para actina para verificação de DNA contaminante.

4.2.9 ANÁLISE DA HEMOLINFA DE FÊMEAS DE *Aedes aegypti* POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA (RP-HPLC) ACOPLADA A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Hemolinfa de 20 fêmeas de *Aedes aegypti* transgênicas para a linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1 e *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3 e mosquitos selvagens, 48 horas após alimentação sanguínea foram extraídas como descrito em Material e Métodos (item 3.13.1). Peptídeos presentes neste tecido foram reduzidos e alquilados por DTT e iodocetamida, respectivamente (Material e Métodos item 3.13.2).

Após este passo, as amostras que foram digeridas por tripsina (Material e Métodos item 3.13.3) e purificadas através de uma cromatografia manual de extração de fase sólida em coluna C₁₈, foram então submetidas a uma cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) acoplada a um espectrômetro de massas (Material e Métodos item 3.13.4).

Na primeira análise, em LC-MS foram comparados então os perfis cromatográficos das frações eluídas provenientes da hemolinfa de *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1 com o selvagem e *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3 com o selvagem (Figura 32 e Figura 33 respectivamente), no entanto, não houve diferença entre eles, pois todas as massas moleculares obtidas das amostras experimentais foram encontradas no controle.

Foi feita então uma segunda análise, a LC-MS/MS, após a coleta dos dados e da cromatografia e as seqüências obtidas foram comparadas tanto ao banco de seqüências de aminoácidos não-redundante, quanto ao banco de seqüências de *Plasmodium*. Evidenciou-se que havia basicamente proteínas de *Aedes aegypti*, o que era esperado, entretanto não foi possível detectar nenhuma proteína de plasmódios, como a CSP, indicando que os peptídeos recombinantes não foram expressos.

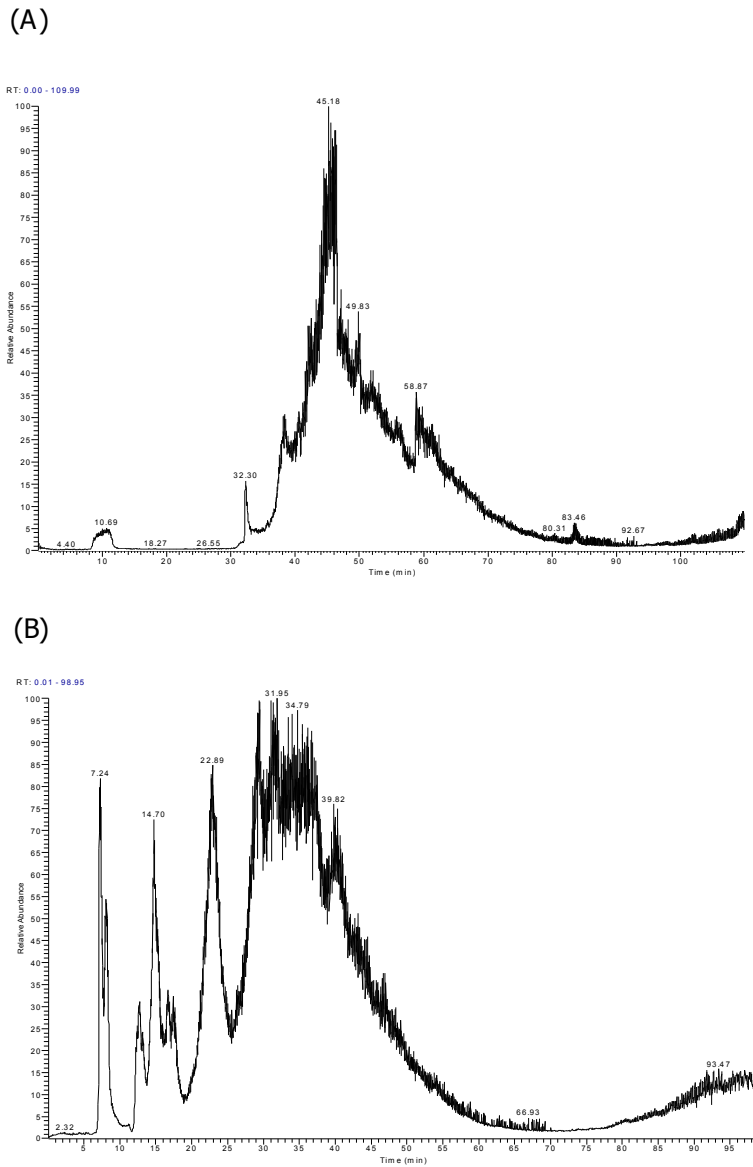


Figura 32. Perfil cromatográfico (abundância relativa de ionização x tempo) das frações eluídas provenientes da hemolinfa de *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1 e selvagem.

Hemolinfa de fêmeas selvagens (A) e transgênicas da linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1 (B) 48 horas após alimentação sanguínea foram extraídas e purificadas através de uma cromatografia manual de extração de fase sólida em coluna C₁₈ e a fração eluída com 80% acetonitrila, submetida à cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) acoplada a um espectrômetro de massas.

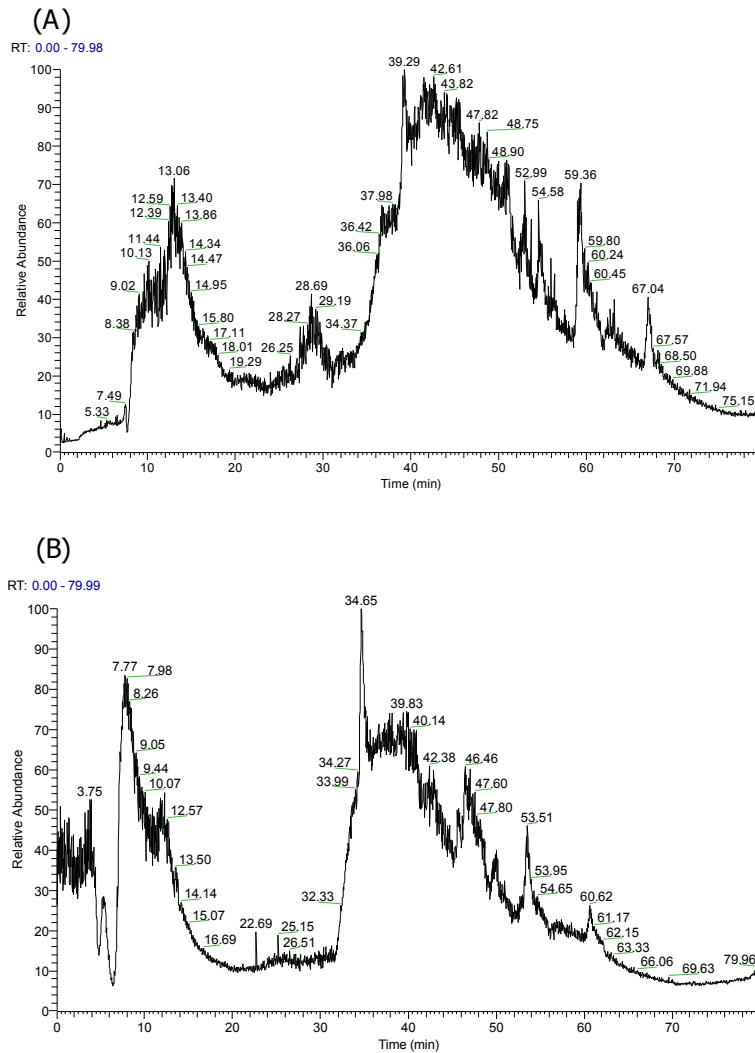


Figura 33. Perfil das frações eluídas provenientes da hemolinfa de *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3 e selvagem.

Hemolinfa de fêmeas selvagens (A) e transgênicas da linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3 (B) 48 horas após alimentação sanguínea foi extraída e purificada através de uma cromatografia manual de extração de fase sólida em coluna C_{18} e a fração eluída com 80% acetonitrila, submetida cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) acoplada a um espectrômetro de massas.

4.2.10 ANÁLISE COMPARATIVA DA INFECÇÃO POR *PLASMODIUM GALLINACEUM* DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS OBTIDAS

Fêmeas adultas de *Aedes aegypti*, previamente selecionadas quanto à presença de GFP nos olhos, realizaram o repasto sanguíneo em *Gallus gallus domesticus* infectado com *Plasmodium gallinaceum* com parasitemia entre 8 a 11%. Para controle do experimento um grupo de fêmeas de *Aedes aegypti* selvagens também se alimentaram no mesmo pintainho. No 5º dia após o repasto sanguíneo infectado, uma nova alimentação sanguínea foi oferecida, mas desta vez de camundongos saudáveis.

No 8º dia após o repasto sanguíneo infectado, pares de glândulas salivares foram dissecados e homogeneizados individualmente em tampão PBS e o número de esporozoítas foi determinado sob microscopia de fase em câmara de Neubauer, como descrito em Material e Métodos item 3.14.

Podemos observar no Gráfico 4 que, o número de esporozoítas contados a partir de glândulas salivares obtido dos mosquitos transgênicos da construção *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] das linhagens P#1, P#4 e F#8 foi similar ao grupo controle de mosquitos selvagens. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. Nenhuma linhagem transgênica apresentou uma diferença significativa em relação ao controle.

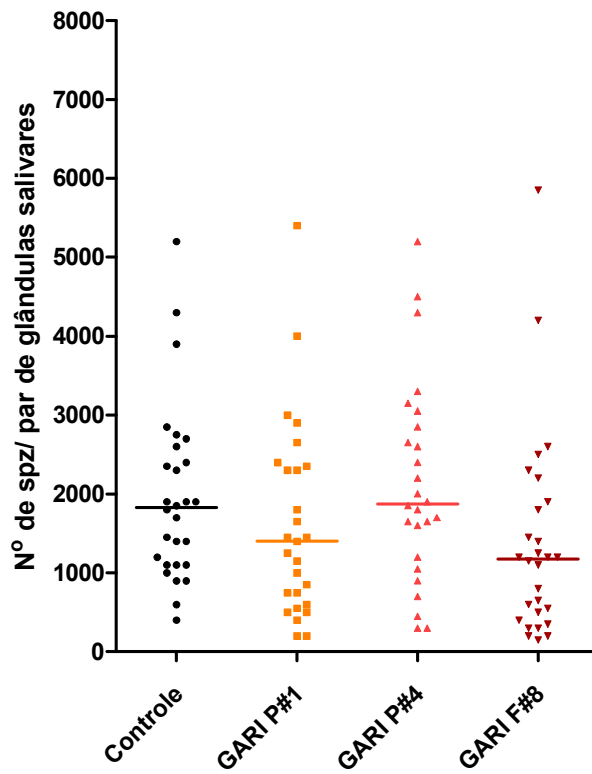


Gráfico 4. Análise comparativa da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos da construção *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] das linhagens P#1, P#4 e F#8.

Fêmeas de *Aedes aegypti* transgênicas e selvagens foram alimentadas em pintainhos infectados com *Plasmodium gallinaceum* e 8 dias depois glândulas salivares foram dissecadas e os esporozoítas contados em microscopia de fase.

O mesmo foi observado nas linhagens transgênicas da construção *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] (Gráfico 5). Os dados também foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico Mann-Whitney e também não houve diferença significativa entre a linhagem transgênica e o controle selvagem.

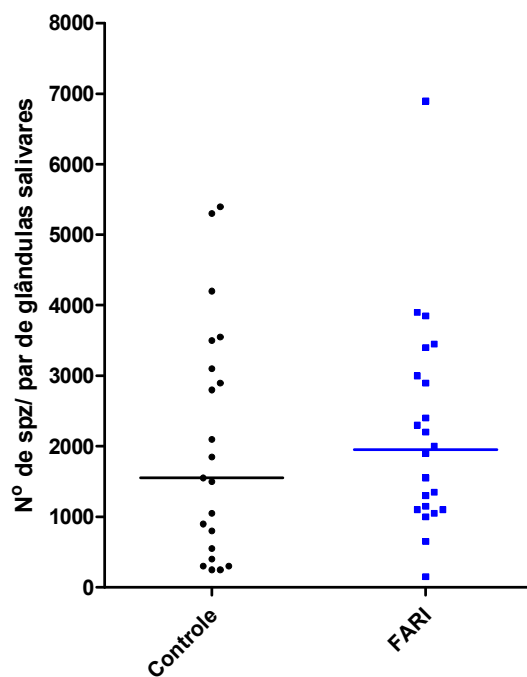


Gráfico 5. Análise comparativa da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos da construção *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] das linhagens P#3.

Fêmeas de *Aedes aegypti* transgênicas e selvagens foram alimentadas em pintainhos infectados com *Plasmodium gallinaceum* e 8 dias depois glândulas salivares foram dissecadas e os esporozoítas contados em microscopia de fase.

DISCUSSÃO



5 DISCUSSÃO

A proteína circumsporozoíta é uma das proteínas de plasmódios mais estudadas, com mais de 1000 trabalhos publicados desde a sua descoberta. Este grande interesse é dado pelo fato de que esta é a proteína mais expressa na superfície do esporozoíta, constituindo 5-15% das proteínas totais produzidas (YOSHIDA et al.; 1981), altamente imunogênica (ZAVALA et al., 1983) e é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Devido a estas características, a CSP é uma excelente candidata para produção de vacinas contra a malária e muitos dos estudos com essa proteína visam essa abordagem.

No entanto, até o momento, nenhuma das vacinas testadas conseguiu ser realmente efetiva. Existem várias vacinas em teste atualmente e a mais promissora delas, RTS,S (utiliza porção repetidora da CSP em sua composição) é capaz de reduzir substancialmente a incidência de malária severa em crianças, mas a proteção é de apenas 57% com um amplo intervalo de confiança, além disso está ainda em teste Fase III (SHARMA e PATHAK, 2008; COHEN et al.; 2009). Este fato, aliado à resistência dos parasitas em relação às drogas, resistência dos mosquitos aos inseticidas, leva à necessidade de alternativas de controle. Uma dessas alternativas poderia ser a modificação genética de vetores, tornando-os incapazes de transmitir a doença.

Alguns laboratórios, utilizando-se dos avanços em biologia molecular partiram para o desenvolvimento de genes que poderiam ser utilizados para a transformação de mosquitos, porém, desde que esta técnica se tornou viável, nenhum dos mosquitos transformados mostrou-se capaz de bloquear a transmissão dos patógenos.

Desta maneira, estudos mais aprofundados sobre a biologia de vetores e sua interação com patógenos são de grande importância para o direcionamento na construção de transgenes que possam conferir uma característica de refratoriedade.

Existe uma grande controvérsia sobre a relação das diferentes regiões da CSP em relação ao reconhecimento de receptores na glândula salivar. Resumidamente, no trabalho feito com peptídeos sintéticos contendo a região I mostrou que estes competem com o parasita por receptores na glândula impedindo a sua penetração. No entanto, em outro trabalho foi mostrado que parasitas mutantes sem a região II

foram incapazes de penetrar na glândula, e parasitas mutantes sem a região I, conseguiram.

Na tentativa de esclarecer qual é a região que estaria envolvida nesta importante fase do ciclo dos plasmódios, no presente trabalho houve a tentativa expressar peptídeos contendo a região I ou a região II na hemolinfa do mosquito, para verificar competição entre estes e o parasita.

Para isso, duas abordagens foram utilizadas - a expressão transiente utilizando o vírus dsSindbis e a transformação estável de mosquitos. Foram escolhidas duas abordagens, pois apesar da técnica utilizando o vírus ser menos laboriosa, existe uma diferença entre os resultados que são obtidos entre elas.

Este fato foi observado quando o anticorpo anti CSP denominado N2ScFv foi expresso utilizando dsSindbis e obteve-se 96-99% de bloqueio na penetração de esporozoítas na glândula (DE LARA CAPURRO et al., 2000), enquanto que o mesmo anticorpo, quando expresso sob o comando do promotor de vitelogenina em mosquitos transformados, obteve um bloqueio menor em torno de 62-96% (JASINSKIENE et al., 2007).

Neste projeto, foram feitas as clonagens de cinco moléculas no vetor dsSindbis. Duas contendo a região I e três contendo a região II tanto de *Plasmodium gallinaceum* quanto de *Plasmodium falciparum*. Devido à proximidade filogenética (MCCUTCHAN et al., 1996), estas espécies foram escolhidas pois poderiam ser visualizadas além da reação direta (CSP de *Plasmodium gallinaceum* na infecção pelo mesmo), uma reação cruzada entre os peptídeos de *Plasmodium falciparum* na infecção por *Plasmodium gallinaceum*.

Utilizando a abordagem de expressão transiente com o vírus dsSindbis, ao analisar a expressão do mRNA para os diferentes peptídeos, através da técnica de RT-PCR, em mosquitos injetados com as partículas virais recombinantes, pudemos observar uma diferença no tamanho das bandas do cDNA proveniente dos mosquitos injetados com as construções dsSindbis-GARI e dsSindbis-FARI, não esperada para o par de oligonucleotídeos utilizados.

Na amostra de dsSindbis-GARI, visualizou-se uma banda bem forte em torno de 200 pb e uma bem fraca em torno de 400 pb cujo tamanho era esperado. Já para a amostra dsSindbis-FARI visualizou-se uma banda um pouco abaixo do esperado (~370 pb).

Essa diferença nos tamanhos das bandas, pode ter ocorrido devido à instabilidade desses vírus. Já foi visto que passagens por cultura de célula podem selecionar vírus que deletaram o transgene (ATKINSON et al., 2001).

Não se detectou presença de proteínas exógenas quando os mosquitos injetados com as partículas virais foram acessados. Inúmeras tentativas em relação aos experimentos de "Western Blot" foram feitas, mas sem algum sucesso. Isto nos leva à conclusão de que, se caso estivessem sendo produzidas, estariam sendo em níveis tão baixos, levando a impossibilidade da sua detecção por esse método.

Essa ausência das proteínas, refletiu-se nos experimentos de comparação entre os mosquitos injetados com as partículas virais recombinantes e com os controles (mosquitos injetados com dsSindbis GFP). Não houve diferença entre os grupos, ou seja, o número de esporozoítas encontrados nas glândulas salivares era o mesmo para ambos os grupos.

A não tradução das proteínas recombinantes pode ter ocorrido pela diferença entre a utilização dos códons preferenciais de plasmódios e de *Aedes aegypti*. Sabe-se que a utilização de códons preferenciais de determinados organismos impulsiona a expressão de proteínas heterólogas (LITHWICK et al., 2003), como visto em mosquitos (JASINSKIENE et al., 2007) e outros organismos (WEALCH et al., 2009; QUARTLEY et al., 2009). Além disso, a disparidade espécie-específica entre a utilização de códons está relacionada à expressão de proteínas não funcionais, à prematura terminação da tradução ou à expressão de proteínas truncadas, que são levadas à proteólise (ADZHUBEI et al., 1996; KURLAND e GALLANT, 1996; LINDSLEY; GALLANT; GUARNEROS, 2003), devido à abundância do tRNA isoacceptor influencia a velocidade da tradução levando a esses possíveis erros (KOMAR; LESNIK; REISS, 1999).

No entanto, existem outros fatores que podem influenciar a expressão de proteínas heterólogas, como observado em *Escherichia coli* um fenômeno conhecido com contexto de códons, o qual o códon preferencialmente utilizado pode ser outro, dependendo de códons adjacentes e que essa preferência é diferente em proteínas muito ou pouco expressas (GUTMAN e HATFIELD, 1989; BOYCHEVA et al., 2003). Podemos citar ainda, estruturas secundárias do mRNA, que inibem a tradução (DE SMIT et al., 1990), seqüências repetidas não comuns e seqüências regulatórias

crípticas como sítios de splicing e sítios de clivagem pela RNase (RAYMOND et al., 2009).

Atualmente existem ferramentas para auxiliar a construção de um gene e torná-lo eficiente. Essas ferramentas incluem softwares para a escolha de códons preferenciais (SANDHUET et al., 2008; LORIMER et al., 2009), identificação e remoção de seqüências deletérias, adição de seqüências sinais de localização subcelular e o uso de elementos para reduzir efeitos de posição. Existem ainda empresas que sintetizam os genes com os códons otimizados viabilizando a construção de genes extensos.

Foram escolhidos para as clonagens no vetor de transgênese *piggyBac*[3XP3-eGFP], dois peptídeos recombinantes contendo a região I de *Plasmodium gallinaceum* e *Plasmodium falciparum*, pois acreditamos que para o objetivo proposto, essa região era a mais promissora devido ao trabalho de Myung, et al. (2004) no qual a injeção intratorácica em mosquitos *Anopheles*, com peptídeos contendo a região I, apresentou resultados significativos no bloqueio da entrada de esporozoítas na glândula salivar.

Neste projeto reportamos pela primeira vez no Brasil a transformação de *Aedes aegypti*. Foram obtidas 4 linhagens transgênicas - uma referente à construção de região I da CSP de *Plasmodium falciparum* (*piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI]) e três referentes à construção de região I da CSP de *Plasmodium gallinaceum* (*piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI]).

Ao caracterizar as linhagens obtidas em relação à inserção do transgene no genoma das linhagens, pudemos observar a presença de uma única cópia na linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] através da técnica de "Southern Blot". Para as linhagens *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1, P#4 e F#8 a presença do transgene foi verificada através da técnica de PCR a partir de DNA genômico. Ao analisarmos o material proveniente dessas linhagens, pudemos observar a presença de bandas em todas elas, indicando a presença do transgene, no entanto, para a linhagem F#8 observou-se uma banda de aproximadamente 1000 pb de fraca intensidade, quando o esperado era uma banda de 200 pb como encontrado nas linhagens P#1, P#4, indicando que ocorreu uma grande inserção (~800 pb) dentro deste fragmento amplificado. Esse fragmento inserido pode ser proveniente do plasmídeo auxiliador (o qual contém a transposase), como observado por Adelman et al. (2004) em

linhagens transgênicas de *Aedes aegypti* transformados por *piggyBac*. Neste trabalho foi mostrado que através de experimentos de recuperação de plasmídeos, 30% deles eram originários do plasmídeo auxiliador.

Para expressar os peptídeos recombinantes na hemolinfa de mosquitos *Aedes aegypti* foi escolhido o promotor de vitelogenina. Estudos de mosquitos transgênicos com o mesmo promotor mostraram que este é capaz de dirigir fortemente a expressão de mRNA e proteínas heterólogas no corpo gorduroso com acúmulo na hemolinfa, logo após a alimentação sanguínea (KOKOZA et al., 2000; JASINSKIENE et al., 2007).

Os resultados obtidos pela técnica de RT-PCR para a linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3, mostram resultados similares em relação à expressão do mRNA, com forte expressão em 24 horas após alimentação sanguínea, diminuindo em 48 e 72 horas, mostrando que o promotor está funcional e o mRNA é estável, e segue o padrão de expressão da proteína endógena (KOKOZA et al., 2001a; RAIKHEL e DHADIALLA, 1992). Esses resultados não puderam ser observados nas linhagens transgênicas P#1, P#4 e F#8 provenientes da construção *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI], nas quais não houve amplificação detectável proveniente de cDNA, com exceção da linhagem P#1, em que uma banda muito fraca em 24 horas após alimentação sanguínea pode ser observada. Esses resultados indicam que o mRNA não foi produzido, ou, caso tenha sido produzido, foi rapidamente degradado.

Para o início da transcrição, fatores de transcrição precisam reconhecer seqüências dentro da região promotora, se ligarem a ela, para então a RNA polimerase reconhecer esses complexos multiméricos (HAGER et al., 2009). Mutações deletérias dentro dessas seqüências de reconhecimento podem levar à diminuição da eficiência do promotor, acarretando o impedimento da ancoragem dos fatores de transcrição e assim inibindo a transcrição. Além disso, a conformação do DNA dentro da região promotora, também pode contribuir para alterar este processo (MCCLURE et al., 1985).

No caso das linhagens *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1, P#4 e F#8, podemos sugerir que os fatores supracitados podem ter causado a ausência de mRNA. Caso tenha ocorrido a degradação do mRNA, as possíveis causas podem estar relacionadas às falhas nas estruturas da porção 5' e 3' como o CAP e a cauda poli

(A), que impedem o ataque das exonucleases ou seqüências ricas em AU geralmente localizadas na porção 3'UTR reconhecidas por proteínas que influenciam a estabilidade do mRNA (ROSS et al, 1996). Esta última é menos provável, pois em todas as construções feitas neste trabalho para geração dos mosquitos transgênicos utilizou-se a seqüência 3'UTR do vírus SV40, que em trabalhos anteriores já provou sua eficiência em manter a integridade do mRNA exógeno (JASINSKIENE et al., 2007; FRANZ et al., 2006).

Outro fator a ser citado é o efeito posicional da inserção do transgene, porém essa possibilidade foi descartada, pois pudemos detectar a expressão do GFP nos olhos de todas as linhagens analisadas, indicando que o gene marcador estava sendo transcrito e traduzido de forma esperada (HORN e WIMMER, 2000). O problema ocorreu provavelmente em relação à própria seqüência do transgene construído.

A linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-GARI] P#1, que apresentou uma fraca expressão do transgene em 24 horas após alimentação sanguínea e a linhagem *piggyBac*[3Xp3-eGFP-FARI] P#3, que apresentou um perfil de expressão do transgene similar ao gene endógeno da vitelogenina, foram acessadas quanto à presença da proteína através da técnica de "western blot" (resultados não apresentados) e LC-MS/MS, no entanto, após exaustivas tentativas, não foi possível detectar as proteínas. As possíveis causas para a ausência de proteínas foram discutidas em parágrafos acima.

Similarmente aos experimentos de injeção com as partículas virais recombinantes, a ausência das proteínas refletiu-se nos experimentos de comparação entre os mosquitos transgênicos e os controles (mosquitos selvagens). Não houve diferença entre os grupos, ou seja, o número de esporozoítas encontrados nas glândulas salivares era o mesmo.

Este estudo demonstra a importância do "gene design" mostrando que um estudo aprofundado sobre cada região regulatória é de suma importância para a expressão de proteínas exógenas, pois a menor alteração em alguma delas pode acarretar no bloqueio do transgene. Além disso, novas ferramentas estão disponíveis, as quais utilizam as novas descobertas da biotecnologia e biologia molecular no aperfeiçoamento da engenharia de genes.

CONCLUSÃO



6 CONCLUSÃO

A união dos resultados obtidos nas análises da expressão de peptídeos recombinantes tanto através da utilização de um sistema transiente, o vírus Sindbis, quanto a transformação estável de mosquitos nos leva a conclusão de que um entendimento mais aprofundado sobre a dinâmica da expressão de proteínas exógenas se faz necessário, para viabilizar a utilização de ambas as técnicas no estudo de moléculas efetoras.

Os resultados nos encoraja também a prosseguir com estudos utilizando a transformação estável de *Aedes aegypti*, pois esta técnica foi padronizada pela primeira vez no Brasil neste trabalho e se mostrou altamente eficaz em produzir linhagens transgênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. G.; DONNELLY-DOMAN, M.; FUJIOKA, H.; GHOSH, A.; MOREIRA, L.; JACOBS-LORENA, M. Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgAper1 regulatory elements. **Insect Mol. Biol.**, v. 14, n.3, p. 271-9, 2005.

ADAMS, J. H.; BLAIR, P. L.; KANEKO, O.; PETERSON, D. S. An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. **Trends Parasitol.**, v. 17, p. 297-299, 2001.

ADELMAN, Z. N.; JASINSKIENE, N.; VALLY, K. J. M.; PEEK, C.; TRAVANTY, E. A.; OLSON, K, E.; BROWN, S. E.; STEPHENS, J. L.; KNUDSON, D. L.; COATE, C. J.; JAMES, A. A. Formation and loss of large, unstable tandem arrays of the piggyBAC transposable element in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Transgenic Res.**, v. 13, n. 5, p. 411-425, 2004.

ADZHUBEI, A. A.; ADZHUBEI, I. A.; KRASHENINNIKOV, I. A.; NEIDLE, S. Non-random usage of 'degenerate' codons is related to protein three-dimensional structure. **FEBS Lett.**, v. 399, p. 78-82, 1996.

ALY, A. S.; VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 63, p. 195-221, 2009.

ATKINSON, P. W.; PINKERTON, A. C.; O'BROCHTA, D. A. Genetic transformation systems in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 46, p. 317-46, 2001.

BARREAU, C.; TOURAY, M.; PIMENTA, P. F.; MILLER, L. H.; VERNICK, K. D. *Plasmodium gallinaceum*: sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands is inhibited by anti-gland antibodies and by lectins. **Exp. Parasitol.**, v. 81, p. 332-43, 1995.

BERGHAMMER, A. J.; KLINGLER, M.; WIMMER, E. A. A universal marker for transgenic insects. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. 370-1, 1999.

BOYCHEVA, S.; CHKODROV, G.; IVANOV, I. Códon pairs in the genome of *Escherichia coli*. **Bioinformatics**, v. 19, p. 987-998, 2003.

BRENNAN, J. D. G.; KENT, M.; DHAR, R.; FUJIOKA, H.; KUMAR, N. *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 25, p. 13859-13864, 2000.

CATTERUCCIA, F.; NOLAN, T.; LOUKERIS, T. G.; BLASS, C.; SAVAKIS, C.; KAFATOS, F. C.; CRISANTI, A. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 959-62, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Malaria Biology. Disponível em <<http://www.cdc.gov/malaria/biology/index.htm>>. Acesso em: 2 Out. 2009.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, v. 263, n. 5148, p. 802-5, 1994.

CHEN, X. G.; MARINOTTI, O.; WHITMAN, L.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A.; ROMANS, P. The *Anopheles gambiae* vitellogenin gene (VGT2) promoter directs persistent accumulation of a reporter gene product in transgenic *Anopheles stephensi* following multiple bloodmeals. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 76, n. 6, p. 1118-24, 2007.

COATES, C. L.; JASINSKIENE, N.; MIYASHIRO, L.; JAMES, A. A. Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 7, p. 3748-51, 1998.

COATES, C. L.; JASINSKIENE, N.; POTT, G. B.; JAMES, A. A. Promoter-directed expression of recombinant fire-fly luciferase in the salivary glands of Hermes-transformed *Aedes aegypti*. **Gene**, v. 226, n. 2, p. 317-25, 1999.

COATES, C. L.; TRUNEY, C. L.; FROMMER, M.; O'BROCHTA, D. A.; WARREN, W. D.; ATKINSON, P. W. The transposable element mariner can excise in non-drosophilid insects. **Mol. Gen. Genet.**, v. 249, p. 246-252, 1995.

COHEN, J.; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R.; VEKEMANS, J.; LEACH, A. From the circumsporozoite protein to the RTS,S/AS candidate vaccine. **Hum. Vaccin.**, v. 6, n.1, 2009. Epub ahead of print.

CRAMPTON, J. M.; COMLEY, I.; EGGLESTON, P.; HILL, S.; HUGHES, M.; KNAPP, T.; LYCETT, G.; URWIN, R.; WARREN, A. Molecular biological approaches to the study of vectors in relation to malaria control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 43-9, 1992.

CURTIS, C. F.; GRAVES, P. M. Methods for replacement of malaria vector populations. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 2, n. 91, p. 43-8, 1988.

DE LARA CAPURRO, M.; COLEMAN, J.; OLSON, K.; BEERNTSEN, B.T.; ROCHA, E.; KRETTLI, A.U.; JAMES, A.A. Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary gland in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, n. 4, p. 427-433, 2000.

DE SMIT, M. H.; VAN DUIN, J. Control of prokaryotic translational initiation by mRNA secondary structure. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 38, I-35, 1990.

DINGLASAN, R. R.; KALUME, D. E.; KANZOK, S. M.; GOSH, A. K.; MURATOVA, O.; PANDEY, A.; JACOBS-LORENA, M. Disruption of *Plasmodium falciparum* development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 33, p. 13461-6, 2007.

ECKER, A.; BUSHELL, E. S.; TEWARI, R.; SINDEN R. E. Reverse genetics identifies six proteins important for malaria development in the mosquito. **Mol. Microbiol.**, v. 70, n. 1, p. 209-20, 2008.

ENAYATI, A.; HEMINGWAY, J. Malaria management: Past, Present and Future. **Annu. Rev. Entomol.** 2009. [Epub ahead of print].

FRANZ, A. W. E.; SANCHEZ-VARGAS, I.; ADELMAN, Z. N.; BLAIR, C. D.; BEATY, B. J.; JAMES, A. A.; OLSON, K. E. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n.11, p. 4198-4203, 2006.

GHOSH, A. K.; RIBOLLA, P. E. M.; JACOBS-LORENA, M. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 23, p. 13278-13281, 2001.

GOLENDIA, C. F.; STARKWETHER, W. H.; WIRTZ, R. H. The distribution of circumsporozoite protein (CS) in *Anopheles stephensi* mosquitoes with *Plasmodium falciparum* malaria. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 38, p. 475-481, 1990.

GOSH, A. K.; DEVENPORT, M.; JETHWANEY, D.; KALUME, D. E.; PANDEY, A.; ANDERSON, V. E.; SULTAN, A. A.; KUMAR, N.; JACOBS-LORENA, M. Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the *Plasmodium* TRAP and the *Anopheles* saglin proteins. **PloS Pathog.** v. 5, n. 1, e1000265, 2009.

GRATZ, N. G. Emerging and resurging vector-borne diseases. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 44, p. 51-75, 1999.

GROSSMAN, G. L.; RAFFERTY, C. S.; CLAYTON, J. R.; STEVENS, T. K.; MUKABAYIRE, O.; BENEDICT, M. Q. Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the *piggyBac* transposable element. **Insect Mol. Biol.**, v. 10, p. 597-604, 2001.

GUTMAN, G. A.; HATFIELD, G. W. Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 3699-3703, 1989.

GWADZ, R. W.; KASLOW, D.; LEE, J. Y.; MALOY, W. L.; ZASLOFF, M.; MILLER, L. H. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 2628-2633, 1989.

HAGER, G. L.; MCNALLY, J. G.; MISTELI, T. Transcription Dynamics. **Mol. Cell.**, v. 35, n. 6, p. 741-53, 2009.

HANDLER, A. M. A current perspective on insect gene transformation. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 31, n. 2, p. 111-28, 2001.

HANDLER, A. M.; HARREL, R. A. 2nd. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. **Insect Mol. Bio.**, v. 8, n. 4, p. 449-57, 1999.

HANDLER, A. M.; JAMES, A. A. Sindbis virus expression systems in mosquitoes: background, methods and applications. In: OLSON, K. E. **Insect transgenesis: methods and applications**. Boca Raton, CRC Press, London, New York, Washington, D.C., cap. 9, 2000.

HARLOW, E.; LANE, D. Using antibodies: A laboratory Manual. **Cold Spring Harbor**, New York: Cold Spring Harbor Laboratories, 1999.

HIERHOLZER, J. C.; KILLINGTON, R. A. Virus isolation and quantitation. In: HIERHOLZER, J. C. **Virology Methods Manual**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 25-46.

HORN, C.; WIMER, E. A. A versatile vector set for animal transgenesis. **Dev. Genes Evol.**, v. 210, p. 630-637, 2000.

HURD, H. Interactions between parasites and insect vectors. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 27-30, 1994.

ITO, J.; GOSH, A.; MOREIRA, L. A.; WIMMER, E. A.; JACOBS-LORENA, M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 452-5, 2002.

JAMES, A. A.; BLACKMER, K.; RACIOPPI, J. V. A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Gene**, v. 75, n. 1, p. 73-83, 1989.
JAMES, A. A. Present and future control of malaria. **Science**, v. 291, n. 5503, p. 435-6, 1989.

JASINSKIENE, N.; COATES, C. J.; BENEDICT, M. Q.; CORNEL, A. J.; RAFFERTY, C. S.; JAMES, A. A.; COLLINS, F. H. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 7, p. 3743-7, 1998.

JASINSKIENE, N.; COLEMAN, J.; ASHIKYAN, A.; SALAMPESSI, M.; MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. Genetic control of malaria parasite transmission: Threshold levels for infection in an avian model system. **Am. J. Med. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 6, p. 1072-1078, 2007.

KAPPE, S. H. I.; BUSCAGLIA, C. A.; NUSSENZWEIG, V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 20, p. 29-59, 2004.

KAPPE, S. H.; KAISER, K.; MATUSCHEWSKI, K. The Plasmodium sporozoite journey: a rite of passage. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 3, p. 135-43, 2003.

KAPPE, S.; BRUDERER, T.; GANTT, S.; FUJIOKA, H.; NUSSENZWEIG, V.; MENARD, R. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. **J. Cell. Biol.**, v. 147, n. 5, p. 937-44, 1999.

KAPPE, S.; NOE, A. R.; FRASER, T. S.; BLAIR, P. L.; ADAMS, J. H. A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 1230-1235, 1998.

KARIU, T.; YUDA, M.; YANO, K.; CHINZEI, Y. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 10, p. 1317-1323, 2002.

KIM, W.; KOO, H.; RICHMAN, A. M.; SEELEY, D.; VIZIOLI, J.; KLOCKO, A. D.; O'BROCHTA, D. A. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. **J. Med. Entomol.**, v. 41, p. 447-455, 2004.

KIZSEWSKI, A.; MELLINGER, A.; SPIELMAN, A.; MALANEY, P.; SACHS, S. E.; SACHS, J. A global index representing the stability of malaria transmission. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, n. 5, p. 486-498, 2004.

KOKOZA, V. A.; MARTÍN, D.; MIENALTWSKI, M.; AHMED, A.; MORTON, C.; RAIKEL, A.S.; Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. **Gene**, v. 274, p. 47-65, 2001a.

KOKOZA, V.; AHMED, A.; CHO, W. L.; JASINSKIENE, N.; JAMES A. A.; RAIKEL, A. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 9144-9149, 2000.

KOKOZA, V.; AHMED, A.; WIMMER, E. A.; RAIKHEL, A. S. Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyBac* transposable element vector ρ Bac[3xP3-EGFP afm]. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 31, n. 12, p. 1137-43, 2001b.

KOMAR, A. A.; LESNIK, T.; REISS, C. Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. **FEBS Lett.**, v. 462, n. 3, p. 387-91, 1999.

KRETTLI, A. U.; ROCHA, E. M.; LOPES, J. D.; CARNEIRO, C. R.; KAMBOJ, K. K.; COCHRANE, A. H.; NUSSENZWEIG, R. S. Circumsporozoite protein of *Plasmodium gallinaceum* characterized by monoclonal antibodies. **Parasite Immunol.**, v. 10, n. 5, p. 523-33, 1988.

KURLAND, C.; GALLANT, J. Errors of heterologous protein expression. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.7, p. 489-493, 1996.

LINDSLEY, D.; GALLANT, J.; GUARNEROS, G. Ribosome bypassing elicited by tRNA depletion. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1267-1274, 2003.

LITHWICK, G.; MARGALIT, H. Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. **Genome Res.**, v. 13, p. 2665-2673, 2003.

LOMBARDO, F.; LYCETT, G.; LANFRANCOTTI, A.; COLUZZI, M.; ARCÀ, B. Analysis of Apyrase 5' upstream region validates improved *Anopheles gambiae* transformation technique. **BMC. Res. Notes**, v. 2, p. 4, 2009.

LOMBARDO, F.; NOLAN, T.; LYCETT, G.; LANFRANCOTTI, A.; STICH, N.; CATTERUCCIA, F.; LOUIS, C.; COLUZZI, M.; ARCÀ, B. An *Anopheles gambiae* salivary gland promoter analysis in *Drosophila melanogaster* and *Anopheles Stephensi*. **Insect. Mol. Biol.**, v. 14, p. 2207-216, 2005.

LORIMER, D.; RAYMOND, A.; WALCHLI, J.; MIXON, M.; BARROW, A.; WALLACE, E.; GRICE, R.; BURGIN, A.; STEWART, L. Gene composer: database software for protein construct design, codon engineering, and gene synthesis. **BMC Biotechnol.**, v. 21, p. 9-36, 2009.

LOUKERIS, T. G.; LIVADRAS, I.; ARCA, B.; ZABALOU, S.; SAVAKIS, C. Gene transfer into the Medfly, *Ceratitis capitata*, using a *Drosophila hydei* transposable element. **Science**, v. 270, p. 2002-2005, 1995.

LYCETT, G. J.; KAFATOS, F. C.; LOUKERIS, T. G. Conditional expression in the malaria mosquito *Anopheles stephensi* with Tet-On and Tet-Off systems. **Genetics**, v. 167, n. 4, p. 1781-90, 2004.

MATUSCHEWSKI, K.; NUNES, A. C.; NUSSENZWEIG, V.; MENARD, R. *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. **EMBO. J.**, v. 21, n. 7, p. 1597-606, 2002.

MCCLINTOCK, B. Induction of instability at selected loci in maize. **Genetics**, v. 38, n. 6, p. 579-99, 1953.

MCCLURE, W. R. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 171-204, 1985.

MCCUTCHAN, T. F.; KISSINGER, J. C.; TOURAY, M. G.; ROGERS, M. J.; Li, J.; SULLIVAN, M.; BRAGA, E. M.; KRETTLI, A. U.; MILLER, L. H. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malaras: biological and phylogenetic implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 21, p. 11889-94, 1996.

MÈNARD, R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 6, p. 633-42, 2000.

MÈNARD, R.; SULTAN, A. A.; CORTES, C.; ALTSZULER, R.; VAN DIJK, M. R.; JANSE, C. J.; WATERS, A. P.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V. Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. **Nature**, v. 385, n. 6614 p. 336-40, 1997.

MILLER, L. H.; SAKAI, R. K.; ROMANS, P.; GWADZ, R. W.; KANTOFF, P.; COON, H. G. Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito, *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 237, p. 779-781, 1987.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Folder Malária, Sivep-Malária/SVS/MS. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/folder_malaria_2006_web.pdf> Acesso em: 31 mar. 2008.

MOREIRA, L. A.; EDWARDS, M. J.; ADHAMI, F.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A.; JACOBS-LORENA, M. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 20, p. 10895-10898, 2000.

MOREIRA, L. A.; ITO, J.; GHOSH, A.; DEVENPORT, M.; ZIELER, H.; EAPPEN, G. A.; CRISANTI, A.; NOLAN, T.; CATTERUCCIA, F.; JACOBS-LORENA, M. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 40839-43, 2002.

MYUNG, M. J.; MARSHALL, P.; SINNIS, P. The *Plasmodium* circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 133, p. 53-59, 2004.

NIEDENTHAL, R. K.; RILES, L.; JOHNSTON, M.; HEGEMANN, J. H. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. **Yeast**, v. 12, p. 773-786, 1996.

NIRMALA, X.; MARINOTTI, O.; SANDOVAL, J. M.; PHIN, S.; GAKHAR, S.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A. Functional characterization of the promoter of the vitellogenin gene, *AsVG1*, of the malaria vector, *Anopheles stephensi*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, n. 9, p. 694-700, 2006.

NOLAN, T.; BOWER, M.; BROWN, A. E.; CRISANTI, A.; CATTERUCCIA, F. *piggyBac* mediated germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi* using the red fluorescent protein dsRED as a selectable marker. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 8759-8762, 2002.

NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S. Development of a sporozoite malaria vaccine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, n. 4, p. 678-88, 1986.

NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. **Cell**, v. 42, p. 401-403, 1985.

OLSON, K. E.; CARLSON, J. O.; BEATY, B. J. Expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene in *Aedes albopictus* (C6/36) cells using a non-infectious Sindbis virus expression vector. **Insect Mol. Biol.**, v. 1, p. 49-52, 1992.

OLSON, K. E.; POWERS, A. M.; HIGGS, S. Alphavirus expression systems: Applications to mosquito vector studies. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 12, p. 444-52, 1993.

OSAKI, L. S.; SVEC, P.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; GODSON, G. N.; Structure of the *Plasmodium knowlesi* gene coding for the CSP. **Cell**, v. 34, p. 815-822, 1983.

PERERA, O. P.; HARRELL, R. A.; HANDLER, A. M. Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a *piggyBac*/EGFP transposon vector is routine and highly efficient. **Insect Mol. Biol.**, v. 11, p. 291-297, 2002.

PIERRO, D. J.; MYLES, K. M.; FOY, B. D.; BEATY, B. J.; OLSON, K. E. Development of an orally infectious Sindbis virus transducing system that efficiently disseminates and expresses green fluorescent protein in *Aedes aegypti*. **Insect. Mol. Biol.**, v. 12, p. 107-116, 2003.

PIMENTA, P. F.; TOURAY, M.; MILLER, L. The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. **J. Euk. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 608-624, 1994.

PINES, J. GFP in mammalian cells. **Trends Genet.**, v. 11, p. 326-327, 1995.

QUARTLEY, E.; ALEXANDROV, A.; MIKUCKI, M.; BUCKNER, F. S.; HOL, W. G.; DETITTA, G. T.; PHIZICKY, E. M.; GRAYHACK, E. J. Heterologous expression of L. major proteins in *S. cerevisiae*: a test of solubility, purity and gene recoding. **J. Struct. Funct. Genomics**, v. 10, n. 3, p.233-47, 2009.

PRASHER, D. C.; ECKENRODE, V. K.; WARD, W. W.; PRENDERGAST, F. G.; CORMIER, M. J. Primary structure of the *Aquorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, v. 111, n. 2, p. 229-33, 1992.

RAYMOND, A.; LOVELL, S.; LORIMER, D.; WALCHLI, J.; MIXON, M.; WALLACE, E.; THOMPSON, K.; ARCHER, K.; BURGIN, A.; STEWART, L. Combined protein construct and synthetic gene engineering for heterologous protein expression and crystallization using Gene Composer. **BMC Biotechnol.**, v. 9, p. 37, 2009.

RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 217-51, 1992.

REITER, P. Climate change and mosquito-borne disease. **Environ. Health Perspect.**, p. 141-61, 2001. Suppl. 1.

REY.L. **Parasitologia**: Protozoários parasitos do homem. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 165.

ROBSON, K. J.; DOLO, A.; HACKFORD, I. R.; DOUMBO, O.; RICHARDS, M. B.; KEITA, M. M.; SIDIBE, T.; BOSMAN, A.; MODIANO, D.; CRISANTI, A. Natural polymorphism in the thrombospondin-related adhesive protein of *Plasmodium falciparum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 1, p. 81-9, 1998.

RODRIGUES, F. G.; OLIVEIRA, S. B.; ROCHA, B. C.; MOREIRA, L. A. Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Diptera: culicidae) with the *piggyBac* transposable element. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 755-757, 2006.

ROGERS, W. O.; MALIK, A.; MELLOUK, S.; NAKAMURA, K.; ROGERS, M. D.; SZARFMAN, A.; GORDON, D. M.; NUSSLER, A. K.; AIKAWA, M.; HOFFMAN, S. L. Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, n. 19, p. 9176-80, 1992.

ROSENBERG, R. Inability of *Plasmodium knowlesi* sporozoites to invade *Anopheles freeborni* salivary gland. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, n. 4, p.687-691, 1985.

ROSENBERG, R.; RUNGSIWONGSE, J. The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 45, p.574-577, 1991.

ROSS, J. Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. **Trends Genet.**, v. 12, n. 5, p. 171-5, 1996.

RUBIN, G. M.; SPRADLING, A. C. Genetic transformation of drosophila with transposable element vectors. **Science**, v. 218, p. 348-53, 1982.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SANCHEZ-VARGAS, I.; TRAVANTY, E. A.; KEENE, K. M.; FRANZ, A. W. E.; BEATY, B. J.; BLAIR, C. D.; OLSON, K. E. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. **Virus Res.**, v. 102, p. 65-74, 2004.

SANDHUET, K. S.; PANDEY. S.; MAITI, S.; PILLAI, B. GASCO: genetic algorithm simulation for codon optimization. **Silico Biol.**, v. 8, n. 2, p. 187-92, 2008.

SEVERSON, D. W.; BROWN, S. E.; KNUDSON, D. L. Genetic and physical mapping in mosquitoes: molecular aproches. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 46, p. 183-219, 2001.

SHAHABUDDIN, M.; FIELDS, I.; BULLET, P.; HOFFMANN, J. A.; MILLER, L. H. *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. **Exp. Parasitol.**, v. 89, p. 103-112, 1998.

SHARMA, S.; PATHAK, S. Malaria vaccine: a current perspective. **J. Vector Borne Dis.**, v. 45, n. 1, p. 1-20, 2008.

SIDJANSKI, S. P.; VANDERBERG, J. P.; SINNIS, P. *Anopheles stephensi* salivary glands bear receptor for region I of circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 90, n. 1, p. 33-41, 1997.

SINDEN, R. E. A cell biologist's view of host cell recognition and invasion by malarial parasites. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 5, p. 598-605, 1985.

SINNIS, P.; NARDIN, E. Sporozoite antigens: biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin-related anonymous protein. **Chem. Immunol.**, v. 80, p. 70-96, 2002.

STERLING, C. R.; AIKAWA, M.; VANDERBERG, J. P. The passage of *Plasmodium berghei* sporozoites through the salivary glands of *Anopheles stephensi*: an electron microscope study. **J. Parasitol.**, v. 59, p. 593-605, 1973.

SULTAN, A. A.; THATHY, V.; FREVERT, U.; ROBSON, K. J.; CRISANTI, A.; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; MENARD, R. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 511-22, 1997.

SUTHERST, R. W. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 1, p. 136-73, 2004.

TEWARI, R.; SPACCAPELO, R.; BISTONI, F.; HOLDER, A. A.; CRISANTI, A. Function of region I and II adhesive motifs of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n.49, p. 47613-47618, 2002.

THATHY, V.; FUJIOKA, H.; GANTT, S.; NUSSENZWEIG, R.; NUSSENZWEIG, V.; MÈNARD, R. Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. **EMBO J.**, v. 21, n. 7, p. 1586-96, 2002.

TOURAY, M. G.; WARBURG, A.; LAUGHINHOUSE, A.; KRETTLI, A. U.; MILLER, L. H. Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host. **J. Exp. Med.**, v. 175, p.1607-1612, 1992.

VAUGHAN, A. M.; ALY, A. S.; KAPPE, S. H. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. **Cell Host Microbe**, v. 4, n. 3, p. 209-18, 2008.

VERNICK, K. D.; BARREAU, C.; SEELEY, D. C. *Plasmodium*: A quantitative molecular assay for detection of sporogonic-stage malaria parasites. **Exp. Parasitol.**, v. 4, n. 81, p. 436-44, 1995.

ZAVALA, F.; COCHRANE, A. H.; NARDIN, E. H.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V. Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. **J. Exp. Med.**, v. 157, n. 6, p. 1947-57, 1983.

WANG, Q.; FUJIOKA, H.; NUSSENZWEIG, V. Exit of *Plasmodium* sporozoites from oocysts is an active process that involves the circumsporozoite protein. **PloS Pathog.**, v. 1, n. 1, e9, 2005.

WEALCH, M.; GOVINDARAJAN, S.; NESS, J. E.; VILLALOBOS, A.; GURNEY, A.; MINSHULL, J. GUSTAFSSON, C. Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. **Plos One**, v. 4, n. 9, e7002, 2009.

WENGELNIK, K.; SPACCAPELO, R.; NAITZA, S.; ROBSON, K. J.; JANSE, C. J.; BISTONI, F.; WALTERS, A. P.; CRISANTI, A. The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. **EMBO J.**, v. 18, n. 19, p. 5195-204, 1999.

WIKI EDUCATOR. **Malaria Treatment, Prevention and Control**, 2009. Disponível em: <www.wikieducator.org/Lesson_10:Malaria>. Acesso em: 2 out. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector control for Malaria and other mosquito borne diseases, 1995**. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_857.pdf>. Acesso em: 2 Out. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2008**. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/wmr2008>> Acesso em: 2 Out. 2009.

YEH, E.; GUSTAFSON, K.; BOULIANNE, G. L. Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 7036-7040, 1994.

YOSHIDA, N.; POTOČNJAK, P.; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; Biosynthesis of Pb44, the protective antigen of sporozoites of *Plasmodium berghei*. **J. Exp. Med.**, v.154, n. 4, p. 1225-36, 1981.

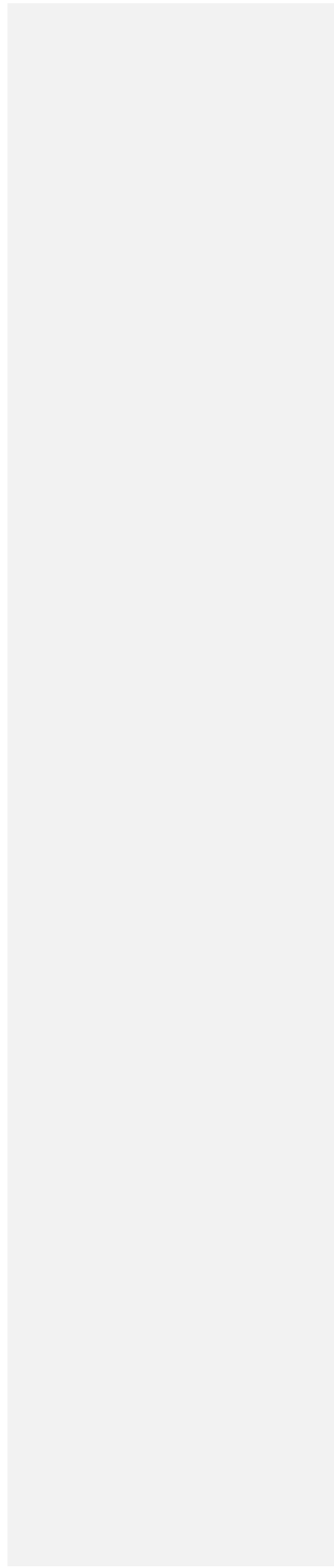
YOSHIDA, S.; MATSUOKA, H.; LUO, E.; IWAI, K.; ARAI, M.; SINDEN, R. E.; ISHII, A. A single-chain antibody fragment specific for the *Plasmodium berghei* ookinete protein Pbs21 confers transmission blockade in the mosquito midgut. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 104, p. 195–204, 1999.

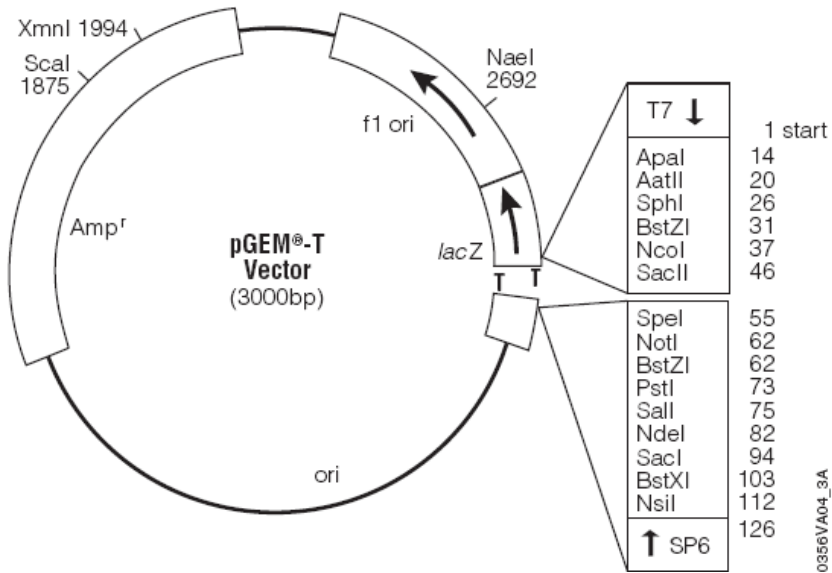
YOSHIDA, S.; SHIMADA, Y.; KONDDOH, D.; KOUZUMA, Y.; GOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M.; SINDEN, R. E. Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. **PloS Pathog.**, v. 3, n. 12, e192, 2007.

YOSHIDA, S.; WATANABE, H. Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, n. 4, p. 403-10, 2006.



ANEXOS

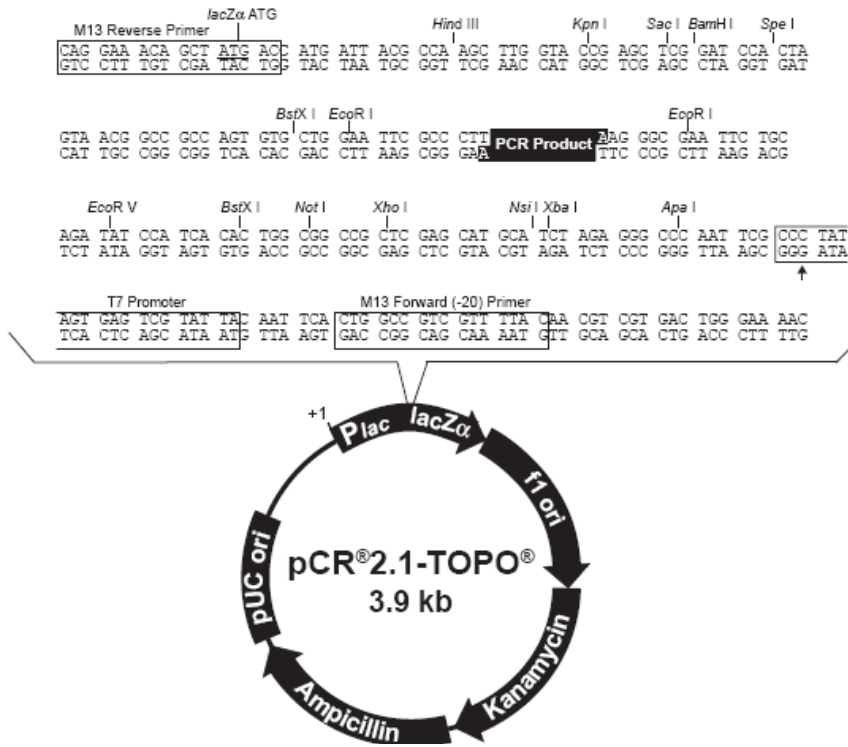




Anexo A - Mapa do vetor de clonagem pGEM[®]-T Vector e pontos de referência dentro da seqüência.

T7 e SP6 promotores; caixas de texto: região de múltipla clonagem; SP6 Promotor *lacZ*: porção codificadora da B-galactosidase, Amp^r: gene de resistência a ampicilina e T: local de inserção do DNA exógeno.

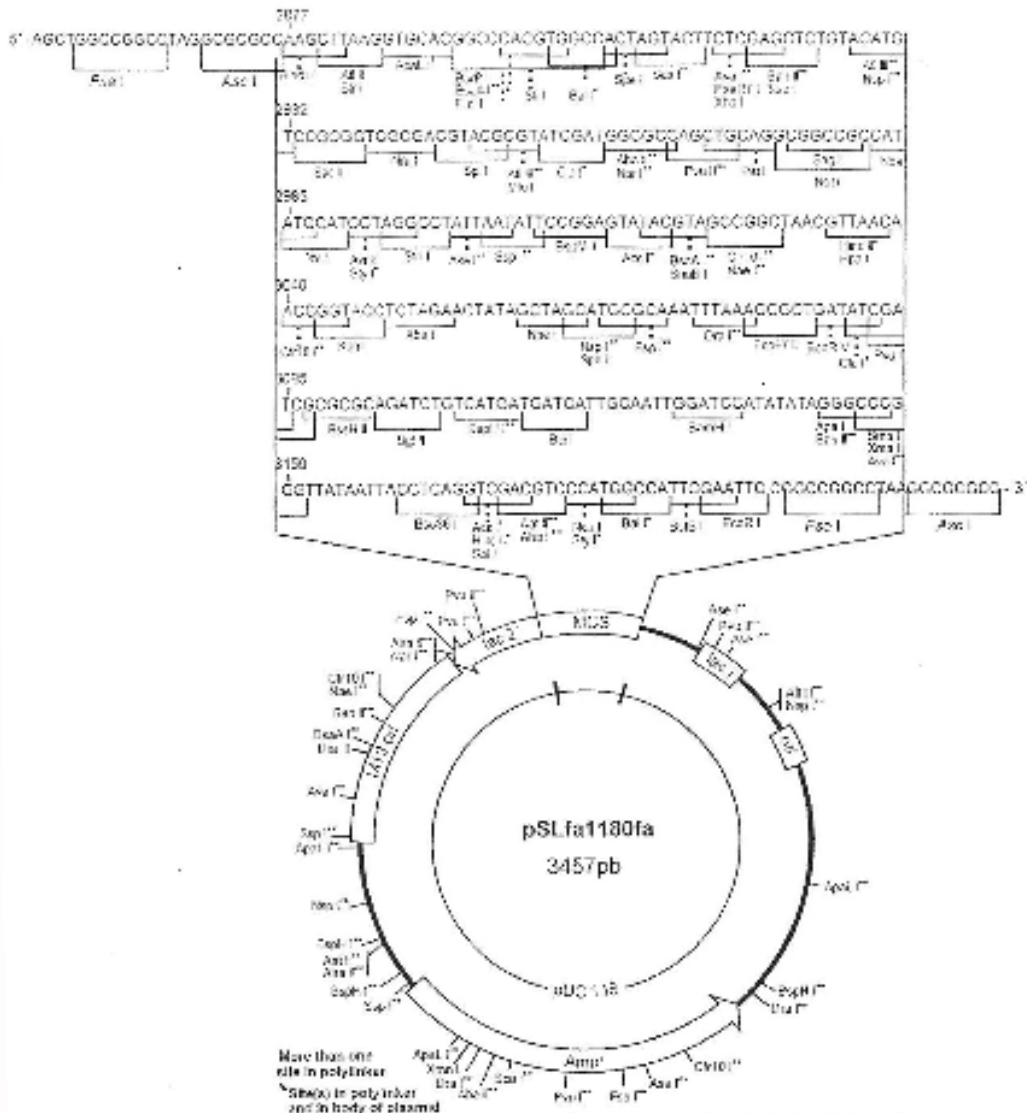
FONTE: Modificado de Technical Manual pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems.



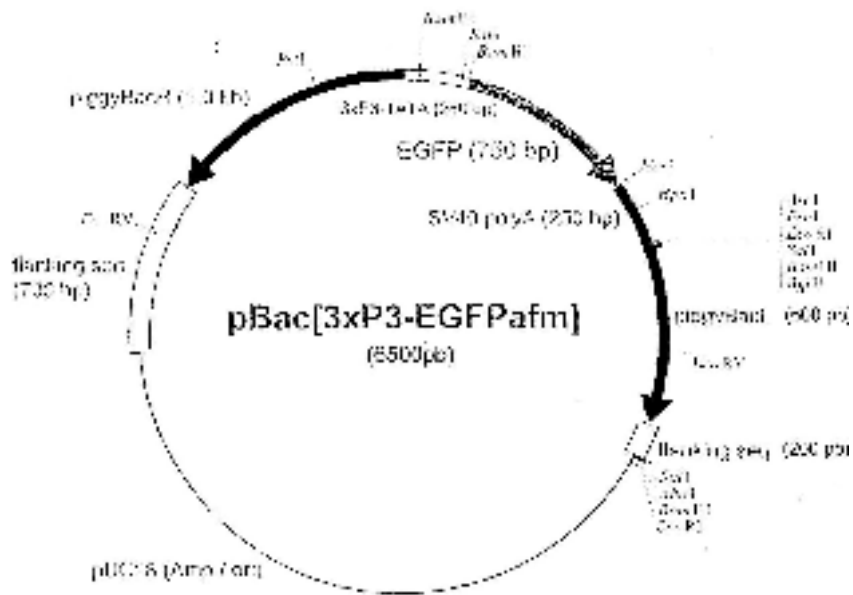
Anexo B - Mapa do vetor de clonagem TOPO® TA cloning Vector e pontos de referência dentro da seqüência.

lacZ: porção codificadora da B-galactosidase, "Ampicillin": gene de resistência a ampicilina Kanamycin: gene de resistência a canamicina; T7 promotores; "PCR product": local de inserção do DNA exógeno.

FONTE: Modificado de TOPO® TA Cloning User Manual.

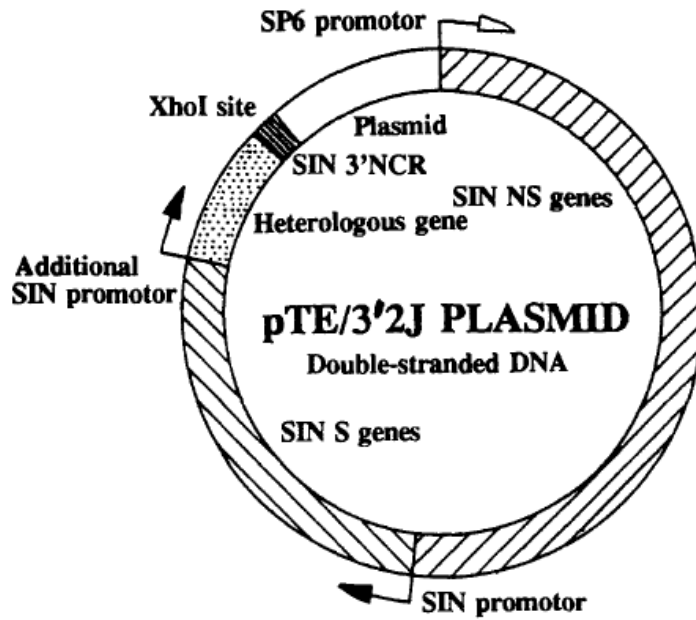


Anexo C - Representação esquemática do plasmídeo $pSLfa1180fa$.
 FONTE: Modificado de www.amershambiosciences.com.



Anexo D - Representação esquemática do vetor de transgênese doador *piggyBac*[3XP3-eGFP].

piggyBacR: braço direito do elemento de transposição *piggyBac*,
 3xP3: promotor de olhos, eGFP: gene que codifica a proteína
 fluorescente verde melhorada, SV40: 3'UTR do vírus SV40,
piggyBacL: braço esquerdo do elemento de transposição.



Anexo E - Organização genômica do plasmídeo de expressão transiente $pTE/Y2J$ do vírus recombinante dsSindbis mostrando as posições relativas das regiões codificadoras.

SIN NS genes: genes não estruturais; SIN S genes, genes estruturais; SIN3' NCR: regiões não traduzidas; heterologous gene: local da inserção de molécula exógena de DNA; *Xho* I: sítio de clivagem e as setas indicam as regiões promotoras.

FONTE: Modificado de Olson e Higgs (1993).