

Ceres Maciel de Miranda

**Expressão de Microplusina em *Aedes aegypti*:
Avaliação do efeito sobre *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 de Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

Ceres Maciel de Miranda

**Expressão de *Microplusina* em *Aedes aegypti*:
Avaliação do efeito sobre *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 de 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
2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Miranda, Ceres Maciel de.

Expressão de Microplusina em *Aedes aegypti*: avaliação do efeito sobre *Plasmodium gallinaceum* / Ceres Maciel de Miranda. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Mosquitos Geneticamente Modificados.

Versão do título para o inglês: Microplusin expression in *Aedes aegypti*: evaluation of effect on *Plasmodium gallinaceum*.

Descritores: 1. Mosquito transgênico 2. Microplusina 3. Molécula efetora 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/SBIB019/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ceres Maciel de Miranda.

Título da Tese: Expressão de Microplusina em *Aedes aegypti*: avaliação do efeito sobre *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**

Caixa Postal 13638 - Universidade de São Paulo -
av. Prof. Lineu Prestes, 247 - CEP, 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (51) 3091.7122 - Telefax: (51) 3091.7933
e-mail: icb@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° 133 nas fls. 77 da livr. 02, para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Profej Draª Margareth de Lenc Capurro Guimarães, Coordenadora da linha de pesquisa Abordagem Inovadora no Controle da transmissão de dengue do qual participaram os alunos Luiza Bentzer Lorenti, Valéria da Silva Fonseca, Carlos Muciel de Miranda, André Luis da Costa da Silva, Sorcia de Lima Oliveira, Kelly Nazaré da Silva Amorim, Diego Soares Azevedo, André Barreto Bruno Willot e pesquisador Mauro Toledo Marcelli, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotada pela sociedade Brasileira de Ciência do Animal de Laboratório (SBCAL) e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em 29.10.09, com validade de 3 anos.

São Paulo, 08 de outubro de 2009.

Prof. Dr. Wilson Teodoro de Lenc
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. Pandora Gram
Secretária
CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Ana M. Silva
Diret. de Patologia
Ino. ICB
aniluz@usp.br

“Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e apoio constante para a minha formação.”

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre guiando e iluminando meus passos.

À minha família, pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe e minha irmã por sonharem comigo. Mãe, tu és meu exemplo de dedicação e realização profissional. Obrigada por me apresentar o mundo das ciências e mostrar a beleza que nele reside. Mana, obrigada por ser quem és e estar sempre ao meu lado.

À Prof. Margareth de Lara Capurro Guimarães, não apenas pela orientação, incentivo, críticas e sugestões que foram muito importantes para minha formação científica.

Ao Prof. Carlos Eduardo Winter, pela ajuda na realização de alguns experimentos e por contribuir durante as discussões do trabalho com sugestões enriquecedoras.

À Prof. Tânia, minha “sogra científica”, por todo o apoio e carinho com que sempre me tratou.

Ao Prof. Gerhard, pela ajuda nos experimentos de Real Time, sempre me socorrendo quando tinha algum problema com o equipamento.

À Prof. Sirlei e Cláudia, por todas as discussões sobre os resultados das análises do LC-MS/MS. Cláudia, obrigada pela atenção e empenho na realização das análises.

A todos do laboratório do Prof. Carlos Eduardo Winter, principalmente a Maira, que me ajudou a quantificar minhas amostras com o Kit PicoGreen. Tua ajuda foi muito importante.

A todos do laboratório do Prof. Gerhard, em especial a Fernanda, sempre muito atenciosa para me ajudar com a análise dos experimentos de Real Time.

A todos do laboratório da Prof. Tânia (Alexandre, André, Larissa), companheiros de insetário. Obrigada pelo carinho de vocês.

Ao André, pelo apoio e compreensão em todos os momentos. Tudo o que eu escreva será pouco para descrever como foi importante ter você ao meu lado durante a realização deste trabalho. Meu amor, obrigada por tudo!

A todos os meus colegas de laboratório (Diego, Rafaela, Laisa, Soraia, Danilo, Andrezinho, Bianca), pelo ambiente de trabalho que me proporcionaram, ajuda e discussões científicas que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Às técnicas, Neuzinha, Ediane e Isabel, por cuidarem dos nossos insetários, do biotério de aves e do laboratório, além da amizade e do carinho com que sempre me trataram.

Aos amigos Ricardo, Fabiana, Bianca, Andrezinho, por estarem ao meu lado desde o início da pós-graduação. Agradeço todos os dias por encontrar pessoas especiais como vocês.

Ri, o responsável pelo início de tudo, obrigada pela amizade e pela confiança que sempre depositou em mim.

Fabi, mesmo em outro país acompanhou cada etapa deste trabalho, me incentivando sempre.

Bianca e Andrezinho (amigo-irmão), obrigada por serem os amigos que fazem a diferença na vida da gente! Acho que isto já diz tudo. E como dizem os três mosqueteiros: “um por todos e todos por um”!

A todos os professores, funcionário e colegas do Departamento de Parasitologia, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP e Capes pelo apoio financeiro.

"Pesquisar é ver o que outros viram, e
pensar o que nenhum outro pensou."
(Albert Szent-Gyorgyi)

Resumo

Maciel, C. **Expressão de Microplusina em *Aedes aegypti*: Avaliação do efeito sobre *Plasmodium gallinaceum*** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A transmissão de parasitas da malária por mosquitos vetores é dependente do desenvolvimento bem sucedido das formas infectantes de *Plasmodium* sp., especialmente os esporozoítas, que são as formas que infectam o hospedeiro vertebrado. A manipulação genética de mosquitos vetores tem sido uma estratégia alternativa na tentativa de controle da malária. Um componente extremamente importante desta estratégia é a escolha de uma molécula efetora capaz de reduzir a transmissão do patógeno. Microplusina é um peptídeo antimicrobiano rico em cisteína, originalmente descrito como um componente antimicrobiano da hemolinfa e dos ovos de carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Testes anteriores utilizando o modelo experimental mosquito *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* mostraram que a microplusina é altamente tóxico para esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum* em concentração relativamente baixa, sem apresentar toxicidade aos mosquitos vetores *Aedes aegypti*. Nosso objetivo foi analisar a expressão da microplusina e seu efeito na infecção de *P. gallinaceum* em mosquitos transgênicos. Obtivemos quatro linhagens através da integração de um transgene contendo a região promotora do gene da vitelogenina de *Ae. aegypti*, peptídeo sinal maltase-like I de *Ae. aegypti* e a sequência codificadora da microplusina (PMOS [3xP3-EGFP-AeVg Micro]). A atividade anti esporozoítas da microplusina expressa pelos mosquitos transgênicos mostrou diferença significativa as linhagens. O desenho de novas moléculas utilizando como molde moléculas efetoras existentes e testadas, possibilitará o aperfeiçoamento da expressão de genes exógenos em mosquitos transgênicos, tornando-os refratários ao parasita.

Palavras-chave: mosquito transgênico; microplusina; molécula efetora; *Aedes aegypti*; *Plasmodium gallinaceum*.

ABSTRACT

Maciel, C. **Microplusin expression in *Aedes aegypti*: evaluation of effect on *Plasmodium gallinaceum*** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Transmission of malaria parasites by mosquito vectors is dependent on the successful development of *Plasmodium* sp. infective forms, particularly the sporozoites, which are the forms that enter the vertebrate host. The genetic manipulation of mosquito vectors has been a strategy for malaria control. An extremely important component of this strategy is the effector molecule of choice which reduces parasite transmission. Microplusin is a cysteine-rich antimicrobial peptide originally described as an hemolymph and eggs antimicrobial component of the cattle tick *Boophilus microplus*. Previous tests using the experimental model *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti* showed that microplusin is highly toxic to *P. gallinaceum* sporozoites in relatively low concentration, without showing toxicity to the mosquito vector *A. aegypti*. Our goal was to analyze transgenic mosquitoes expressing microplusin and its effect on infection of *P. gallinaceum*. We obtained four lines through the integration of transgene that containing the promoter region of the *A. aegypti* vitelogenin gene, the *maltase-like I* signal peptide of *A. aegypti* and microplusin coding sequence (pMos[3xP3-EGFP-AeVg-Micro]). The activity anti sporozoites microplusin expressed by transgenic mosquitoes showed significant differences between strains. The design of effector molecules using information from existing and tested molecules as template will enable the improvement of the expression of foreign genes in transgenic mosquitoes, making them resistant to the parasite.

Keywords: transgenic mosquito; microplusin; effector molecule; *Aedes aegypti*; *Plasmodium gallinaceum*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro vertebrado humano..... | 24 |
| Figura 2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no mosquito vetor..... | 25 |
| Figura 3. Representação esquemática da estratégia de clonagem do peptídeo microplusina recombinante em vetores de clonagem..... | 64 |
| Figura 4. Esquema das ampliações pela PCR..... | 65 |
| Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados através da PCR..... | 66 |
| Figura 6. Esquema inserção do produto da PCR no vetor de clonagem pGEM..... | 66 |
| Figura 7. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA do vetor de clonagem pGEM..... | 67 |
| Figura 8. Sequência de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos do clone pGEM[Malt-Micro]..... | 67 |
| Figura 9. Esquema da clonagem no vetor pSLfa[AeVg-SV40]..... | 68 |
| Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA da construção pSLfa[AeVg-Malt-Micro]..... | 69 |
| Figura 11. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do clone pSLfa[AeVg-Malt-Micro]..... | 70 |
| Figura 12. Esquema da construção final pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]..... | 71 |
| Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA do transgene pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]..... | 72 |
| Figura 14. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do transgene pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]..... | 73 |
| Figura 15. Visualização da expressão do gene marcador (eGFP) na G1 de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> transgênicos pMOS [3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]..... | 75 |
| Figura 16. Esquema geral do transgene AeVg-Malt-Micro..... | 76 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de DNA genômico de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> transgênicos e selvagens..... | 76 |
| Figura 18. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR..... | 78 |
| Figura 19. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de cDNA sintetizados de mRNA de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> transgênicos..... | 78 |
| Figura 20. Análise quantitativa por PCR em tempo real de mRNA de microplusina na linhagem transgênica PF6 de <i>Aedes aegypti</i> | 79 |
| Figura 21. Análise quantitativa por PCR em tempo real de mRNA de microplusina na linhagem transgênica PM5 de <i>Aedes aegypti</i> | 80 |
| Figura 22. Análise quantitativa por PCR em tempo real de mRNA de microplusina na linhagem transgênica PM4 de <i>Aedes aegypti</i> | 81 |
| Figura 23. Análise quantitativa por PCR em tempo real de mRNA de microplusina na linhagem transgênica PM2 de <i>Aedes aegypti</i> | 82 |
| Figura 24. Perfil ESI-MS do peptídeo microplusina recombinante..... | 82 |
| Figura 25. Padrão de fragmentação do peptídeo microplusina recombinante..... | 83 |
| Figura 26. Detecção da microplusina recombinante em amostras de hemolinfa de <i>Aedes aegypti</i> selvagem..... | 83 |
| Figura 27. Detecção da microplusina recombinante em amostras de hemolinfa de <i>Aedes aegypti</i> transgênico..... | 84 |
| Figura 28. Esquema dos desenhos experimentais para o teste da ação do transgene sobre a infecção de <i>Plasmodium gallinaceum</i> em mosquitos transgênicos..... | 85 |
| Figura 29. Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de <i>P. gallinaceum</i> na glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> transgênico..... | 87 |
| Figura 30. Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de <i>P. gallinaceum</i> na glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> transgênico..... | 89 |
| Figura 31. Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de <i>P. gallinaceum</i> na glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> transgênico..... | 91 |
| Figura 32. Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de <i>P. gallinaceum</i> na glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> transgênico..... | 93 |
| Figura 33. Sobrevivência de <i>Aedes aegypti</i> transgênico e selvagem..... | 94 |

Figura 34. Comparação da fecundidade e fertilidade entre mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos e selvagens.....95

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Sequência do oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCRs..... | 46 |
| Tabela 2 - Sequência do oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento..... | 50 |
| Tabela 3 - Sequência do oligonucleotídeos iniciadores das PCRs utilizados no RT-PCR..... | 54 |
| Tabela 4 - Sequência do oligonucleotídeos iniciadores utilizados em PCR quantitativo em tempo real..... | 57 |
| Tabela 5 - Número de ovos embrionados microinjetados, número de adultos G0, número de larvas analisadas e larvas positivas para a expressão de eGFP e número de linhagens transgênicas obtidas com a construção pMOS[3Xp3-eGFP-Micro]..... | 75 |
| Tabela 6 - Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de <i>P. gallinaceum</i> na glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> transgênico linhagem PF6..... | 86 |
| Tabela 7 - Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de <i>P. gallinaceum</i> na glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> transgênico linhagem PM5..... | 88 |
| Tabela 8 - Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de <i>P. gallinaceum</i> na glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> transgênico linhagem PM4..... | 90 |
| Tabela 9 - Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de <i>P. gallinaceum</i> na glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> transgênico linhagem PM2..... | 92 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------------------------|---|
| µg | micrograma |
| µl | microlitro |
| µM | micromolar |
| 1^oC; 2^oC | Primeiro ciclo gonotrófico; Segundo ciclo gonotrófico |
| cDNA | DNA complementar |
| D.O. | densidade ótica |
| DEPC | dietilpirocarbonato |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| Dnase | desoxirribonuclease |
| dNTP | desoxirribonucleosídeo-trifosfato |
| DTT | ditiotreitól |
| EDTA | ácido etilenodiamino tetracético |
| eGFP | proteína verde melhorada |
| ESI-MS | ionização por spray de elétron acoplado a um espectômetro de massas |
| fg | fentograma |
| GFP | proteína verde fluorescente |
| hsp 70 | proteína de choque térmico 70 |
| IPTG | isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo |
| Kb | kilobase |
| Kg | quilograma |
| kV | quilovolt |
| LB | meio de cultura Luria-Bertani |
| LC-MS | Cromatografia líquida acoplada a espectômetro de massas |
| M | molar |
| m/z | massa/carga |
| ml | mililitro |
| mM | milimolar |
| mm | milímetro |
| MRFA | metilarginilfenilalanina |
| mRNA | RNA mensageiro |
| ng | nanogramma |

| | |
|----------------|---|
| nm | nanômetro |
| p/v | peso/volume |
| pb | pares de bases |
| PBS | salina tamponada com fosfato |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| R.S. | Repasto sanguíneo |
| RNA | ácido ribonucléico |
| RP-HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa |
| RT | transcriptase reversa |
| RT-PCR | transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase |
| spz | esporozoíta |
| SRM | <i>Selected reaction monitoring</i> |
| TBE | tampão tris-borato-EDTA |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| U | unidade de enzima |
| UTR | região não traduzida |
| X-gal | 5-bromo 4-cloro 3-indolil-beta-D-alactopiranosídeo |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1 Malária | 22 |
| 1.2 Agente etiológico e mosquitos vetores | 23 |
| 1.3 Controle e prevenção da malária | 26 |
| 1.4 Uso de organismos geneticamente modificados no controle de patógenos | 27 |
| 1.5 Microplusina | 36 |
| 2 OBJETIVO GERAL | 40 |
| 2.1 Objetivos específicos | 40 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 3.1 Animais | 42 |
| 3.1.1 <i>Aedes aegypti</i> | 42 |
| 3.1.2 <i>Camundongos</i> | 42 |
| 3.1.3 <i>Plasmodium gallinaceum</i> | 43 |
| 3.2 Plasmídeos e Reagentes | 43 |
| 3.3 Produção de células <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) competentes | 44 |
| 3.3.1 Preparação de células eletrocompetentes | 44 |
| 3.3.2 Preparação de células quimiocompetentes | 45 |
| 3.4 Montagem dos plasmídeos recombinantes | 45 |
| 3.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) | 45 |
| 3.4.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose | 46 |
| 3.4.3 Purificação dos produtos da PCR | 47 |
| 3.4.4 Ligação dos fragmentos de DNA em vetores de clonagem | 47 |
| 3.4.5 Transformação de células competentes | 47 |
| 3.4.5.1 Transformação de células eletrocompetentes | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.5.2 Transformação de células quimiocompetentes | 48 |
| 3.4.6 Purificação de DNA de plasmídeo | 48 |
| 3.4.7 Digestão dos vetores de clonagem com endonucleases de restrição | 48 |
| 3.4.8 Desfosforilação do vetor de clonagem pMOS[3XP3-eGFP]..... | 48 |
| 3.4.9 Purificação dos fragmentos de DNA | 49 |
| 3.4.10 Sequenciamento do DNA | 49 |
| 3.5 Obtenção e caracterização das linhagens transgênicas de <i>Aedes aegypti</i>.. | 50 |
| 3.5.1 Microinjeção de ovos embrionados do mosquito <i>Aedes aegypti</i> | 50 |
| 3.5.2 Extração de DNA genômico | 52 |
| 3.5.3 RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) semiquantitativo..... | 52 |
| 3.5.3.1 Extração de RNA total | 53 |
| 3.5.3.2 Tratamento de RNA total com DNase | 53 |
| 3.5.3.3 Síntese da 1ª fita de cDNA e PCR | 54 |
| 3.6 PCR quantitativo em tempo real | 54 |
| 3.6.1 Determinação do número de cópias do transgene nas linhagens transgênicas..... | 54 |
| 3.6.1.1 Quantificação de DNA genômico com PicoGreen® | 54 |
| 3.6.1.2 Construção de curva padrão com plasmídeo..... | 54 |
| 3.6.1.3 Reação de PCR quantitativo em tempo real | 56 |
| 3.6.2 Determinação do número de cópias de transcritos do transgene nas linhagens transgênicas..... | 57 |
| 3.6.2.1 Construção de curva padrão com plasmídeo..... | 57 |
| 3.6.2.2 Reação de PCR quantitativo em tempo real..... | 57 |
| 3.6.3 Obtenção de hemolinfa | 58 |
| 3.6.4 Cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) acoplada a um espectrômetro de massas para análise da hemolinfa de fêmeas <i>Aedes aegypti</i> | |

| | |
|--|----|
| <i>transgênicas</i> | 58 |
| 3.6.5 Experimento de bloqueio da infecção de <i>Plasmodium gallinaceum</i> em mosquitos transgênicos | 59 |
| 3.6.6 “Fitness” de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> transgênicos da linhagem pMOS[3Xp3-eGFP-Micro] PM2 | 60 |
| 3.6.6.1 Longevidade..... | 60 |
| 3.6.6.2 Fecundidade e fertilidade..... | 60 |
| 3.7 Análise estatística | 61 |
| 4 RESULTADOS | 63 |
| 4.1 Etapas da construção do transgene AeVg-Malt-Micro | 63 |
| 4.1.1 Amplificação da sequência codificadora do peptídeo microplusina por PCR | 65 |
| 4.1.2 Clonagem da sequência codificadora do peptídeo recombinante no vetor pGEM®-T | 66 |
| 4.1.3 Clonagem do peptídeo recombinante microplusina no vetor de clonagem pSLfa[AeVg] | 68 |
| 4.1.4 Inserção do transgene no vetor de transgênese pMOS[3xP3-eGFP] | 71 |
| 4.2 Obtenção das linhagens transgênicas de <i>Aedes aegypti</i> | 74 |
| 4.2.1 Microinjeção de ovos embrionados de <i>Aedes aegypti</i> para obtenção de mosquitos transgênicos | 74 |
| 4.3 Caracterização das linhagens transgênicas de <i>Aedes aegypti</i> | 76 |
| 4.3.1 PCR de DNA genômico para amplificação do gene marcador e do gene de bloqueio em linhagens pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro] de <i>Aedes aegypti</i> | 76 |
| 4.3.2 Análise do perfil de transcrição do RNA mensageiro (mRNA) de microplusina utilizando RT-PCR semi quantitativo | 77 |
| 4.3.3 Quantificação absoluta por PCR em tempo real de mRNA de microplusina | 79 |
| 4.3.3.1 PCR quantitativo em tempo real da linhagem PF6..... | 79 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.3.2 PCR quantitativo em tempo real da linhagem PM5..... | 80 |
| 4.3.3.3 PCR quantitativo em tempo real da linhagem PM4..... | 80 |
| 4.3.3.4 PCR quantitativo em tempo real da linhagem PM2..... | 81 |
| 4.3.4 Análise da hemolinfa de fêmeas <i>Aedes aegypti</i> transgênicas através de RP-HPLC acoplada a um espectrômetro de massas..... | 82 |
| 4.4 Efeito da microplusina no bloqueio da transmissão de <i>Plasmodium gallinaceum</i> em mosquitos transgênicos infectados..... | 84 |
| 4.4.1 Linhagem PF6..... | 85 |
| 4.4.2 Linhagem PM5..... | 88 |
| 4.4.3 Linhagem PM4..... | 90 |
| 4.4.4 Linhagem PM2..... | 92 |
| 4.5 Análise do <i>fitness</i> de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> transgênicos da linhagem PM2 expressando microplusina..... | 93 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 97 |
| 6 CONCLUSÕES | 105 |
| REFERÊNCIAS | 107 |
| ANEXO A - Representação esquemática do plasmídeo pSLfa 1180fa..... | 123 |
| ANEXO B - Representação esquemática do vetor de transgênese doador pMOS [3xP3-EGFP]..... | 125 |
| ANEXO C - Mapa do vetor de clonagem pGEM®-T Vector..... | 127 |
| ANEXO D - Representação esquemática do vetor de clonagem pJET 1.2..... | 128 |
| ANEXO E - Alinhamento da sequência de nucleotídeos dos peptídeos microplusina e microplusina otimizada..... | 130 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

Doenças como malária, dengue, febre amarela, filariose, doença de Chagas, doença de Lyme, leishmaniose e outras causadas por patógenos transmitidos por insetos vetores, são consideradas problema de saúde pública em vários países e estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas, ou seja, 1/6 da população mundial, sofre de alguma doença tropical negligenciada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A malária está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, sendo a África Sub-Sahariana o maior foco de transmissão, onde ocorrem 90% dos casos no mundo. Segundo a WHO (2010) metade da população mundial ainda vive em áreas de risco. Considerada problema de saúde pública em mais de 90 países, a malária tem provocado enormes problemas socioeconômicos em países em desenvolvimento (WHO, Media Center, 2010). Dados referentes ao ano de 2008 mostraram que cerca de 243 milhões de casos ocorreram no mundo, resultando em aproximadamente 863.000 mortes, 89% na África, sendo que grande parte dos casos eram crianças menores de cinco anos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

O continente americano possui três regiões de zona malarígena, sendo uma região localizada ao norte do Planalto Mexicano cujos principais vetores são *Anopheles quadrimaculatus* e *An. pseudopunctipennis*, outra na América Central e Antilhas, estendendo-se até a costa norte da Colômbia e Venezuela, tendo como principal vetor o *An. albimanus* e uma terceira região, ocupando grande parte do Continente Sul-Americano tendo o *An. darlingi* como principal vetor (REY, 2001).

No Brasil, no final do século XIX, a malária esteve presente em quase todo o território nacional (com exceção de alguns estados do Sul), principalmente na Amazônia Legal, onde foram descritas duas grandes epidemias amazônicas de malária entre o final do século XIX e início do século XX. Ambas as epidemias foram associadas ao deslocamento de trabalhadores de todas as regiões do Brasil durante a exploração da borracha e a construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré (CAMARGO, 1995; CAMARGO, 2003). Atualmente no Brasil cerca de 10-15% da população encontra-se em área de risco e a transmissão do plasmódio ocorre principalmente na região da Amazônia Legal, composta pelos estados o Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. De acordo com WHO (2010) em 2008

foram relatados 315.642 casos da doença (39.826 casos de crianças menores de 5 anos), sendo 15% destes casos devido à infecção por *Plasmodium falciparum*.

1.2 Agente etiológico e mosquitos vetores

O agente etiológico é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Existem cinco espécies de *Plasmodium* responsáveis por causar a malária humana: *P. falciparum* (causa a forma mais grave da doença), *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (LACRUE, 2007) e *P. knolesi*. Aproximadamente 77% das infecções registradas nas Américas são devido ao *P. vivax* (WHO, PAHO, 2010), tanto em adultos quanto em crianças. No entanto, as infecções com *P. falciparum*, espécie responsável pelas formas graves e complicadas da doença, tem ocorrido em menor frequência (REY, 2001).

No Brasil são encontradas as espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. O *P. ovale* é encontrado no continente africano e sudeste asiático. Os plasmódios em seu ciclo de vida apresentam uma fase assexuada endógena (esquizogonia), com a multiplicação no hospedeiro vertebrado, e uma fase sexuada exógena (esporogonia) com multiplicação dos parasitas nos mosquitos vetores.

Fase assexuada endógena:

Os plasmódios se beneficiam do hábito hematofágico de seus vetores, garantindo sua passagem de um hospedeiro para outro, dando continuidade ao seu ciclo de vida (CARRERA, 1991; REY, 1992). O ciclo parasitário assexuado que ocorre no hospedeiro vertebrado inicia-se quando o mosquito infectado, durante seu repasto sanguíneo, inocula junto com sua saliva, as formas infectantes de *Plasmodium* acumuladas nas glândulas salivares do inseto. Os esporozoítas ao caírem na corrente sanguínea migram para o fígado onde se alojam no interior das células hepáticas. No vacúolo parasitóforo, assim formado, os esporozoítas transformam-se em estruturas arredondadas denominadas criptozoítas, dando início ao ciclo de reprodução assexuada, também conhecido como ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica. Assim que começam as divisões nucleares, os parasitas passam a ser chamados esquizontes e, no fim da esquizogonia, produzem milhares de elementos filhos: os merozoítas. Os merozoítas que sobrevivem invadem as hemácias, dando início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios: o ciclo eritrocítico (JONES; GOOD, 2006). Após

algum tempo de evolução da infecção malárica os merozoítas diferenciam-se para produzir gametócitos, a forma que infecta o mosquito (Figura 1).

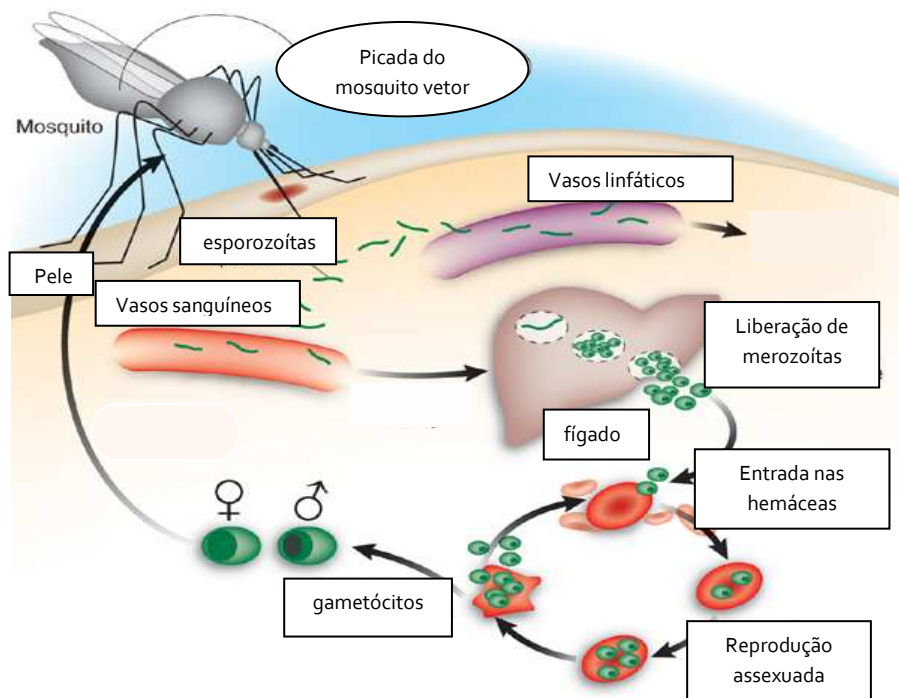


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado humano.
Fonte: modificado de Jones; Good, 2006.

Fase sexuada exógena:

Ao sugar o sangue, a fêmea do mosquito ingere todas as formas sanguíneas (merozoítas, esquizontes e gametócitos) que alcançam o intestino médio do mosquito, iniciando o ciclo parasitário sexuado no hospedeiro invertebrado. Os gametócitos ao atingirem o intestino médio iniciam o processo de gametogênese. A presença do ácido xanturênico, juntamente com a mudança de pH e temperatura adequada, permite que ocorra o processo de exflagelação do microgameta masculino, levando a diferenciação dos microgametas (BILLKER et al., 1996; GARCIA et al., 1998; GHOSH; EDWARDS; JACOBS-LORENA, 2000; ALY; VAUGHAN; KAPPE, 2009). Com a fertilização formam-se os zigotos, que começam a deslocar-se, razão pela qual são denominados oocinetos. Estas formas se dirigem para o epitélio do trato digestivo do inseto, atravessando o epitélio e se alojando entre a lâmina basal e a monocamada epitelial do intestino, formando os oocistos. Inicia-se então a esporogonia, formando milhares de esporozoítas (forma

infectiva do parasita) que são liberados na hemolinfa quando ocorre a ruptura dos oocistos maduros. Estas formas esporozoítas invadem as glândulas salivares e serão inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo (KAPPE; BUSCAGLIA; NUSSENZWEIG, 2004). Os esporozoítas são as formas infectantes dos parasitas da malária, sendo únicos quanto a sua habilidade em invadir dois tipos de células: aquelas nas glândulas salivares do mosquito e as células do fígado dos hospedeiros vertebrados (Figura 2).

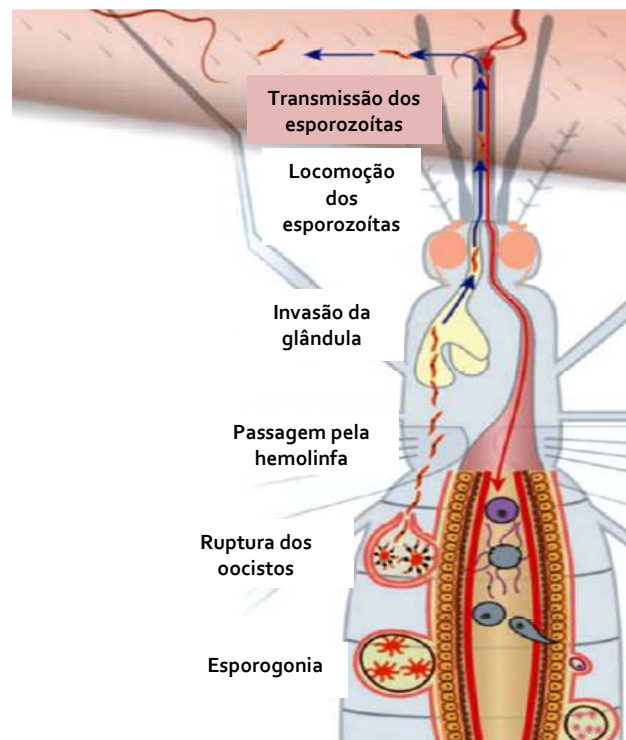


Figura 2. Ciclo de vida do *Plasmodium* no mosquito vetor.
Fonte: modificado de Lacrue, 2007.

O mosquito vetor do patógeno responsável por causar malária pertence à ordem dos dípteros, família Culicidae, gênero *Anopheles*. Existem mais de 350 espécies de *Anopheles* no mundo todo, mas somente cerca de 30 a 50 espécies são capazes de transmitir os plasmódios humanos (CAMARGO, 2003). As espécies de anofelinos presentes no Brasil são: *An. bellator*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. cruzii* e *An. darlingi*, sendo esta última considerada o vetor primário (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Além dos humanos, outros vertebrados também podem desenvolver a malária causada por diferentes espécies de *Plasmodium*, onde se destacam como modelos de

pesquisa os sistemas *P. berghei* e *An. stephensi* em camundongos e *P. gallinaceum* e *Aedes aegypti* em pintainhos (*Gallus gallus domesticus*).

Durante seu ciclo de vida, o mosquito passa por uma metamorfose completa, compreendendo quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. Em condições de temperatura e umidade adequadas, o ovo demora cerca de 2 a 3 dias para maturar, não sobrevivendo a desidratação e baixas temperaturas. As larvas alimentam-se por filtração e passam por quatro estádios larvais, sofrendo posteriormente, metamorfose em pupas. O ciclo completo, do ovo até a forma adulta, ocorre em torno de 10 a 15 dias. Os machos vivem aproximadamente 20 dias e alimentam-se de néctar (CHAPMAN, 1998), enquanto que as fêmeas vivem cerca de 50 dias e exercem a hematofagia como forma de obtenção de proteínas e aminoácidos importantes para o desenvolvimento dos ovos (CLEMENTS, 1992; ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005).

1.3 Controle e prevenção da malária

As formas tradicionais de controle dos insetos vetores são a borrifação de inseticidas em residências e em criadouros e o uso de mosquiteiros individuais impregnados com inseticidas, que aliam a proteção física com o controle químico do mosquito infectado (WHITE, 2004; AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, 2010). Além disso, medicamentos são utilizados no tratamento da doença, sendo frequente a utilização de cloroquina, amodiaquina, mefloquina, artemisinina e seus derivados (WHO, 2010).

Muitas estratégias têm sido estudadas para prevenir a transmissão da malária, através da produção de vacinas contra os estágios de desenvolvimento pré-eritrocítico e eritrocítico do parasita, e vacinas que bloqueiam a transmissão do parasita (CARTER, 2001; COUTINHO-ABREU; RAMALHO-ORTIGÃO, 2010a; GOOD; DOOLAN, 2010).

Compostos isolados de plantas, como a cloroquina, droga antimalárica usada por um longo período devido a sua alta eficiência contra todas as espécies de parasitas da malária (contra a qual já existem parasitas resistentes) e a artemisinina, (sendo um dos mais importantes no momento no tratamento da doença), tem sido estudados por muitos grupos de pesquisa na busca por medicamentos mais eficazes no tratamento da malária (KRETTLI et al., 2001; KAROU et al., 2003; ANDRADE-NETO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; RUIZ et al., 2010).

Mesmo com a utilização de várias estratégias de prevenção e controle da malária, ocorreu a seleção de parasitas resistentes às drogas utilizadas para o tratamento, os mosquitos vetores estão resistentes aos inseticidas e falta uma vacina efetiva para o controle da doença (WEBSTER, 2001; SRINIVASAN et al., 2004; WHITE, 2004; CHRISTOPHIDES, 2005).

Enquanto não surge uma vacina eficaz contra a malária, muitos pesquisadores têm estudado técnicas mais eficazes no controle do inseto vetor. O controle de vetores tem como objetivo reduzir a morbidade e mortalidade causada pela malária através da redução da transmissão do patógeno. Com o objetivo de controlar e reduzir a população do mosquito vetor, e conseqüentemente à transmissão do patógeno, tem se feito uso da estratégia do controle integrado. Controle integrado consiste na utilização de diversas técnicas de controle, visando reduzir a população do inseto vetor (FORATTINI, 2002; LHOSTE, 1996¹ apud SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS, CONTROLE INTEGRADO, 2010).

O controle integrado baseia-se em três técnicas: controle mecânico, químico e biológico. O controle mecânico consiste na utilização de medidas de saneamento básico e eliminação de criadouros sejam eles naturais ou artificiais. Controle químico utiliza larvicidas de baixa toxicidade e inseticidas de ação residual. O controle biológico consiste na utilização de animais predadores e/ou parasitas, como peixes larvófagos, crustáceos, insetos, bactérias, fungos e algumas espécies de protozoários. Este tipo de controle mostra-se vantajoso devido ao menor impacto ambiental quando comparado ao controle químico.

1.4 Uso de organismos geneticamente modificados no controle de patógenos

Dentro do princípio de controle integrado, o controle genético de insetos vetores tem sido proposto como uma estratégia alternativa.

A paratransgênese e a transgênese têm sido estudadas para reduzir a competência dos insetos vetores em transmitir patógenos (COUTINHO-ABREU et al., 2010b). A paratransgênese, ou seja, a manipulação genética de bactérias comensais ou simbióticas que expressam e secretam peptídeos ou proteínas que alteram a habilidade do

¹ LHOSTE, J. **La Lutte chimique contre les insectes nuisibles**. 1996. 66 f. Les Presses de la Faculté de Medecine et de Pharmacie de Marseille, Marselha, 1996.

hospedeiro em transmitir um patógeno (RIEHLE et al., 2003), tem sido promissora no controle da transmissão do *Trypanosoma cruzi* pelo *Rhodnius prolixus* em condições laboratoriais (BEARD; CORDON-ROSALES; DURVASULA, 2002). A bactéria *Wolbachia* tem sido objeto de estudo no controle do vírus dengue (BIAN et al., 2010) e da malária (JIN; REN; RASGON, 2009).

Seguindo o princípio de controle genético, a transgênese de insetos vetores tem sido proposta como uma estratégia alternativa para controlar a malária. A transgênese interrompe a transmissão do patógeno através da introdução de um fragmento de DNA exógeno no genoma do inseto que ao ser expresso inibe o desenvolvimento do patógeno dentro do inseto vetor. Este controle genético é aplicado nas seguintes estratégias de controle: redução do tamanho de uma população alvo (supressão) e substituição de uma população alvo por outra incapaz de transmitir o patógeno (MARSHAL et al., 2010).

A estratégia de supressão de população baseia-se na técnica do inseto estéril (SIT). A esterilização dos machos pode ser feita tanto com o uso de irradiação (SIT) (DYCK et al., 2005) como através da manipulação genética (CATTERUCCIA; CRISANTI; WIMMER, 2009; ALPHEY et al., 2010). O sistema de liberação de insetos carregando gene letal dominante (RIDL) que também teve como base a técnica SIT, foi utilizado inicialmente com *Drosophilla* (THOMAS et al., 2000; ALPHEY; ANDREASEN, 2002), e tem sido estudado a fim de adaptá-lo aos culicídeos vetores (ATKINSON et al., 2007; ALPHEY; BONSALL; ALPHEY, 2011). Este sistema permite que insetos machos carreguem no genoma um gene letal dominante ativado por um promotor específico de fêmea. As larvas são mantidas em meio contendo um repressor químico, onde na sua ausência o gene é ativado causando a morte de todas as fêmeas.

A estratégia de substituição de população utilizando a modificação genética em uma população de mosquitos para conferir a eles a característica de refratoriedade à malária, impedindo a transmissão de patógenos aos hospedeiros vertebrados, é uma abordagem promissora (MOREIRA et al., 2002; RAIKHEL et al., 2002). Pesquisadores têm conseguido em laboratório bloquear nos mosquitos a transmissão da malária utilizando anticorpos que matam o parasita dentro do inseto vetor (CAPURRO et al., 2000), genes cujas proteínas interrompem o desenvolvimento do patógeno no hospedeiro invertebrado (ITO et al., 2002; MOREIRA et al., 2002; RIEHLE et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008) e através do melhor entendimento do sistema imune dos mosquitos (WATERHOUSE et al., 2007).

O sucesso na produção de insetos transgênicos refratários a patógenos depende de elementos de transposição eficientes, genes repórteres apropriados, promotores eficazes com expressão estágio/tecido específica para direcionar a expressão da molécula efetora, moléculas efetoras anti-parasita adequadas e uma eficiente técnica de microinjeção.

Elementos de transposição:

Realizando estudos genéticos com milho, Barbara McClintock na década de 1940, descobriu que os genes eram capazes de se moverem para diferentes locais do genoma e modificar a expressão dos genes adjacentes. McClintock (1950) descreveu estes novos elementos genéticos, mas passaram-se três décadas para que seu trabalho fosse elucidado através da descoberta de elementos transponíveis em bactérias (COOPER, 2002).

Os elementos de transposição (também conhecidos como transposons) estão divididos em duas classes gerais de acordo com seu mecanismo de transposição:

Classe I-Retrotransposons: esta classe utiliza intermediários de RNA e o mecanismo de “copia e cola”. Os retrotransposons transformam-se em RNA através da transcrição e este RNA transforma-se em DNA através da transcriptase reversa, normalmente codificada pelo próprio retrotransposon, sendo por fim inserido novamente no genoma (COOPER, 2002).

Classe II-Transposons DNA: esta classe utiliza DNA e o mecanismo de “corta e cola”. A enzima transposase quebra o DNA alvo de maneira assimétrica e cliva o transposon nas extremidades das repetições invertidas flanqueadoras. A transposase une as extremidades do DNA ao transposon e as falhas resultantes das extremidades assimétricas são reparadas (COOPER, 2002).

A produção de insetos transgênicos tornou-se viável com o sistema baseado no elemento de transposição *P* de *Drosophila* (transposon Classe II) na década de 1982 (RYDER; RUSSEL, 2003). No entanto este elemento mostrou-se ineficiente para transformar outros insetos não-drosofilídeos (ATKINSON; PINKERTON; O'BROCHTA, 2001).

Com avanços nas técnicas de transformação de células germinativas de insetos surgiu o sistema denominado bi-partido, que através da inserção de um gene exógeno no genoma do inseto via inoculação de seus ovos com um plasmídeo doador contendo o transgene e outro plasmídeo (plasmídeo auxiliador) contendo o gene da transposase, foi

possível integrar o transgene de maneira estável. Neste sistema o plasmídeo auxiliador não possui as sequências do elemento de transposição e, portanto acaba por ser perdido no processo de divisão celular, fazendo com que o transposon fique inativo no genoma do inseto.

Mosquitos como *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* têm sido transformados geneticamente utilizando elementos de transposição (COUTINHO-ABREU et al., 2010b). Ao menos quatro sistemas derivados de elementos de transposição pertencentes à Classe II passaram a ser aplicados na transformação de insetos não-drosofilídeos.

Elemento de transposição *Hermes*: foi isolado da *Musca domestica*, possui 2,7 Kb e repetições terminais invertidas de 17 pb. Em 1998, Jasinskiene e colaboradores utilizaram o transposon *Hermes* na transformação de *Ae. aegypti*, a primeira transformação estável de um culicídeo e posteriormente outros pesquisadores também fizeram uso deste elemento de transposição em transformações de *Ae. aegypti* (PINKERTON et al., 2000). Em 2001, Allen et al., utilizaram este transposon para transformar *Culex quinquefasciatus*.

Elemento de transposição *Minos*: isolado de *D. hydei*, possui 1,8 Kb, repetições terminais invertidas de 255 pb (ATKINSON; PINKERTON; O'BROCHTA, 2001) e insere-se especificamente em sítios TA no genoma (FRANZ; SAVAKIS, 1991). Sua utilização tornou possível a primeira transformação de inseto não-drosofilídeo, tendo sua atividade de transposição evidenciada em lepdópteros, ortópteros e dípteros, incluindo *An. stephensi* (CATTERUCCIA et al., 2000a; O'BROCHTA et al., 2003) e *An. gambiae* (CATTERUCCIA et al., 1999).

Elemento de transposição *PiggyBac*: isolado de um baculovírus cultivado em *Trichoplusia ni* (ADELMAN; JASINSKIENE; JAMES, 2002), possui 2,5 Kb, repetições terminais invertidas de 13 pb e insere-se especificamente em sítios TTAA no genoma (CARY et al., 1989; O'BROCHTA et al., 2003). Foi muito utilizado na transformação de diversos insetos pertencentes à Ordem Diptera, incluindo os mosquitos *Ae. aegypti*, *An. albimanus*, *An. stephensi*, *An. gambiae* (KOKOZA et al., 2001; LOBO et al., 2002; PERERA; HARRELL; HANDLER, 2002; NOLAN et al., 2002; GROSSMAN et al., 2001).

Elemento de transposição *mariner* (*Mos1*): isolado de *D. mauritiana* (MEDHORA; MARUYAMA; HART, 1991), possui 1,3 Kb e repetições terminais invertidas de 28 pb e insere-se especificamente em sítios TA no genoma. Assim como o elemento *Hermes*,

MOS1 também foi utilizado na primeira transformação estável de um mosquito (COATES et al., 1998).

Genes repórteres:

A expressão dos genes repórteres auxilia na identificação dos organismos transformados, permitindo a separar indivíduos transgênicos de selvagens.

Os primeiros marcadores de transformação utilizados foram genes que conferiam aos indivíduos transgênicos resistência a antibióticos (MILLER et al., 1987; MCGRANE et al., 1988). No entanto, sua utilização apresentou certas limitações por gerar seleção de falsos positivos (PINKERTON et al., 2000; HORN et al., 2002).

Anos mais tarde, passou-se a utilizar marcadores fenotípicos, como genes que resgatavam a coloração dos olhos (RUBIN; SPRADLING, 1982), por exemplo, o gene *cinnabar* de *Drosophila*, na identificação da transformação de *Ae. aegypti* (JASINSKIENE et al., 1998; COATES et al., 1998; KOKOZA et al., 2000; LOBO et al., 2002) e *Ceratitis capitata* (LOUKERIS et al., 1995). Este tipo de marcador, no entanto, também apresentou limitações na sua aplicação, podendo ser utilizado somente em espécies que possuíam mutantes para a coloração dos olhos, resultando na recuperação da sua cor.

Atualmente, tem se feito uso de outros marcadores fenotípicos, sendo o GFP (*Green Fluorescent Protein*) o mais utilizado por possibilitar a fácil identificação dos transgênicos. O GFP foi clonado da água viva *Aequorea victoria* (AMSTERDAM; LIN; HOPKINS, 1995) e utilizado como gene marcador na identificação de diferentes espécies de animais, entre eles *D. melanogaster* (PLAUTZ et al., 1996), *Caenorhabditis elegans* (CHALFIE et al., 1994), *Danio rerio* (AMSTERDAM; LIN; HOPKINS, 1995) e mamíferos (GODWIN et al., 1998).

A proteína fluorescente vermelha (dsRED), isolada do coral *Discosoma* sp (MATZ et al., 1999), é outro marcador bastante utilizado, cuja fluorescência é bastante intensa, podendo ser diferenciada do GFP quando expressos simultaneamente (ADELMAN et al., 2008).

Promotores constitutivos foram utilizados para expressar genes repórteres, mas mostraram-se funcionais somente quando utilizados em organismos de espécies próximas. Entre eles estão os promotores dos genes de actina e poliubiquitina de *D. melanogaster* utilizados na transformação de *Ae. aegypti*, *An. stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *D. melanogaster* (JASINSKIENE et al., 1998; COATES et al., 1998; PINKERTON et al., 2000; CATTERUCCIA et al., 2000b).

O promotor 3xP3, que possui 1,3 Kb e exerce importante papel no desenvolvimento dos olhos de animais vertebrados e invertebrados (FINOKIET; GONI; LORETO, 2007), tem sido amplamente utilizado na transgenia de animais (HORN et al., 2002; BIAN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008; MATSUOKA; IKEZAWA; HIRAI, 2010).

Promotores com expressão estágio/tecido específica:

Durante o ciclo de vida do *Plasmodium* dentro do mosquito, o parasita interage com tecidos específicos (intestino médio, hemolinfa, glândula salivar), que por sua vez tornam-se regiões alvo para bloquear o seu desenvolvimento. Para isso, se faz necessário o uso de promotor capaz de expressar o transgene no tecido de interesse e no momento apropriado, de acordo com o ciclo de vida do patógeno dentro do inseto vetor.

As buscas de diversas opções de promotores gênicos, capazes de serem testados no controle da expressão de genes efetores, e também na análise da toxicidade das próprias moléculas efetoras, contribuem com o desenvolvimento dos transgenes. A transformação genética de mosquitos vetores tem permitido caracterizar promotores endógenos e suas regiões regulatórias.

Promotores específicos de glândula salivar dos genes *maltase-like 1* e *apirase* foram utilizados na transformação de *Ae. aegypti* para direcionar a expressão da luciferase como gene repórter (COATES et al., 1999). Entretanto, a expressão do gene repórter foi fraca para ser utilizada na transgênese de mosquitos (SPERANÇA; CAPURRO, 2007).

Anos mais tarde, Catteruccia, Crisanti e Wimmer (2005) mostraram que o promotor da proteína antiplaquetária (AAPP), específico de glândula salivar de fêmea, foi fortemente ativado após o repasto sanguíneo. Diante deste resultado, Yoshida e Watanabe (2006) isolaram de *An. stephensi* o AAPP e transformaram mosquitos desta espécie com o promotor AAPP direcionando a proteína dsRED, o que resultou em altos níveis de expressão da proteína no citoplasma do lobo lateral distal da glândula salivar (região de invasão mais escolhida pelos esporozoítas de *Plasmodium*).

O promotor do gene codificante da enzima digestiva carboxipeptidase, específico de trato digestivo, foi isolado e caracterizado nos mosquitos *An. gambiae* (EDWARDS et al., 1997) e *Ae. aegypti* (EDWARDS et al., 2000) e utilizado para direcionar a expressão do gene da luciferase em *Ae. aegypti*. A expressão do gene repórter foi específica para trato digestivo, indicando a viabilidade da utilização destes promotores no direcionamento de genes anti-parasitas para o trato digestivo do mosquito (MOREIRA et al., 2000). O

promotor da carboxipeptidase de *Ae. aegypti* foi utilizado na transformação de *An. gambiae* para expressar o peptídeo cecropina A (KIM et al., 2004). Os promotores da carboxipeptidase de *Ae. aegypti* e *An. gambiae* também foram utilizados na obtenção de transgênicos de *An. stephensi* expressando os peptídeos antimaláricos fosfolipase A₂ (PLA₂) e SM1 (MOREIRA et al., 2002; ITO et al., 2002).

Outro promotor de trato digestivo, a peritrofina (promotor da proteína de matriz peritrófica 1) de *An. gambiae*, foi utilizado para expressar PLA₂ de veneno de abelha e PLA₂ mutada em *An. stephensi* e *Ae. fluviatilis*, respectivamente (ABRAHAM et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008). A peritrofina, assim como a carboxipeptidase, também apresentou o perfil de expressão temporal e tecido específico.

Específico de corpo gorduroso, o promotor do gene da vitelogenina de *Ae. aegypti* foi utilizado para direcionar a expressão da defensina A, um peptídeo antimicrobiano. O transgene apresentou altos níveis de transcrição no intervalo de tempo determinado pelo gene endógeno (KOKOZA et al., 2000). Nirmala et al. (2006) caracterizaram a sequência do promotor de vitelogenina de *An. stephensi*, indicando ser um bom candidato para direcionar a expressão de transgenes em mosquitos anofelinos.

Moléculas efetoras:

Os primeiros mosquitos transformados foram obtidos com o intuito de testar a viabilidade da técnica em diferentes espécies e a expressão dos genes repórteres. Mais tarde, a aplicação da transgenia em mosquitos vetores foi utilizada para estudar a expressão de genes no bloqueio de parasitas, para que pudessem futuramente auxiliar no controle da transmissão do patógeno.

Na busca por moléculas efetoras capazes de bloquear a transmissão do patógeno no mosquito, nos deparamos com diversos mecanismos de interferência realizados por estas moléculas nos diferentes estágios de desenvolvimento do *Plasmodium* nos mosquitos (NIRMALA; JAMES, 2003).

Nenhuma molécula agindo isoladamente foi capaz de inibir 100% o desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito. Por isso, torna-se importante estudar moléculas que atuem sobre diferentes formas do parasita, visando a aplicação conjunta destas moléculas na transformação dos mosquitos vetores, a fim de se obter 100% de refratoriedade. A gama de moléculas capazes de bloquear o desenvolvimento do *Plasmodium* dentro do mosquito é bem ampla, sendo que apenas uma pequena parcela foi testada na transformação destes insetos vetores.

Na busca por moléculas capazes de impedir a invasão da glândula salivar pelo esporozoíta de *Plasmodium*, fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) foram desenvolvidos e testados. O primeiro scFv desenvolvido foi o anti-Pbs21, atuando contra uma proteína de superfície de zigoto e oocineto de *P. berghei* (Pbs21), reduzindo em 93% a formação de oocistos quando mosquitos *An. stephensi* foram alimentados com sangue de camundongo infectado com *P. berghei* (YOSHIDA et al., 1999). Capurro et al. (2000) mostraram que um scFv específico para a proteína circunsporozoíta (CSP), quando injetado intratoracicamente utilizando o vírus Sindbis como vetor, reduziu 99,9% o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Ae. aegypti* e Jasinskiene et al. (2007) expressando este scFv em *Ae. aegypti* transgênico, conseguiram também obter uma redução no número de esporozoítas de *P. gallinaceum* presentes na glândula salivar de 13-16% utilizando o promotor da poliubiquitina de *D. melanogaster* e 56-85% com o promotor da vitelogenina de *Ae. aegypti*.

Peptídeos PLA2 e SM1 são capazes de se ligarem aos receptores de trato digestivo e/ou glândula salivar, bloqueando a passagem do parasita. O peptídeo PLA2 de veneno da cascavel *Crotalus adamanteus*, inibiu a adesão dos oocinetos e formação de oocistos quando foi adicionado ao sangue de pintainhos infectados e ingerido por *Ae. aegypti*, *An. gambiae* e *An. stephensi*, sugerindo que PLA2 ao se ligar ao trato digestivo tenha bloqueado um receptor importante para a invasão dos oocinetos (ZIELER et al., 2001). No ano seguinte, Moreira et al. (2002) produziram mosquitos *An. stephensi* transgênicos utilizando o promotor da carboxipeptidase de *An. gambiae* para direcionar a expressão do peptídeo PLA2 de veneno de abelha, resultando na redução da formação de oocistos, além de reduzir a fertilidade das fêmeas (MOREIRA et al., 2002). Resultados semelhantes foram observados quando o promotor da proteína de matriz peritrófica 1 (AgAper1) foi utilizado, sugerindo que a PLA2 poderia ter causado danos nas células epiteliais do intestino, o que acarretaria a diminuição da absorção de nutrientes e consequentemente, a baixa fertilidade das fêmeas (ABRAHAM et al., 2005). A forma inativa da PLA2 utilizada por Rodrigues et al. (2008) na transformação de *Ae. fluviatilis* foi capaz de reduzir 68% o número de oocistos de *P. gallinaceum* sem acarretar aparente custo ao *fitness* do mosquito.

Peptídeos sintéticos têm sido testados no bloqueio do desenvolvimento do *Plasmodium* dentro do mosquito. O peptídeo SM1, identificado em uma biblioteca de fago, bloqueou a invasão de *P. berguei* no trato digestivo e glândula salivar de *An.*

stephensi (GHOSH; RIBOLLA; JACOBS-LORENA, 2001) e, quando expresso em *An. stephensi* transgênico direcionado pelo promotor da carboxipeptidase, foi capaz de inibir a formação de oocistos (ITO et al., 2002). Os dois estudos relatam a coincidência de tecidos com que o peptídeo e os parasitas interagem, sugerindo que ambos reconhecem receptores semelhantes presentes tanto na superfície apical do trato digestivo quanto na superfície basal do lobo distal da glândula salivar.

Além das moléculas descritas, que atuam sobre receptores, existem as moléculas com ação anti-parasítica, que podem ser endógenas, fazendo parte do repertório imunológico natural do mosquito, exógenas originárias de outra espécie e sintéticas (CARTER; HURD, 2010). Dentro desta categoria de moléculas, encontram-se diversos peptídeos antimicrobianos, como por exemplo, cecropinas, defensinas e peptídeos híbridos que interagem diretamente nos parasitas levando-os a morte celular (GWADZ et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1995; SHAHABUDDIN et al., 1998; ARRIGHI et al., 2002).

An. gambiae e *Anopheles dirus* infectados por *Plasmodium*, tiveram o número de oocistos reduzido em 81-94% e 82-95%, quando microinjetados com cecropina B e magainina II respectivamente (GWADZ et al., 1989).

An. albimanus alimentado com gametócito de *P. berghei* previamente tratados com Shiva-3, um peptídeo sintético de cecropina, tiveram o desenvolvimento do parasita inibido no trato digestivo (RODRIGUES et al., 1995).

Defensinas isoladas de *Aeschna cyanea* e *Phormia terranova* quando injetadas em *Ae. aegypti*, foram capazes de reduzir o número de oocistos viáveis e esporozoítas de *P. gallinaceum* (SHAHABUDDIN et al., 1998). *Aedes aegypti* transgênicos foram gerados, expressando defensina A e cecropina A em resposta ao repasto sanguíneo (KOKOZA et al., 2001; SHIN; KOKOZA; RAIKHEL, 2003). Cecropina A expressa em *An. gambiae*, sob a direção do promotor da carboxipeptidase de *Ae. aegypti*, reduziu a intensidade de *P. berghei* presente no mosquito transgênico quando comparado ao não transgênico.

A gomesina, peptídeo antimicrobiano isolado da aranha *Acanthocurria gomesiana*, em teste realizado contra todos os estágios de desenvolvimento de *P. falciparum* e *P. berghei* "in vitro" e em *An. stephensi*, inibiu a exflagelação de gametócito masculino e reduziu o número de oocistos de ambas espécies de *Plasmodium*, sem afetar o mosquito (MOREIRA et al., 2007).

Nos testes realizados "in vivo" por Arrighi et al. (2002) com todos os estágios de desenvolvimento do *P. berghei* dentro do mosquito e utilizando peptídeos sintéticos,

Vida-1 foi ativo contra oocinetos jovens, Vida-2 reduziu em 70% a presença de oocinetos maduros e Vida-3 causou altos níveis de mortalidade em todo o período de desenvolvimento de *P. berghei*, mostrando-se ativo também contra *P. yoelli nigeriensis*. Vida-3 ao ser expresso no trato digestivo de de *An. gambiae* transgênico reduziu em 85% a infecção por *P. yoelli nigeriensis* (MEREDITH et al., 2011).

Em um estudo recente, Maciel et al. (2008) injetando o peptídeo Angiotensina II em *Ae. aegypti* infectado por *P. gallinaceum*, obtiveram uma redução de 88% no número de esporozoítas presentes nas glândulas salivares. Resultado semelhante foi obtido ao analisarem a ação anti-parasítica de VC5 (76%), análogo da Angiotensina II.

Baseado na idéia da co-expressão de duas ou mais moléculas efetoras em mosquitos transgênicos, Kokoza et al. (2010) co-expressando pela primeira vez cecropina A e defensina A em *Ae. aegypti* transgênico, com a expressão direcionada pelo promotor da vitelogenina, conseguiram reduzir 78-96% o número de oocistos de *P. gallinaceum* presentes no trato digestivo e nenhum esporozoíta foi encontrado na glândula salivar.

1.5 Microplusina

O grupo da Dr^a Silrei Daffre tem purificado e caracterizado bioquímica e molecularmente peptídeos antimicrobianos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

A microplusina, peptídeo antimicrobiano pertencente à família das defensinas, possui massa molecular de 10.204 Da e foi isolado da hemolinfa do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FOGAÇA et al., 2003). É um peptídeo ácido em pH fisiológico e possui em sua estrutura primária seis resíduos de cisteína envolvidos na formação de três pontes de dissulfeto. Também possui sete resíduos de histidina presentes predominantemente na sua porção C-terminal (FOGAÇA et al., 2003). Estudos mostraram que é sintetizada como uma molécula precursora com um peptídeo sinal com 20 resíduos. É expressa em diferentes tecidos do carrapato: hemócitos, corpo gorduroso e ovários (FOGAÇA et al., 2003).

Um trabalho posterior mostrou que a microplusina também está presente em ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, apresentando efeito bacteriostático em baixas concentrações (MIC=0,39 μ M - 0,76 μ M) contra *Micrococcus luteus*, outras bactérias Gram-positivas e fungos (ESTEVEES et al., 2009), porém não apresenta atividade contra

bactérias Gram-negativas (SILVA et al., 2009). Através da microscopia de fluorescência, viram que a microplusina está presente entre os grânulos de vitelo dos oócitos e na superfície celular, sendo também encontrada nos tubos conectivos do sistema reprodutivo das fêmeas. Sua presença no trato reprodutivo das fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sugere que o peptídeo desempenhe uma função protetora para os embriões (ESTEVEES et al., 2009). O nível de transcritos de microplusina aumentou gradualmente ao longo do desenvolvimento do ovário, atingindo níveis mais elevados no início da oviposição (ESTEVEES et al., 2003).

Silva et al. (2009) ao estudarem o mecanismo de ação da microplusina, puderam concluir que o peptídeo é um quelante de cobre e sua ligação ao cobre não induz mudanças conformacionais a sua estrutura terciária. A alteração nos níveis de cobre, resultante da ação da microplusina, interferem na virulência e sobrevivência de *Cryptococcus neoformans*, inibindo a melanização do fungo, fator catalizado pela lacase, uma enzima cobre-dependente (SILVA et al., 2009). O potencial terapêutico da microplusina foi confirmado em experimentos “*in vivo*” com modelo murino, resultando na redução do processo inflamatório e da viabilidade de *C. neoformans* nos pulmões. Tais resultados sugerem que em condições otimizadas, a microplusina possa ser utilizada no controle de infecções (SILVA, 2008).

Estudo sobre a atividade anti-parasítica da microplusina, mostrou que o peptídeo possui efeito anti-esporozoíta (RODRIGUES, 2005). Neste trabalho, utilizando *Ae. aegypti* infectado com *P. gallinaceum*, foram realizadas microinjeções intratorácicas com 10µM e 30µM do peptídeo e sua atividade resultou na redução do número de esporozoítas na glândula salivar quando comparado com o grupo controle em 83% e 80% respectivamente. Além da identificação de sua ação anti-esporozoítas, também foi confirmado que esta molécula não possui efeito tóxico ao mosquito. Neste mesmo trabalho, os experimentos de incubação de esporozoítas maduros com microplusina 20µM resultaram na permeabilidade da membrana após 30 minutos.

Poucos mosquitos transgênicos refratários a malária aviária e de roedores, expressando moléculas letais aos parasitas têm sido criados. Além disso, nenhuma molécula letal ao *Plasmodium* da malária humana foi expressa em mosquitos transgênicos até o momento.

Diante da confirmação da eficiente atividade anti-parasítica da microplusina, este peptídeo tornou-se um promissor candidato a ser melhor analisado, permitindo criar uma molécula

sintética extremamente eficaz no bloqueio do *Plasmodium* no mosquito vetor através da manipulação da sua sequência de aminoácidos, carga, hidrofobicidade e estrutura terciária que resulta na habilidade da molécula para formar poros. O sistema da malária aviária foi utilizado pelo fato do *P. gallinaceum* ser filogeneticamente próximo ao *P. falciparum* (parasita responsável pela forma mais severa da malária) (WATERS; HIGGINS; MCCUTCHAN, 1991; MCCUTCHAN et al., 1996), secretar na superfície dos esporozoítas proteínas provavelmente homólogas as do *P. falciparum*, desempenhando um papel similar na invasão do tecido do hospedeiro, além de facilitar o estudo de moléculas em ambos os hospedeiros vertebrado e vetor.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivo avaliar a expressão da molécula efetora microplusina na hemolinfa de mosquitos transgênicos, utilizando o modelo experimental *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

2.1 Objetivos específicos

- Construir um transgene, usando o promotor da vitelogenina de *Ae. aegypti* e o peptídeo microplusina como molécula efetora anti esporozoíta;
- Gerar mosquitos *Ae. aegypti* transgênicos através da inserção do transgene no genoma;
- Caracterizar as linhagens de mosquitos *Ae. aegypti* transgênicos através da confirmar a integração do transgene no genoma do mosquito transgênico, perfil transcricional do RNA mensageiro da microplusina e detecção da expressão da proteína;
- Avaliar a atividade anti esporozoíta da microplusina sobre *P. gallinaceum* em mosquitos *Ae. aegypti* transgênicos quando presente na hemolinfa;
- Avaliar o *fitness* da linhagem PM2.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 *Aedes aegypti*

A colônia dos mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (cepa Higgs) foi mantida no Biotério de insetos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II –ICB II– da Universidade de São Paulo – USP. Os mosquitos foram mantidos sob a temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $80\% \pm 10\%$ e fotoperíodo (16h luz; 8h escuro). As fêmeas foram alimentadas com sacarose 10% (p/v) e, semanalmente, realizaram o repasto sanguíneo em camundongos da linhagem Balb/c anestesiados com injeção de cloridrato de xilazina 3 ng/Kg e acepromazina 0,3 ng/Kg. Três dias após a alimentação sanguínea, um recipiente plástico revestido com papel filtro e contendo água foi colocado dentro da gaiola para que as fêmeas realizassem a oviposição. A postura era retirada da gaiola após três dias e seca por 24 horas.

As larvas foram eclodidas de maneira sincronizada em água autoclavada armazenada em frasco fechado hermeticamente. Após a eclosão foram mantidas em recipientes plásticos com água destilada e alimentadas diariamente com ração para peixes moída TETRAMIN[®] (Tetra, Melle, Lower Saxony, DE) até alcançarem o estágio de pupa.

As pupas foram separadas e colocadas em copos plásticos de 500 ml para emergência dos adultos. Os copos foram fechados com tecido filó e os mosquitos receberam diariamente uma solução de sacarose 10% (p/v).

3.1.2 *Camundongos*

Camundongos da linhagem Balb/c, utilizados nos experimentos, foram produzidos e mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB II da USP.

As aves *Gallus gallus domesticus* (pintainhos com 1 dia de idade) foram doados pela granja Kunitomo (Mogi das Cruzes, SP – BR) e mantidos no Biotério de aves do Departamento de Parasitologia (ICB II – USP) à $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 60% de umidade relativa

do ar. Tiveram acesso livre a água e ração livre de antibióticos e antiparasíticos, doada pela Dr^a Lucimara Mendes do Laboratório Biovet.

3.1.3 *Plasmodium gallinaceum*

O *Plasmodium gallinaceum* teve seu ciclo de vida mantido *in vivo*. Uma alíquota de sangue congelado de *Gallus gallus domesticus* infectado com a cepa 8A de *Plasmodium gallinaceum*, proveniente do isolado original de Brumpt (1937), foi gentilmente fornecida pela Dra. A. Krettli (Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, MG, Brasil). Esta amostra foi utilizada para a inoculação intravenosa de pintainhos de dois dias de idade. A partir do 7^o dia após a inoculação, foram feitas lâminas de esfregaço sanguíneo coradas com Giemsa, e a parasitemia determinada através da contagem do número de células parasitadas/total de células contadas, através de microscopia óptica usando aumento de 1000x. Pintainhos com 5-10% de parasitemia foram anestesiados com injeção de cloridrato de xilazina 3 ng/Kg e acepromazina 0,3 ng/Kg e utilizados no repasto sanguíneo de grupos de fêmeas de *Aedes aegypti*, por 30 minutos. O pintainho infectado utilizado na alimentação dos mosquitos foi sacrificado em câmara de CO₂. Os mosquitos foram anestesiados com CO₂ e mantidos no gelo para a separação das fêmeas ingurgitadas, sendo mantidas em copos fechados com tecido filó e alimentadas com solução de sacarose 10% (p/v) sob a temperatura de 28°C ± 1°C e umidade relativa do ar de 80% ± 10%. O trato digestivo dissecado foi analisado por microscopia de contraste de fase entre o 5^o e 6^o dia após o repasto sanguíneo infectado para a determinação do número de oocistos. No 14^o dia após a infecção dos mosquitos, pintainhos de dois dias de idade foram anestesiados e expostos aos mosquitos infectados para a manutenção do ciclo de *Plasmodium gallinaceum in vivo*.

3.2 Plasmídeos e Reagentes

Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram:

pSLfa [AeVg]: plasmídeo com resistência a ampicilina contendo a sequência promotora do gene de Vitelogenina de *Aedes aegypti* (RAIKHEL et al., 2002) e a região reguladora 3'UTR do vírus SV40 (KOKOZA et al., 2000) (ANEXO A). Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Dr. Alexander Raikhel, da Universidade da Califórnia, Riverside, Califórnia, EUA.

pMOS [3xP3-eGFP]: vetor doador com resistência a ampicilina, contendo os braços invertidos do elemento de transposição *mariner* de *Drosophila* (MEDHORA et al., 1991) e nele está contido o promotor de olhos 3xP3 responsável pelo direcionamento a expressão da proteína fluorescente eGFP (HORN; WIMMER, 2000) (ANEXO B).

pKhsp82MOS: vetor auxiliador com resistência a ampicilina que contém a sequência codificadora da transposase *mariner* dirigida pelo promotor de *hsp70* (HORN e WIMMER, 2000). Este plasmídeo e o *pMOS* [3xP3-eGFP] foram gentilmente cedidos pelo Dr. Anthony James, da Universidade da Califórnia, Irvine, Califórnia, EUA.

pRSET A [micro] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA): plasmídeo com resistência a ampicilina contendo a sequência codificadora do peptídeo Microplusina. Este plasmídeo foi gentilmente cedido pela Dr^a Sirlei Daffre, da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Os plasmídeos *pGEM*[®]-T Vector (Promega, Madison, WI, USA) (ANEXO C) e *pJET1.2/blunt* Cloning Vector (Fermentas, Burlington, ON, CA) (ANEXO D) e os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho foram adquiridos comercialmente.

3.3 Produção de células *Escherichia coli* (*E. coli*) competentes

As linhagens de *E. coli* utilizadas para produção de células competentes foram:

DH5 α : *supE44 Dlac U169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

DH10B: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ -*rpsL nupG tonA**

3.3.1 Preparação de células eletrocompetentes

Um inóculo do estoque de bactéria *E. coli* DH10B foi plaqueado em meio de cultura LB/ágar (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% NaCl, 1 ml 1 N NaOH, 1,5% de ágar bacteriológico/L de solução) e incubado a 37 °C por 16 horas. Uma colônia individualizada de bactérias foi semeada em 5 ml de meio LB líquido (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% NaCl, 1 ml 1 N NaOH) e incubada sob agitação a 37 °C por 16 horas. A cultura saturada de bactérias foi inoculada em 500 ml de meio LB líquido e mantida sob agitação a 37 °C até atingir a D.O. _{600nm} de 0,6. A cultura de bactérias foi mantida no gelo por 30 minutos e em seguida centrifugada a 7000 x *g* por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento

ressuspendido em 500 ml de água gelada, sendo em seguida centrifugado com descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido em 250 ml de água gelada e a mistura novamente centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10 ml de água gelada contendo glicerol 10%. Foi realizada a última centrifugação e o precipitado, após o descarte do sobrenadante, foi ressuspendido em 1,5 ml de água gelada contendo glicerol 10%. A solução de bactérias competentes foi aliquoteada (40 µl/tubo), congelada em banho de gelo seco e armazenada à -80 °C.

3.3.2 Preparação de células quimiocompetentes

Um inóculo do estoque de bactéria *E. coli* DH5α foi plaqueado em meio de cultura LB/ágar (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% NaCl, 1 ml 1N NaOH, 1,5% de ágar bacteriológico/L de solução) e incubado a 37 °C por 16 horas. Uma colônia individualizada de bactérias foi semeada em 5 ml de meio LB líquido (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% NaCl, 1 ml 1N NaOH) e incubada sob agitação a 37 °C por 16 horas. A cultura saturada de bactérias foi inoculada em 500 ml de meio LB líquido e mantida sob agitação a 37 °C até atingir a D.O. _{600nm} de 0,6. A cultura de bactérias foi mantida no gelo por 8 minutos e em seguida centrifugada a 7000 x *g* por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em ¼ do volume total de MgCl₂ 0,1 M gelado, sendo em seguida centrifugado com descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em ¼ do volume total de CaCl₂ 0,1 M gelado. Foi realizada a última centrifugação e o precipitado, após o descarte do sobrenadante, foi ressuspendido em 5,37 ml de CaCl₂ 0,1 M gelado contendo glicerol 10%. A solução de bactérias competentes foi aliquoteada (100 µl/tubo), congelada em banho de gelo seco e armazenada à -80 °C.

3.4 Montagem dos plasmídeos recombinantes

3.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA utilizadas como molde foram amplificadas através de uma reação em cadeia de polimerase. Todos os reagentes empregados foram adquiridos da empresa Invitrogen. Para um volume final de 25 µl de reação, as concentrações iniciais

utilizadas foram: MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, oligonucleotídeos iniciadores (oligos) 10 µM (Tabela 1), dNTPs 0,4 mM, DNA molde 10 ng, Taq Polimerase 2,5 U e água ultra pura. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores da reação de acordo com o especificado para cada experimento. As amplificações foram realizadas no termociclador Biometra® (Biometra, Rudolf-Wissel, Goettingen, Alemanha) programado para as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 5 minutos seguidos de 25 ciclos de 95 °C por 50 segundos, anelamento a 60 °C por 50 segundos e extensão a 72 °C por 50 segundos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C (para amplificação da microplusina); desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguidos de 32 ciclos de 94 °C por 20 segundos, anelamento a 55 °C por 20 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos (para amplificação da sequência codificadora da proteína eGFP). Para a amplificação do gene da actina foi utilizado o mesmo programa da proteína eGFP, mas com 30 ciclos.

Tabela 1- Sequência do oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCRs.

| Construção | Oligo | Sequência | T _m °C | Fragmento |
|---------------------------------------|-------------------------------|---|-------------------|-----------|
| <u>Microplusina</u> (PCR clonagem) | <i>BglIII</i> _ Malt <i>F</i> | 5'-AGATCTATGAAGATCTTTGTTCCACTTCT AAGCTTCCTCCTAGCAGGACTAAC-3' | | |
| | *Malt_Micro <i>F</i> | 5'CTCCTAGCAGGACTAACCACCGGTTGGACT GGTGGCATCACCAGGAGCTTTG-3' | 60 °C | 356 pb |
| | *Micro_ <i>NotI</i> <i>R</i> | 5'GCGGCCGCTTAATGGTCGTGCTCATG 3' | | |
| <u>eGFP</u> (PCR genômico) | GFP_SV40 <i>F</i> | 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGA-3' | 55 °C | 964 pb |
| | GFP_SV40 <i>R</i> | 5'-TAAGATACATTGATGAGTTTGGGA-3' | | |
| <u>Actina</u> (PCR genômico) | Actina <i>F</i> | 5'-GAGCGTGGCTACTCCTTCAC-3' | 55 °C | 350 pb |
| | Actina <i>R</i> | 5'-AGTTTCGTGGATACCGCAAG-3' | | |

* oligonucleotídeos utilizados também em PCR DNA genômico para amplificação do transgene.

3.4.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) contendo 1% de agarose (p/v) dissolvida em tampão TBE 1x (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 50 mM). A mistura de agarose e tampão foi aquecida em forno microondas até completa solubilização da agarose, sendo posteriormente adicionado 1 µl (0,02 mg) de brometo de etídeo. Foi utilizado o marcador de pares de bases 1 Kb plus (Invitrogen). Nas amostras de DNA foi misturado o equivalente a 1/5 do volume de tampão de amostra (glicerol 50 % e xilenocianol/ou orange G 0,25 %) e então aplicadas no gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema horizontal Owleasycast™ E2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com tempo e voltagem estipulados de

acordo com o experimento. O DNA foi visualizado em transluminador ultravioleta UV Transilluminator (UVP, Upland, CA, EUA) e fotografado sob luz ultravioleta em câmera digital Olympus SP350 (Tóquio, Japão).

3.4.3 Purificação dos produtos da PCR

Para dar prosseguimento à clonagem, os produtos das PCRs após visualização em gel de agarose, foram purificados utilizando QUIAquick® PCR Purification Kit (Quiagen, Valencia, CA, EUA), conforme instruções do fabricante, para remover nucleotídeos livres que pudessem dificultar as reações seguintes.

3.4.4 Ligação dos fragmentos de DNA em vetores de clonagem

Diversas proporções de vetor: inserto (1:2, 1:5, 3:8) foram padronizadas para cada etapa da clonagem. As reações de ligação foram realizadas com 1 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), tampão próprio para a enzima de acordo com o fabricante e mantidas a 14 °C por 16 horas. Ligações feitas com o kit do vetor pJET1.2/blunt Cloning Vector (Fermentas) seguiram instruções do fabricante.

3.4.5 Transformação de células competentes

3.4.5.1 Transformação de células eletrocompetentes

Um volume de 1-2 µl das reações de ligação foi adicionado à alíquota de bactéria eletrocompetente e esta mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e eletroporadas a 2500 V utilizando o eletroporador Cellject Hybrid (Bioscience Technology, Rockaway, NJ, EUA). As bactérias eletroporadas foram inoculadas em 1 ml de LB líquido e incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação. Após a incubação, as bactérias foram semeadas em meio LB/ágar contendo IPTG 1 mM, ampicilina 100 µg/ml e X-Gal 30 µg/ml ou somente ampicilina, dependendo do plasmídeo utilizado.

3.4.5.2 Transformação de células quimiocompetentes

Um volume de 5 µl das reações de ligação foi adicionado à alíquota de bactéria quimiocompetente e mantida no gelo por 30 minutos. Em seguida foi transferida para 42 °C por 45 segundos para sofrer um choque térmico. Imediatamente após o choque térmico as bactérias transformadas foram transferidas para o gelo, inoculadas em 250 µl de LB líquido e incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação. Após a incubação, as bactérias foram semeadas em meio LB/ágar contendo IPTG 1 mM, ampicilina 100 µg/ml e X-gal 30 µg/ml ou somente ampicilina, dependendo do experimento.

3.4.6 Purificação de DNA de plasmídeo

As bactérias contendo o inserto de interesse foram inoculadas em 5 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37 °C sob agitação por 16 horas. Após este período a suspensão de bactérias foi centrifugada a 10000 x *g* por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo DNA de plasmídeos foi purificado utilizando QUIAGEN Plasmid Mini Kit (Quiagen), conforme instruções do fabricante.

3.4.7 Digestão dos vetores de clonagem com endonucleases de restrição

Amostras de DNA contendo cerca de 1 µg dos vetores foram digeridas com as seguintes enzimas:

pGEM[®]-T Vector, *pCR*[®] 2.1 vector : 10 U das enzimas *Bgl*II e *Not*I.

pSLfa[AeVg]: 10 U das enzimas *Bgl*II, *Not*I e *Asc*I.

pMOS[3xP3-eGFP]: 10 U da enzima *Asc*I.

*pJET*1.2/blunt Cloning Vector: 10 U das enzimas *Bgl*II, *Not*I e *Xho*I.

Todas as enzimas foram fornecidas pela empresa New England Biolabs (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). As amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C.

3.4.8 Desfosforilação do vetor de clonagem *pMOS*[3xP3-eGFP]

Para impedir a recircularização o vetor *pMOS*[3xP3-eGFP] após a digestão, foi submetido à reação de desfosforilação que continha 5 U de Antarctic Phosphatase (New England Biolab) e tampão da própria enzima diluído de acordo com informações do fabricante. A reação de desfosforilação foi incubada a 37 °C por 25 minutos e em seguida

interrompida a 65 °C por 5 minutos. O vetor desfosforilado foi posteriormente purificado com QUIAquick® PCR Purification Kit (Quiagen), conforme instruções do fabricante.

3.4.9 Purificação dos fragmentos de DNA de gel de agarose

Para realizar as etapas seguintes das subclonagens, os fragmentos de interesse previamente digeridos e desfosforilados foram excisados do gel de agarose. A excisão dos fragmentos de interesse contidos no gel foi realizada sobre um transluminador ultravioleta com o auxílio de uma lâmina cortante esterilizada. Os fragmentos foram purificados utilizando QUIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen), conforme instruções do fabricante.

3.4.10 Sequenciamento do DNA

As reações de seqüenciamento dos produtos da PCR e dos clones de interesse foram realizadas utilizando-se Big Dye™ Terminator v 3.1 (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante (Tabela 2). Em cada reação foram utilizados oligos específicos para cada fragmento na concentração final de 0,5 µM e 100 ng de produto da PCR ou 100-200 ng de DNA de plasmídeo. As amplificações foram realizadas no termociclador Biometra® programado para as seguintes condições: 96 °C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos. O produto da reação foi precipitado pela adição de 90 µl de isopropanol 66%, homogeneizado e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado por 20 minutos a 9700 x g, o precipitado foi lavado com etanol 70 % e centrifugado por 10 minutos a 9700 x g. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco por 10 minutos em temperatura ambiente e ressuspenso em 10 µl de formamida. As amostras foram sequenciadas no Sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems). As análises foram realizadas com auxílio do programa DNASTar (Lasergene).

Tabela 2- Sequência do oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento.

| Oligo | Sequência |
|------------------------|--------------------------------|
| M13 <i>F</i> | 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' |
| M13 <i>R</i> | 5'-GGAAACAGCTATGACCATTG-3' |
| MicroRec cDNA <i>F</i> | 5'-CATCACCAGGAGCTTTGCAC-3' |
| MicroRec cDNA <i>R</i> | 5'-TTAATGGTCGTGCTCATGGT-3' |
| Vg 100 <i>F</i> | 5'-GTATCACTTCTCGTTTTGG-3' |
| SV 40 100 <i>R</i> | 5'-GCATTGATTTTATGTTTCAG-3' |
| pMOS-sítios <i>F</i> | 5'-CAAACATCAATGTATCT-3' |
| pMOS-sítios <i>R</i> | 5'-ACGTGTGAACGGTGGTTTCA-3' |
| pJET1.2 <i>F</i> | 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' |
| pJET1.2 <i>R</i> | 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3' |

3.5 Obtenção e caracterização das linhagens transgênicas de *Aedes aegypti*

3.5.1 Microinjeção de ovos embrionados do mosquito *Aedes aegypti*

Fêmeas e machos adultos de *Aedes aegypti* foram mantidos em uma mesma gaiola por um período de 2 dias para a realização da cópula na proporção 1:1, sendo alimentados durante este período com sacarose 10%. Após 2 dias, as fêmeas da gaiola realizaram repasto sanguíneo em camundongos, sendo mantidos posteriormente com sacarose 3M (para que não ovipusessem no algodão) por um período de 3 a 8 dias. No dia da microinjeção, aproximadamente 12 fêmeas foram colocadas em um tubo de vidro contendo no fundo algodão molhado com água, recoberto por um disco de papel filtro também umedecido para a oviposição. Este tubo foi tampado com um pedaço de algodão seco e mantido no escuro por um intervalo de tempo de aproximadamente 1 hora. Após este período as fêmeas foram descartadas em outra gaiola vazia e o papel filtro foi recolhido e levado para uma lupa estereoscópica onde os ovos embrionados foram alinhados com a região posterior no mesmo sentido, sobre uma tira de papel filtro umedecida com água. Em seguida os ovos embrionados foram colados em uma lamínula com fita dupla face (Scotch 3M) previamente preparada. Os ovos embrionados foram dessecados sutilmente por cerca de 1 minuto e cobertos com óleo halocarbônico 27 (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e levados para o microscópio cirúrgico modelo S6E (Laica) para serem microinjetados no pólo posterior. A microinjeção foi realizada no

aparelho Fento-Jet da Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com um micromanipulador automático (Eppendorf). Foram utilizados capilares de vidro borossilicado (World Precision Instrument, Sarasota, Flórida, EUA) para a confecção das agulhas no aparelho da Sutter modelo P97 (Sutter Instrument Co., Novato, Califórnia, EUA) nas seguintes condições: no primeiro ciclo, aquecimento:391 /arranque:10 /velocidade: 10 /tempo:190; no segundo ciclo, aquecimento:391 /arranque:80 /velocidade:30 /tempo:130. As agulhas tiveram suas pontas aparadas no aparelho KT Brown Type micro-pipette beveler modelo BV-10 (Sutter) por 1 minuto. Os ovos embrionados foram microinjetados com uma mistura composta por 0,3 µg/µl de DNA do plasmídeo doador *pMOS* que contém o gene de interesse do trabalho e 0,2 µg/µl de DNA do plasmídeo auxiliador que contém a sequência codificadora da transposase responsável pela funcionalidade do plasmídeo *pMOS*. Esta mistura foi inserida na agulha com o auxílio de uma micropipeta (Eppendorf). Os ovos embrionados microinjetados foram transferidos para o papel filtro umedecido que revestia a parede interna de um Becker previamente preparado com algodão molhado com água no fundo. Este recipiente permaneceu em ambiente com temperatura e umidade controlada por 5 dias. Os ovos foram então colocados em um recipiente com água para eclosão das larvas. As pupas foram acondicionadas em copos individuais e após todos os adultos geração zero (G0) emergirem, foram montados os cruzamentos: 1 macho injetado para 10 fêmeas selvagens, 1 fêmea injetada para 1 macho selvagem. Após 5 dias foi oferecido repasto sangüíneo em camundongo. Os mosquitos foram mantidos com sacarose 3 M e passados mais 3 dias, dentro de cada copo foi colocado um recipiente contendo um pouco de água e pedaço de papel filtro revestindo a sua parede interna para que as fêmeas pudessem fazer a oviposição. Após alguns dias (aproximadamente 3 dias) a postura foi colocada em um recipiente com água para eclosão das larvas.

Em lupa estereoscópica com filtro para GFP, larvas da 1ª geração (G1) no estágio larval 4 (L4) foram analisadas para detectar a inserção do transgene no genoma através da expressão do gene marcador que codifica a proteína verde fluorescente eGFP nos olhos.

3.5.2 Extração de DNA genômico

Foram utilizados 6 mosquitos machos e 6 fêmeas para cada experimento de extração de DNA genômico. Em tubo de microcentrífuga utilizando um pistilo de plástico, os mosquitos foram macerados em 300 µl de tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 M EDTA pH 8, 0,5% SDS) até total homogeneização. Em seguida foram adicionados 20µg/ml de RNase, homogeneizado suavemente e incubado a 37 °C por 45 minutos. Posteriormente, adicionou-se 20 mg/ml de proteinase K, homogeneizando suavemente, sendo incubado a 65 °C por 3 horas. A amostra foi rapidamente resfriada e 600 µl de fenol equilibrado foram adicionados, sendo em seguida homogeneizada por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 6800 x *g* a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 500 µl de fenol/clorofórmio (1:1) ao sobrenadante, homogeneizado por 5 minutos à temperatura ambiente e novamente foi centrifugado a 6800 x *g* a 4 °C por 5 minutos. Ao sobrenadante coletado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga foram adicionados 400 µl de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugada nas mesmas condições anteriores. Mais uma vez o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga contendo 30 µl de acetato de sódio 3 M. À mistura foram adicionados 600 µl de etanol 100% (gelado), sendo homogeneizada e posteriormente incubada à -20 °C por 16 horas. Após período de incubação, a mistura foi centrifugada a 6800 x *g* por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 70% (gelado) por duas vezes. O sobrenadante da segunda centrifugação também foi descartado e o precipitado contendo o DNA foi seco a 50 °C. O DNA foi solubilizado em 100 µl de TE pH 8 (1 M Tris-HCl pH 8, 0,5 M EDTA pH 8).

3.5.3 RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) semiquantitativo

Todos os reagentes empregados foram adquiridos da empresa Invitrogen.

3.5.3.1 Extração de RNA total

Fêmeas e machos adultos de *Ae. aegypti* selvagens e transgênicos com 5 dias de idade foram mantidos em uma mesma gaiola por um período de 2 dias para a realização da cópula na proporção 1:1, sendo alimentados durante este período com sacarose 10%. Após 2 dias, antes que os mosquitos realizassem o repasto sanguíneo em camundongos, foram coletados 5 machos e 5 fêmeas de cada linhagem para extração de RNA total. Cada linhagem após o repasto sanguíneo e separação das fêmeas engurgitadas foi mantida com sacarose 10%. Após 2 dias, dentro de cada copo foi colocado um recipiente contendo um pouco de água e pedaço de papel filtro revestindo a sua parede interna para que as fêmeas pudessem fazer a oviposição. As amostras de RNA dos intervalos de tempo 24h, 48h, 72h e 96h após repasto sanguíneo foram coletadas e passados 4 dias da 1ª alimentação sanguínea, as fêmeas restantes realizaram um segundo repasto sanguíneo para reativar o transgene e amostras dos intervalos de tempo 24h, 48h, 72h e 96h após repasto sanguíneo foram coletadas. Foram utilizados 5 mosquitos por amostra para a extração de RNA total em um tubo de microcentrífuga contendo 500 µl de Trizol® (Invitrogen). Os mosquitos macerados com auxílio de um pistilo de plástico até total homogeneização foram incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. À mistura foram adicionados 100 µl de clorofórmio, sendo homogeneizada e centrifugada a 9700 x *g* por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados 250 µl de isopropanol 100%. Após homogeneização, a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 9700 x *g* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao material sedimentado foram adicionados 500 µl de etanol 75%. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 3800 x *g*. Após a centrifugação e descarte do sobrenadante, o sedimento contendo o RNA foi seco à temperatura ambiente e solubilizado em 20 µl de água DEPC (Dietilpirocarbonato) 0,1%.

3.5.3.2 Tratamento de RNA total com DNase

Ao RNA total extraído (2 µg) foi adicionada 1 U/µl de enzima DNaseI Amplification Grade (Invitrogen) e tampão próprio para a enzima de acordo com instruções do fabricante. A amostra foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, colocando em seguida no gelo para interromper a reação. Foi adicionado EDTA 25 mM, realizada

uma incubação de 10 minutos a 65 °C para inativar a enzima DNase e, posteriormente o RNA total tratado foi armazenado em -80 °C.

3.5.3.3 Síntese da 1ª fita de cDNA e PCR

Para iniciar a síntese da 1ª fita de cDNA, no tubo de microcentrifuga contendo o RNA total tratado, foi adicionado 0,2 µg/µl de oligo(DT)₁₂₋₁₈ (utilizado como iniciador da reação) e dNTPs (10mM). Após incubar por 5 minutos a 65 °C, o tampão da enzima SuperScript™II (transcriptase reversa) diluído 5 vezes em água DEPC e 0,1 M de DTT foram adicionados à amostra e incubados novamente por 2 minutos a 42 °C. Finalizada a incubação, adicionou-se 200 U/µl da enzima SuperScript™II seguido de incubação por 50 minutos a 42 °C. A enzima foi inativada a 70 °C por 15 minutos.

As ampliações pela PCR foram realizadas no termociclador Biometra® (Biometra) programado para as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 5 minutos seguidos de 25 ciclos de 95 °C por 50 segundos, anelamento a 60 °C por 50 segundos e extensão a 72 °C por 50 segundos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C (para amplificação do gene de bloqueio Micro); desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 20 segundos, anelamento a 55 °C por 20 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos (para amplificação do gene da actina e da vitelogenina). Foram utilizados oligos iniciadores da reação de acordo com o gene a ser amplificado.

Tabela 3- Sequência do oligonucleotídeos iniciadores das PCRs utilizados no RT-PCR.

| Construção | Oligo | Sequência | Tm °C | Fragmento |
|---------------------|--------------|--|-------|-----------|
| <u>Microplusina</u> | Malt_Micro F | 5'-CTCCTAGCAGGACTAACCACCGGGTTGGACTGGTGGC | 60 °C | 309 pb |
| | | ATCACCAGGAGCTTTG-3' | | |
| | Micro_NotI R | 5'-GCGGCCGCTTAATGGTCGTGCTCATG-3' | | |
| <u>Actina</u> | Actina F | 5'-GAGCGTGGCTACTCCTTCAC-3' | 55 °C | 350 pb |
| | Actina R | 5'-AGTTTCGTGGATACCGCAAG-3' | | |
| <u>Vitelogenina</u> | RT-PCR Vit F | 5'-TGAATTTGTACCCCGATC-3' | 55 °C | 151 pb |
| | RT-PCR Vit R | 5'-TTCAGGCTTGACCCATTCCTG-3' | | |

3.6 PCR quantitativo em tempo real

3.6.1 Determinação do número de cópias do transgene nas linhagens transgênicas

3.6.1.1 Quantificação de DNA genômico com PicoGreen®

O kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA foi utilizado para dosar DNA dupla fita presente nas amostras de DNA genômico. A dosagem é possível de ser realizada devido à característica do marcador fluorescente de se ligar a moléculas de DNA dupla fita. Para dosar o DNA dupla fita, obtivemos uma curva padrão através da diluição seriada de 5ng/ml a 50ng/ml de DNA de bacteriófago λ . As amostras de DNA genômico também foram preparadas em diluição seriada e em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ l do DNA padrão /ou DNA das amostras e 100 μ l da solução PicoGreen® (8 mM), além do controle (amostra sem DNA). O material foi incubado protegido da luz por 5 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, a intensidade da fluorescência foi lida em fluorímetro Accent (Labsystem) no comprimento de onda 355 nm para excitação e 538 nm para emissão, sendo construída uma curva padrão com os valores obtidos com o DNA padrão. As amostras de DNA genômico foram diluídas até caírem dentro da linearidade da curva padrão.

3.6.1.2 Construção de curva padrão com plasmídeo

Para um volume final de 25 μ l de reação de PCR, foram utilizados: MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, oligonucleotídeos iniciadores (oligos) 10 μ M (Tabela 4), dNTPs 0,4 mM, DNA molde 10 ng, Taq Polimerase 2,5 U e água ultra pura. A amplificação foi realizada no termociclador Biometra® (Biometra) programado para as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 5 minutos seguidos de 25 ciclos de 95 °C por 50 segundos, anelamento a 60 °C por 50 segundos e extensão a 72 °C por 50 segundos, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. O produto foi clonado em pJET1.2/blunt Cloning Vector (item 3.6.4). Para obtenção da curva padrão dos ensaios, a concentração do plasmídeo linearizado com 10 U da enzima de restrição *Xho*I foi utilizada no cálculo de número de cópias de acordo com a seguinte fórmula:

$$\left[\frac{\text{Xg}/\mu\text{l DNA}}{\text{tamanho do plasmídeo em pb} \times 660\text{g/mol}} \right] \times 6,023 \times 10^{23} \text{ cópias/mol} = Y \text{ cópias}/\mu\text{l}$$

A curva padrão foi construída utilizando diluições do plasmídeo (1, 10, 100, 1000 e 10000 cópias do gene de microplusina).

3.6.1.3 Reação de PCR quantitativo em tempo real

PCR quantitativo em tempo real foi realizado no aparelho Mastercycler® Eppendorf Realplex Real-Time PCR System (Eppendorf) em placa de 96 poços ABgene Thermo Scientific (Surrey, Inglaterra). As reações foram realizadas em um volume final de 20 μl , contendo 0,5 μM de cada oligo na concentração final (Tabela 4), 10 μl de SYBR® Green I (Quantimix Easy Syg Kit Biotools, Madri, Espanha) e 100 ng/ μl de DNA. Cada reação foi feita em triplicata, incluindo a curva padrão e controle negativo (reação sem cDNA). A reação foi iniciada pela ativação da enzima a 95 °C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação consistindo de 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 15 segundos de anelamento a 60 °C e 20 segundos de extensão a 68 °C. Foi adicionada uma etapa ao final de cada reação (*melting curve*) consistindo de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C e 15 segundos a 95 °C para análise da especificidade da reação.

As reações com DNA genômico foram realizadas com 100 ng/ μl de DNA. Sabe-se que a massa do genoma haplóide de *Aedes aegypti* (C-value) é 0,81 pg (<http://www.genomesize.com>) e este dado foi utilizado na seguinte fórmula para quantificar o número de cópias do gene de microplusina no genoma do mosquito transgênico:

$$\frac{\text{Xg de DNA genômico}}{\text{Xg genoma do mosquito}} = \text{n}^\circ \text{ de genomas presentes na reação}$$

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de cópias Real time}}{\text{n}^\circ \text{ de genomas}} = \text{n}^\circ \text{ de cópias do gene/genoma}$$

A análise dos dados foi realizada através do programa que acompanha o equipamento.

3.6.2 Determinação do número de cópias de transcritos do transgene nas linhagens transgênicas

3.6.2.1 Construção de curva padrão com plasmídeo

Para obtenção da curva padrão dos ensaios, a concentração do plasmídeo previamente linearizado foi utilizada no cálculo de número de cópias de acordo com a fórmula descrita no item 3.6.1.2.

A quantificação do número de cópias de transcritos foi obtida com a construção de curva padrão, utilizando diluições de plasmídeo (290×10^6 a 290 cópias para o plasmídeo contendo a microplusina; 222×10^6 a 222 cópias para o plasmídeo contendo a actina).

3.6.2.2 Reação de PCR quantitativo em tempo real

As reações foram realizadas em um volume final de 20 μ l, contendo 0,5 μ M de cada oligo na concentração final (Tabela 4), 10 μ l de SYBR® Green I (Quantimix Easy Syg Kit Biotools, Madri, Espanha) e 1 μ l de cDNA. Cada reação foi feita em triplicata, incluindo a curva padrão e controle negativo (reação sem cDNA). A reação foi iniciada pela ativação da enzima a 95 °C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação consistindo de 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 15 segundos de anelamento a 55 °C/60 °C (actina/microplusina) e 20 segundos de extensão a 68 °C. Foi adicionada uma etapa ao final de cada reação (melting curve) consistindo de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C e 15 segundos a 95 °C para análise da especificidade da reação.

Também foram realizadas amplificações para os transcritos de actina para confirmação da integridade das amostras de cDNA.

Tabela 4- Sequência do oligonucleotídeos iniciadores utilizados em PCR quantitativo em tempo real.

| Construção | Oligo | Sequência | Tm °C | Fragmento |
|--------------|--------------------|-----------------------------|-------|-----------|
| Microplusina | Micro Real Time F | 5'-CTCAACCGTGCTTGTGCCTA-3' | 60°C | 150 pb |
| | Micro Real Time R | 5'-TTAATGGTCGTGCTCATGGT-3' | | |
| Actina | Actina Real Time F | 5'-ATTGCTCCACCAGAACGTAAA-3' | 55°C | 151 pb |
| | Actina Real Time R | 5'-CAGGATTAACCTAGAAGCACT-3' | | |

3.6.3 Obtenção de hemolinfa

A hemolinfa foi coletada individualmente de 30 fêmeas transgênicas e 30 fêmeas selvagens (5 a 7 dias de idade) 24h e 36h após o repasto sanguíneo em camundongos anestesiados, em dois ciclos gonotróficos seguidos. Os mosquitos foram anestesiados em gelo e os primeiros pares anteriores de pernas foram arrancados. Em seguida foi injetado no tórax de cada fêmea com auxílio de agulhas confeccionadas a partir de capilares de vidro borossilicado (World Precision Instrument) aproximadamente 2 μ L de tampão PBS 1X ((NaHPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 2mM, pH 7, NaCl 140 mM). A hemolinfa das 30 fêmeas transgênicas foi coletada em um mesmo capilar de 10 μ L contendo uma solução de inibidores ProteoBlock™ Protease Inhibitor Cocktail (Fermentas), transferida para um tubo de microcentrífuga e armazenadas imediatamente a -80 °C. O mesmo procedimento foi realizado com as 30 fêmeas selvagens.

3.6.4 Cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) acoplada a um espectrômetro de massas para análise da hemolinfa de fêmeas *Aedes aegypti* transgênicas

Amostras de microplusina recombinante foram utilizadas como padrão para confirmação de seu perfil ESI-MS e padrão de fragmentação. Para análise da massa molecular utilizou-se o software BioWorks Browser 3.3 (Thermo Electron Corp.). As amostras de hemolinfa coletadas de um *pool* de 30 mosquitos foram dessalinizadas em micro colunas (*Zip-Tip*) com resina C₁₈ (10 μ m, Vydac, EUA) antes das análises de espectrometria de massas, sendo utilizada uma solução acetonitrila 80% / ácido trifluoroacético 0,05% para a eluição das proteínas. As amostras foram secas em centrífuga a vácuo, ressuspendidas em 12 μ L de solução 5% Acetonitrila / 0,2% Ácido fórmico e submetidas à cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). A RP-HPLC foi realizada em colunas capilares C₁₈ (100 μ m x 25 cm) em um aparelho tipo *ion trap* Thermo Finnigan, modelo LCQ Duo™ (Thermo Quest, EUA), equipado com uma nano-fonte de ionização do tipo “eletro-spray” (ESI-MS) e acoplado a um cromatógrafo líquido do tipo nano-HPLC modelo Ultimate LC Packings (Dionex Company, Amsterdam, Holanda). A calibração do equipamento foi realizada com soluções de cafeína (relação massa/carga (m/z) = 192,5), MRFA (m/z = 524,3) e Ultramark (m/z com valores de 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 e 1922). O equipamento operou no modo de ionização positivo com

potencial de “eletro-spray” ajustado para 1.8 kV e temperatura do capilar aquecido ajustada para 180 °C. A cromatografia foi realizada sob um fluxo de 2 µL/min com gradiente de acetonitrila em ácido fórmico 0,2% variando de 5% a 80% em 60min.

No espectrômetro de massas foi utilizado um método de dois eventos: primeiro evento *full scan* coletado do m/z 1000 ao m/z 2000 e segundo evento SRM (“Selected Reaction Monitoring”) que consistiu em selecionar o m/z 1458, fragmentar com energia de colisão 25% e monitorar os íons produto com os valores de m/z 1516, 1675, 1819 e janela de detecção de 1 m/z. Os dados foram coletados com o software Xcalibur® 2.0 (Thermo Electron Corp.).

Em cada amostra de hemolinfa de fêmeas selvagens foi adicionado 0,25 pmoles, 2,5 pmoles e 25 pmoles de microplusina recombinante para determinar o limite de detecção do método.

3.6.5 Experimento de bloqueio da infecção de Plasmodium gallinaceum em mosquitos transgênicos

Foram elaborados dois desenhos experimentais onde fêmeas transgênicas e selvagens realizaram um ou dois repastos sanguíneos, com o propósito de analisar o efeito da expressão da microplusina sobre esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum*. Inicialmente um grupo de fêmeas transgênicas e selvagens de *Aedes aegypti* com 5 dias de idade e copuladas realizaram o repasto sanguíneo simultaneamente em pintainho *Gallus gallus domesticus* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

No primeiro desenho experimental, as fêmeas realizaram um único repasto sanguíneo (infectado) e no 8º dia após o repasto sanguíneo, foram dissecados pares de glândulas salivares, quebradas individualmente em 10µl de PBS e o número de esporozoítas foi determinado sob microscopia de fase em câmara de Neubauer.

No segundo desenho experimental, 2 dias após o repasto sanguíneo (infectado), foi colocado dentro de cada copo onde os mosquitos estavam armazenados um recipiente contendo um pouco de água e pedaço de papel filtro revestindo a sua parede interna para que as fêmeas pudessem fazer a oviposição. No 5º dia as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo em pintainho *Gallus gallus domesticus* não infectado e no 8º dia após o repasto sanguíneo infectado, foram dissecados pares de glândulas salivares, quebradas individualmente em 10µl de PBS e o número de esporozoítas foi determinado sob microscopia de fase em câmara de Neubauer.

3.6.6 Fitness de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos da linhagem pMOS[3xP3-eGFP-Micro] PM2

3.6.6.1 Longevidade

Para verificar a longevidade, fêmeas transgênicas de 1 dia de idade foram agrupadas e mantidas em gaiola. O mesmo foi feito para fêmeas selvagens, machos transgênicos e selvagens. Os mosquitos foram alimentados com sacarose 10% e a mortalidade foi observada todos os dias até que todos tivessem morrido. A observação da longevidade foi realizada em duplicata.

3.6.6.2 Fecundidade e fertilidade

Foram preparados cruzamentos de fêmeas transgênicas heterozigotas com machos selvagens, fêmeas selvagens com machos transgênicos heterozigotos e fêmeas e machos selvagens na proporção de indivíduos 1:1. Machos e fêmeas copularam por 2 dias e após este período, as fêmeas realizaram repasto sanguíneo de 30 minutos em camundongo anestesiado. Os mosquitos foram anestesiados em gelo para separação dos ingurgitados, mantendo-os com sacarose 3 M. No 3º dia após alimentação sanguínea as fêmeas foram novamente anestesiadas em gelo e colocadas individualmente em um tubo de vidro contendo no fundo algodão molhado com água, recoberto por um disco de papel filtro também umedecido para a oviposição. Este tubo foi tampado com um pedaço de tecido filó preso por elástico e os mosquitos foram mantidos com sacarose 3 M em estufa com temperatura média de 26 °C e 60% de umidade relativa do ar. No dia seguinte, as fêmeas foram retiradas dos tubos e os ovos contidos no disco de papel filtro e nas paredes do tubo foram contados. As fêmeas que não ovipuseram neste intervalo de tempo ou morreram foram consideradas estéreis. Após a contagem e secagem dos ovos, as posturas foram colocadas em recipientes plásticos individuais contendo o mesmo volume de água e quantidade de ração para a eclosão das larvas. Passados mais 5 ou 6 dias o número de larvas que eclodiram foi determinado.

3.7 Análise estatística

Nos experimentos de real time foi utilizado o teste t (Student) e ANOVA. Para os experimentos relacionados à análise do efeito da microplusina no bloqueio da transmissão de *Plasmodium gallinaceum* em mosquitos transgênicos infectados utilizamos o teste Mann-Whitney. Os parâmetros biológicos (*fitness*) foram analisados com o teste Mann-Whitney. A comparação entre os dados experimentais foi considerada significativa quando a probabilidade de igualdade era menor que 5% ($p \leq 0,05$) no intervalo de confiança (IC) de 95%. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, (GraphPad Software, San Diego California USA).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Etapas da construção do transgene AeVg-Malt-Micro

Etapa 1:

Ao cDNA que codifica a microplusina foi adicionado o peptídeo sinal de secreção de *Aedes aegypti Maltase-like I* (JAMES et al., 1989). Para isso a PCR foi realizada em duas etapas para a inserção da sequência correspondente ao peptídeo sinal da *Maltase-like I* de *Aedes aegypti* e as seqüências dos sítios de restrição *NotI* e *BglII* que auxiliaram na clonagem no plasmídeo de vitelogenina (Figura 3).

Etapa 2:

A construção maltase-microplusina foi inserida no plasmídeo pSLfa que já continha a sequência promotora e 5' UTR do gene de vitelogenina de *Aedes aegypti* que é altamente ativada após a alimentação sangüínea (KOKOZA et al., 2001) e a sequência 3'UTR do vírus SV40, cuja função é dar estabilidade ao mRNA (KOKOZA et al., 200) (Figura 3).

Etapa 3:

O transgene AeVg-malt-micro foi inserido no vetor doador *pMos* [3xP3-eGFP], que contém a sequência do elemento de transposição *mariner* para a inserção do transgene no genoma do *Aedes aegypti*, além do gene marcador composto pelo promotor de olhos 3xP3 que direciona a expressão da proteína fluorescente eGFP para os olhos dos indivíduos transformados (Figura 3).

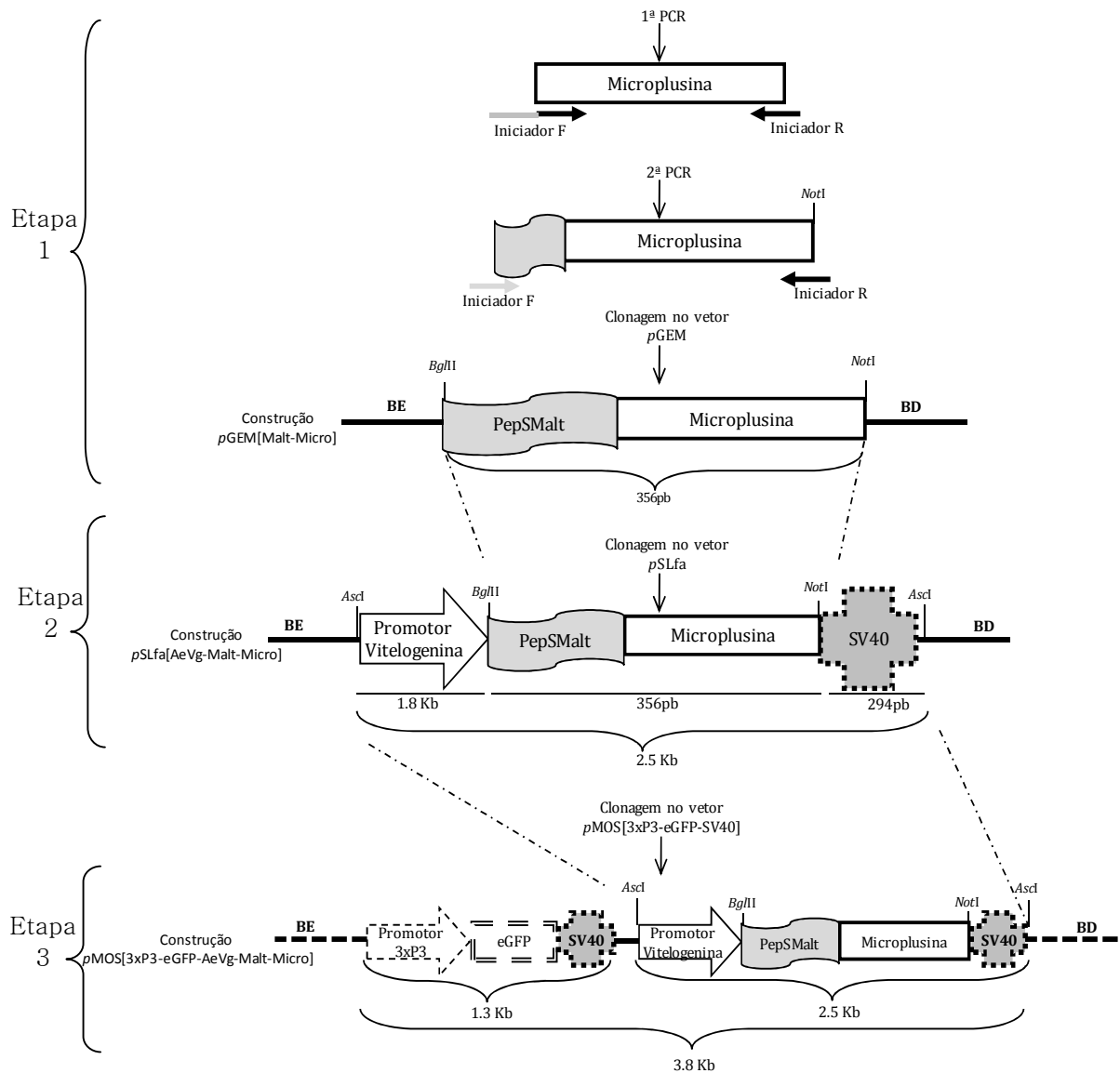


Figura 3. Representação esquemática da estratégia de clonagem do peptídeo microplusina recombinante em vetores de clonagem.

NotI, BglII, Ascl: sítios para enzimas de restrição; **BE:** braço esquerdo do vetor de clonagem; **BD:** braço direito do vetor de clonagem; **PepSMalt:** peptídeo sinal da *Maltase-like 1*; **SV40:** 3' UTR do vírus SV40; **eGFP:** sequência da proteína verde fluorescente eGFP; **3xP3:** promotor de olho.

4.1.1 Amplificação da sequência codificadora do peptídeo microplusina por PCR

O plasmídeo pRSET A (Invitrogen) contendo a sequência codificadora original do peptídeo microplusina foi gentilmente cedido pela Dr^a Sirlei Daffre e utilizado como molde na PCR. Devido a sequência de DNA que codifica o peptídeo sinal *Maltase-like I* de *Aedes aegypti* (66 pb) ser muito grande para ser inserida em um único oligo, a PCR foi realizada em duas etapas a fim de inserir a sequência do peptídeo sinal a porção de interesse referente ao peptídeo maduro microplusina com 273 pb (Figura 4).



Figura 4. Esquema das amplificações pela PCR.

Amplificações realizadas em duas etapas. 1^a PCR: adição da porção 3' terminal do peptídeo sinal *Maltase-like I* e o sítio de restrição *NotI* na sequência codificadora da Micro. 2^a PCR: adição do sítio de restrição *BglII* e da porção 5' terminal do peptídeo sinal *Maltase-like I*.

Na 1^a etapa foi adicionada a porção 3' terminal do peptídeo sinal *Maltase-like I* e o sítio de restrição *NotI* à sequência codificadora do peptídeo microplusina. Na 2^a etapa foi adicionada a sequência correspondente ao sítio de restrição *BglII* e a porção 5' terminal do peptídeo sinal *Maltase-like I*, resultando em um fragmento em torno de 356 pb (Figura 5). Os produtos das amplificações foram purificados antes de serem inseridos nos plasmídeos de clonagem.

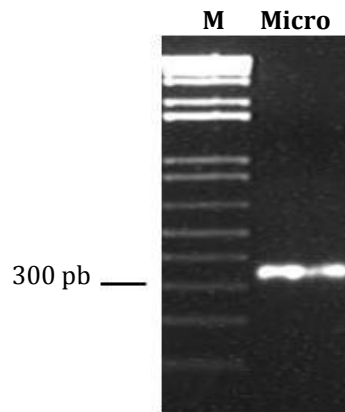


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado através da PCR. A sequência codificadora da microplusina foi amplificado pela PCR e o produto da reação submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X, evidenciado com brometo de etídeo. **M:** marcador de pares de bases (1 Kb plus- Invitrogen). **Micro:** peptídeo recombinante microplusina.

4.1.2 Clonagem da sequência codificadora do peptídeo recombinante no vetor *pGEM[®]-T*

O produto da amplificação do peptídeo recombinante microplusina foi purificado e ligado nas extremidades do plasmídeo *pGEM[®]-T Vector* (Invitrogen), exemplificado no esquema da Figura 6.

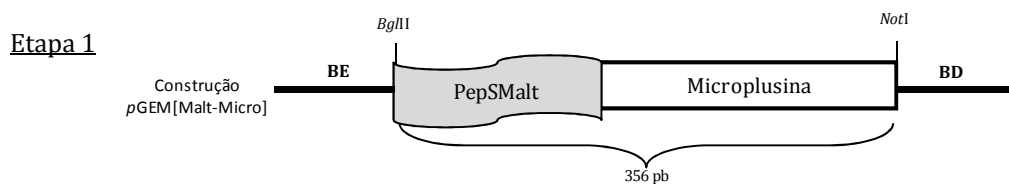


Figura 6. Esquema inserção do produto da PCR no vetor de clonagem *pGEM*. **PepSMalt:** peptídeo sinal *Maltase-like I*; **BglII, NotI:** sítios de clivagem das enzimas de restrição; **BD:** braço direito do vetor; **BE:** braço esquerdo do vetor.

Posteriormente foi então transformado em linhagem de *E.coli* DH10B, gerando a construção *pGEM[Micro]*. O DNA do plasmídeo foi purificado, digerido com as enzimas de restrição *BglII* e *NotI* para excisão do inserto e então submetido a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A Figura 7 mostra dois produtos no perfil eletroforético, evidenciados por brometo de etídeo. O primeiro (~3 Kb) corresponde ao

plasmídeo pGEM-T Vector (Invitrogen) linearizado, e o segundo correspondente ao inserto possuindo em torno de 356pb.

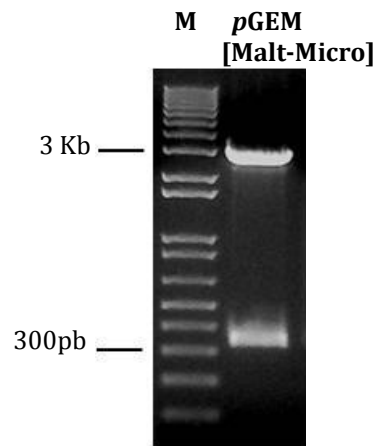


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão de DNA do vetor de clonagem pGEM. O DNA do plasmídeo da construção foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Not*I, submetido a eletroforese e evidenciado com brometo de etídeo; **M**: marcador de pares de bases (1Kb plus- Invitrogen).

Antes de prosseguir com as subclonagens, o clone selecionado pelo padrão da enzima de restrição foi submetido à reação de sequenciamento. A Figura 8 comprova que integridade da sequência do inserto foi mantida quando comparada com sua respectiva sequência predita.

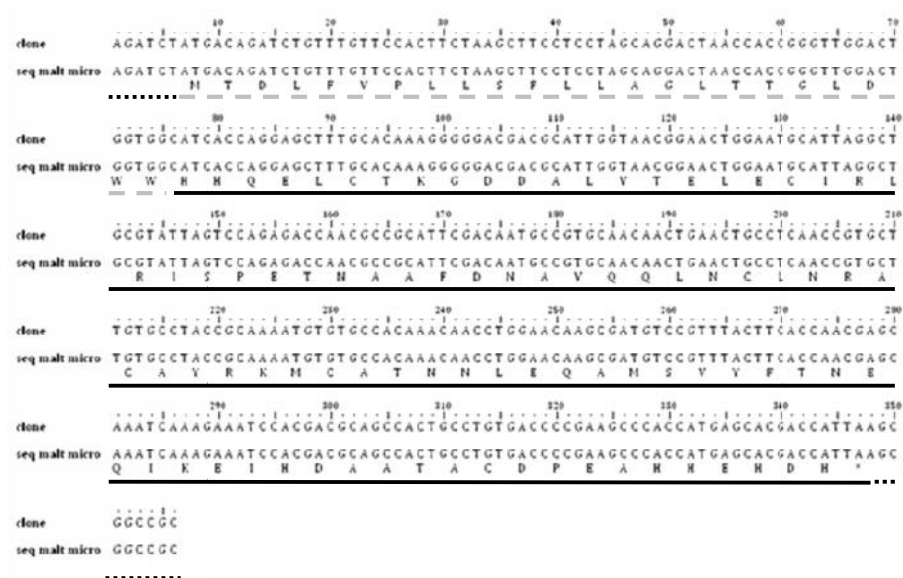


Figura 8. Sequência de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos do clone pGEM[Malt-Micro]. A sequência de nucleotídeos do clone pGEM[Malt-Micro] foi alinhada a sua sequência predita (seq malt micro) para comparação. **Linha preta pontilhada:** sequência dos sítios de restrição *Bgl*III e *Not*I; **linha cinza tracejada:** peptídeo sinal *Maltase-like 1*; **linha preta contínua:** peptídeo microplulina.

4.1.3 Clonagem do peptídeo recombinante microplusina no vetor de clonagem *pSLfa[AeVg]*

A microplusina recombinante foi subclonada no vetor de clonagem *pSLfa[AeVg]* (plasmídeo cedido pelo Prof. Alexandre Rhaikel, da Universidade da Califórnia, Riverside, Califórnia, EUA). Este vetor contém a região reguladora 5' UTR da vitelogenina e sequência do promotor de vitelogenina de *Aedes aegypti*, responsável pela ativação do peptídeo recombinante após a alimentação sanguínea, além de também conter a sequência nucleotídica da região reguladora 3'UTR do vírus SV40, cuja função é dar estabilidade ao mRNA (Figura 9).

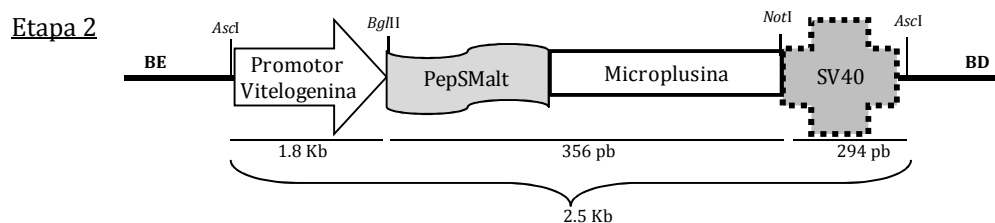


Figura 9. Esquema da clonagem no vetor *pSLfa[AeVg-SV40]*.

Construção *pSLfa[AeVg-Malt-Micro]* resultante da inserção do cDNA Mal-micro no vetor de clonagem *pSLfa[AeVg]*. **PepSMalt**: peptídeo sinal *Maltase-like I*; **SV40**: 3' UTR do vírus SV40; **AscI**, **BglIII**, **NotI**: sítios de clivagem das enzimas de restrição.

O DNA do plasmídeo *pGEM* contendo a microplusina recombinante foi submetido à reação de digestão com a enzima *BglIII* e *NotI* (Figura 7) e o fragmento de tamanho esperado (~356 pb) foi excisado e purificado do gel com o QIAquick® Gel Extraction KIT segundo o protocolo do fabricante. O fragmento purificado foi ligado nas extremidades do vetor clonagem *pSLfa[AeVg]* entre a sequência promotora de vitelogenina de *Ae. aegypti* e a sequência 3'UTR do vírus SV40. Após a ligação, a linhagem de *E.coli* DH10B foi transformada gerando a construção *pSLfa[AeVg-Malt-Micro]*. A Figura 10A mostra o produto da digestão do DNA de plasmídeo gerado, digerido com as enzimas *BglIII* e *NotI*. No gel pode ser observado um produto correspondente a vetor *pSLfa[AeVg]* em torno de 5.6 Kb e um que corresponde ao inserto liberado que possui aproximadamente 356 pb. Após a confirmação por sequenciamento da construção do transgene [*AeVg-Malt-Micro*] (Figura 10), o DNA de plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição *AscI*, excisando todo o transgene. A digestão foi analisada em gel de agarose 1%, onde podemos observar um produto com aproximadamente 3.4 Kb, referente ao plasmídeo *pSLfa* e outro em torno de 2.4 Kb, correspondente ao transgene (Figura 10B).

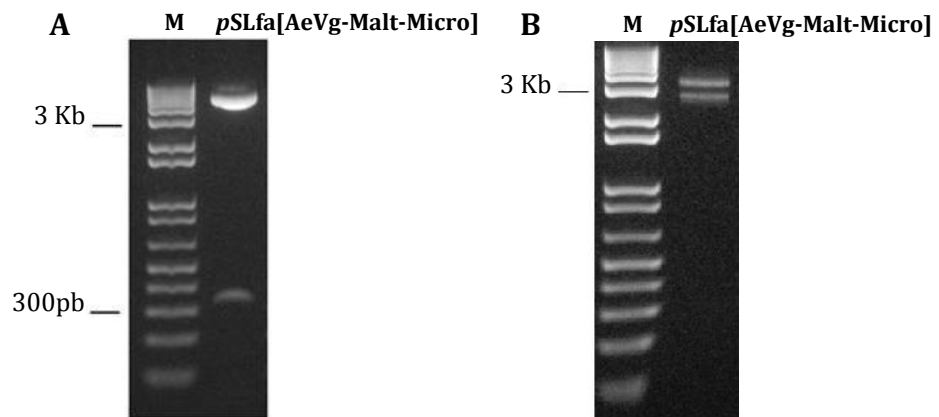


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA da construção *pSLfa[AeVg-Malt-Micro]*.

A: DNA de plasmídeo da construção *pSLfa[AeVg-Malt-Micro]* digerido com as enzimas de restrição *BglII* e *NotI*. **B:** DNA de plasmídeo da construção *pSLfa[AeVg-Malt-Micro]* digerido com a enzima de restrição *AscI* para completa excisão do transgene. Os produtos das digestões foram submetidos à eletroforese e evidenciados com brometo de etídeo. **M:** marcador de pares de bases (1 Kb plus- Invitrogen).

O clone da construção *pSLfa[AeVg-Malt-Micro]* selecionado pelo padrão da enzima de restrição foi sequenciado antes de iniciarmos a clonagem final no vetor *pMOS[3xP3-eGFP]*. Não foi observada nenhuma mutação na sequência do clone *pSLfa[AeVg-Malt-Micro]* (Figura 11) após comparação com sua respectiva sequência predita.

4.1.4 Inserção do transgene no vetor de transgênese *pMOS[3xP3-eGFP]*

O transgene [AeVg-Malt-Micro] foi subclonado no vetor de transgênese *pMOS[3xP3-eGFP]* que contém as sequências do elemento de transposição *mariner* e o gene marcador, composto pelo promotor de olhos 3xP3 que direciona a expressão da proteína fluorescente eGFP (Figura 12).

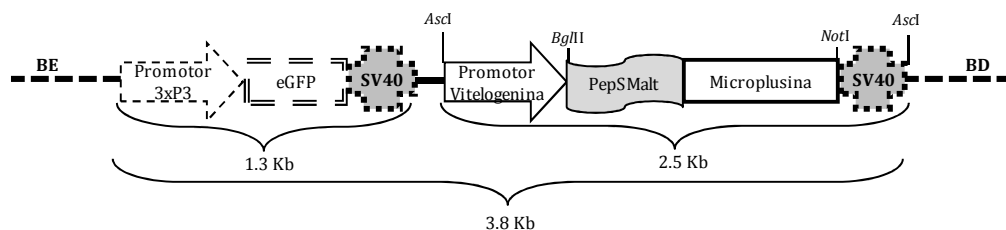


Figura 12. Esquema da construção final *pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]*.

Construção final do transgene: sequência 5' UTR e sequência promotora do gene de vitelogenina de *Aedes aegypti* (representada pela seta branca grande); sequência do peptídeo sinal da *Maltase-like 1* de *Aedes aegypti* (representada pelo retângulo cinza); sequência codificadora do peptídeo microplusina (representada pelo retângulo branco); sequência 3'UTR do vírus SV40 (representada pela cruz pontilhada). O transgene está inserido entre os braços esquerdo (BE) e direito (BD) do elemento de transposição que possui o promotor de olho 3xP3 (representado pela seta grande tracejada); sequência da proteína verde fluorescente eGFP (representada pelo retângulo tracejado); sequência 3' UTR do vírus SV40 (representada pela cruz pontilhada).

O DNA do plasmídeo *pMOS[3xP3-eGFP]* foi transformado por eletroporação em linhagem de *E. coli* DH5 α e após ser recuperado pela purificação de DNA de plasmídeo, foi linearizado com a enzima de restrição *AsclI*. Para prevenir que o plasmídeo religasse após a restrição, *pMOS[3xP3-eGFP]* foi tratado com a enzima fosfatase alcalina (Antartic phosphatase - New England Biolabs) para desfosforilar a região 5' UTR dos braços do vetor.

O DNA de plasmídeo da construção *pSLfa[AeVg-Malt-Micro]* foi linearizado com a enzima de restrição *AsclI*. Em seguida, o fragmento de aproximadamente 2.5 Kb foi excisado e purificado do gel com o QIAquick[®] Gel Extraction KIT segundo o protocolo do fabricante. O DNA purificado foi então ligado nos braços do vetor *pMOS[3xP3-eGFP]* e após a ligação, a linhagem de *E. coli* DH10B foi transformada por eletroporação, gerando a construção *pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]*. A Figura 13 mostra o produto da digestão da construção, digerida com a enzima *AsclI*. No gel de agarose 1%, visualizamos

uma banda superior cujo peso molecular em torno de 5.5 Kb corresponde ao vetor *pMOS[3xP3-eGFP]* e uma banda inferior, correspondente ao peso molecular esperado para o inserto liberado que possui em torno 2.5 Kb.

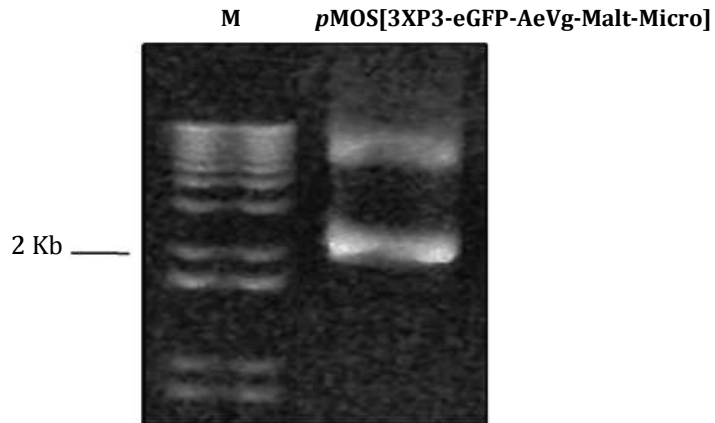


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA do transgene *pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]*.

O DNA do plasmídeo da construção *pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]* foi digerido com a enzima de restrição *AscI*, submetido a eletroforese e evidenciado com brometo de etídeo. **M:** marcador de pares de bases (1 Kb plus- Invitrogen).

A construção final foi novamente sequenciada para assegurar que não ocorreram mutações em sua sequência durante todo o processo. Não foi observada nenhuma mutação na sequência consenso do clone *pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]* (Figura 14) após comparação com sua respectiva sequência predita.

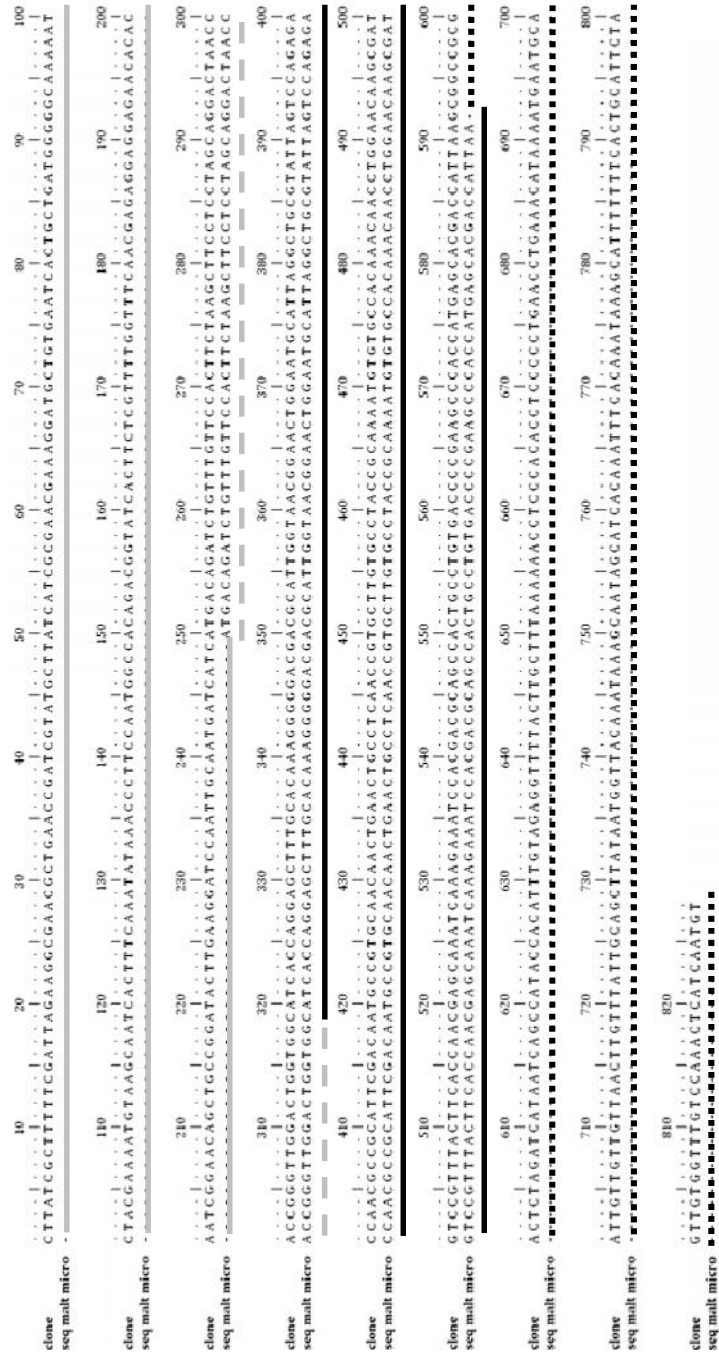


Figura 14. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do transgene *pMOS[3XP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]*. A sequência consenso do clone *pMOS[3XP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]* foi alinhada a sua sequência predita (*seq malt micro*) para comparação. **Linha cinza contínua:** porção 3' terminal do promotor da vitelogenina; **linha cinza tracejada:** peptídeo sinal *Maltase-like 1*; **linha preta contínua:** microplusina; **linha preta pontilhada:** porção 5' terminal da região 3' UTR do vírus SV40.

4.2 Obtenção das linhagens transgênicas de *Aedes aegypti*

4.2.1 Microinjeção de ovos embrionados de *Aedes aegypti* para obtenção de mosquitos transgênicos

Ovos embrionados de *Aedes aegypti* foram microinjetados com a utilização do sistema bipartido, onde são utilizados dois plasmídeos: o plasmídeo doador *pMOS*[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro] que contém as sequências invertidas do elemento de transposição *mariner* (COATES et al., 1998) flanqueando os dois genes a serem introduzidos no genoma dos mosquitos, o gene marcador 3xP3-eGFP que, quando expresso nos insetos transgênicos, produz fluorescência verde nos olhos e o gene *AeVg-Malt-Micro*, nossa construção efetora para esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum*; e o plasmídeo auxiliador que contém o gene HS70-Transposase que codifica a transposase *mariner* cuja função é reconhecer os elementos invertidos de transposição. O promotor HS70 tem a sequência mínima promotora e não necessita do *heat shock* para o seu funcionamento.

Ao todo foram injetados com o plasmídeo *pMOS*[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro] 752 ovos embrionados, sendo obtidos 83 pupas G0 que chegaram a fase adulta. As pupas foram acondicionadas em copos individuais até todos os adultos G0 emergirem. Foram montados 43 famílias de machos (1 macho injetado para 10 fêmeas selvagens) e 2 *pools* de fêmeas (1 fêmea injetada para 1 macho selvagem), para obtenção da geração 1 (G1). Foram analisadas 5.189 larvas no estágio larval 4 G1 em lupa estereoscópica com filtro para GFP, das quais 46 expressaram o gene marcador eGFP. As análises resultaram em 4 linhagens (**PM2, PM4, PM5, PF6**) positivas (Tabela 5), onde foi possível visualizar a expressão do eGFP nos olhos em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito, ou seja, larva, pupa e adulto (Figura 15 A, B, C, respectivamente), sendo que na fase larval também foi observada a expressão nas papilas anais.

Tabela 5- Número de ovos embrionados microinjetados, número de adultos G0, número de larvas analisadas e larvas positivas para a expressão de eGFP e número de linhagens transgênicas obtidas com a construção *pMOS[3xP3-eGFP-Micro]*.

| CONSTRUÇÃO | OVOS EMBRIONADOS MICROINJETADOS | ADULTOS G0 | LARVAS ANALISADAS G1 | LARVAS POSITIVAS (eGFP) G1 | LINHAGENS TRANSGÊNICAS |
|--|---------------------------------|------------|----------------------|----------------------------|------------------------|
| <i>pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]</i> | 752 | 83 | 5189 | 46 | 4 |

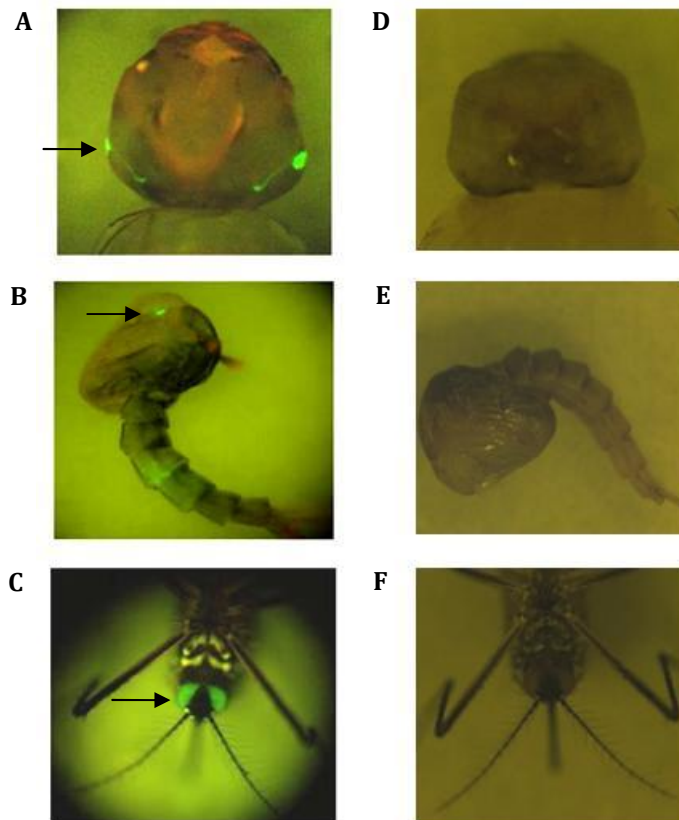


Figura 15. Visualização da expressão do gene marcador (eGFP) na G1 de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos *pMOS [3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]*.

Os três estágios de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* foram analisados em lupa estereoscópica com filtro para GFP. **A:** larva L4 transgênica; **B:** pupa transgênica; **C:** adulto transgênico; **D:** larva L4 selvagem; **E:** pupa selvagem; **F:** adulto selvagem.

4.3 Caracterização das linhagens transgênicas de *Aedes aegypti*

4.3.1 PCR de DNA genômico para amplificação do gene marcador e do gene de bloqueio em linhagens *pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]* de *Aedes aegypti*

Utilizando oligos iniciadores específicos para o gene marcador e o transgene, e o DNA genômico extraído das 4 linhagens *pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]* **PM2**, **PM4**, **PM5** e **PF6** como molde para as PCRs, conseguimos confirmar a integração do nosso transgene (Figura 16). Esta integração foi determinada com a visualização em gel de agarose do produto da amplificação do gene marcador eGFP em torno de 964 pb e do transgene AeVg-Malt-Micro com tamanho em torno de 356 pb nas quatro linhagens (Figura 17). Como controle negativo utilizamos DNA genômico de mosquitos *Aedes aegypti* selvagens, cujo material não amplificou nenhum dos genes anteriormente citados e como controle da integridade do material extraído realizamos a PCR para o gene de actina, amplificando um fragmento em torno de 350 pb (Figura 17).



Figura 16. Esquema geral do transgene AeVg-Malt-Micro.

Linha preta contínua inferior: região amplificada do gene marcador; **linha preta pontilhada inferior:** região amplificada do transgene.

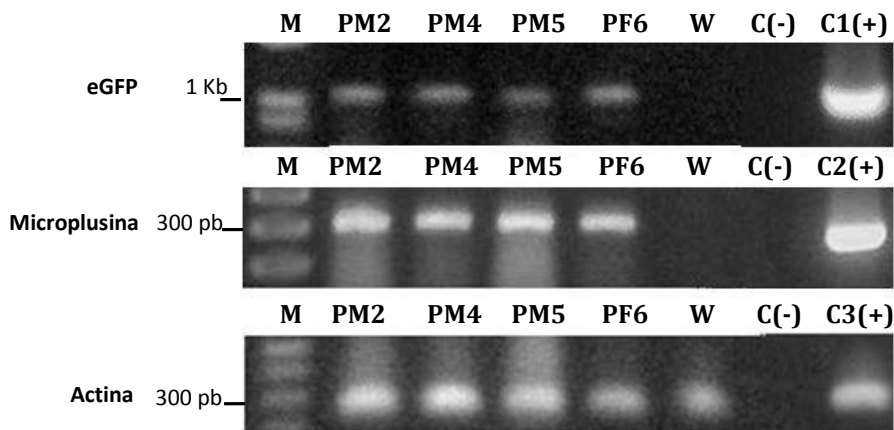


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de DNA genômico de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos e selvagens.

DNA genômico de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos *pMOS[3xP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]* **PM2**, **PM4**, **PM5**, **PF6** e selvagens foram submetidos à PCR para a amplificação dos genes: eGFP, microplusina e actina. Os produtos da reação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e corados com brometo de etídeo. **M:** marcador de pares de bases (1Kb plus- Invitrogen); **PM2**, **PM4**, **PM5**, **PF6:** linhagens transgênicas; **W:** mosquitos selvagens; **C(-):** ausência de DNA; **C1(+):** *pMOS[3xP3-eGFP]*; **C2(+):** *pRSET A[micro]*; **C3(+):** DNA genômico de *Aedes aegypti*.

O DNA genômico extraído das linhagens transgênicas foi quantificado com PigoGreen® e o número de cópias do gene de microplusina foi determinado com PCR quantitativo em tempo real através da construção da curva padrão com diluição seriada do DNA de plasmídeo (1, 100, 1.000, 10.000 cópias do gene). Os resultados indicaram que a linhagem **PM5** possui 6 cópias do transgene, a linhagem **PM2** possui 3 cópias, enquanto as linhagens **PM4** e **PF6** possuem 2 cópias do transgene.

4.3.2 Análise do perfil de transcrição do RNA mensageiro (mRNA) de microplusina utilizando RT-PCR semi quantitativo

As amostras de RNA total extraído de fêmeas *Ae. aegypti* selvagens e das linhagens transgênicas **PM2**, **PM4**, **PM5** e **PF6** antes (sacarose) e após o repasto sanguíneo (24, 48, 72 e 96 horas) 1º e 2º ciclo gonotrófico e machos, foram tratadas com DNase e usadas como mole na síntese da 1ª fita de cDNA, que por sua vez serviu de molde para as reações de RT-PCR. Foi analisado o perfil transcricional do mRNA para os genes vitelogenina (gene endógeno), microplusina e actina em todas as amostras coletadas. Utilizando cDNA selvagem, verificamos se os oligos correspondentes a microplusina eram específicos para este transgene. Como esperado não houve amplificação para microplusina, confirmando a inexistência do gene (Figura 18). Ao utilizarmos oligos específicos para vitelogenina, observamos uma banda de grande intensidade na amostra 24 horas tanto no 1º quanto no 2º ciclos gonotróficos e redução na intensidade das bandas correspondentes ao mesmo fragmento nas amostras 48, 72 e 96 horas (Figura 18). A actina, gene constitutivo, foi utilizada como controle positivo das amostras de cDNA (Figura 18 e 19).

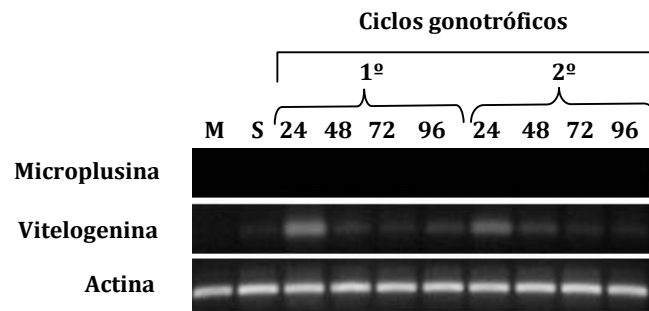


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR cDNA sintetizado a partir de mRNA de mosquitos selvagens foram submetidos à PCR para a amplificação dos transcritos dos genes: microplusina, vitelogenina e actina. Os produtos da reação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e corados com brometo de etídeo. **M:** macho; **S:** fêmea alimentada com sacarose; **24, 48, 72, 96:** horas após repasto sanguíneo.

O perfil transcricional do mRNA para o gene de vitelogenina nas linhagens transgênicas **PF6, PM5, PM4** e **PM2** mostrou um padrão de transcrição semelhante ao observado anteriormente em mosquitos selvagens, com a presença de uma intensa banda correspondente as amostras 24h tanto no 1º quanto no 2º ciclos gonotróficos e redução na intensidade das bandas 48h, 72h e 96h (Figura 19). Na Figura 17 podemos observar que quando utilizamos oligos específicos para o gene de microplusina, nas 4 linhagens transgênicas analisadas há uma intensa banda para 24h nos dois ciclos gonotróficos, mostrando que o transgene é fortemente ativado após o repasto sanguíneo.

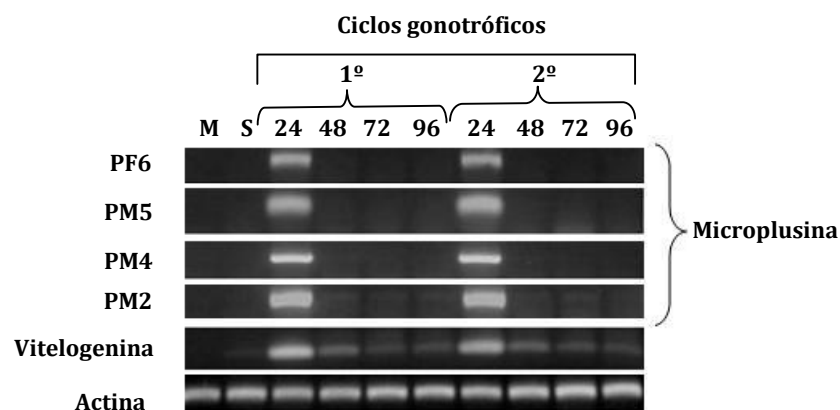


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de cDNA sintetizados de mRNA de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos. cDNA sintetizado a partir de mRNA das linhagens de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos (**PM2, PM4, PM5, PF6**) foram submetidos à PCR para a amplificação dos transcritos dos genes: microplusina, vitelogenina e actina. Os produtos da reação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X e corados com brometo de etídeo. **M:** macho; **S:** fêmea alimentada com sacarose; **24, 48, 72, 96:** horas após repasto sanguíneo.

4.3.3 Quantificação absoluta por PCR em tempo real de mRNA de microplusina

Com o intuito de determinar com mais detalhe o perfil transcricional de microplusina em amostras de cDNA sintetizados a partir de RNA total extraído de fêmeas das quatro linhagens transgênicas **PM2**, **PM4**, **PM5** e **PF6**, antes (sacarose) e após o repasto sanguíneo (24, 48, 72 e 96 horas) durante o 1º e 2º ciclo gonotrófico. Fizemos uso da quantificação absoluta de mRNA por PCR quantitativo em tempo real. A curva padrão foi construída com diluições seriadas do plasmídeo linearizado contendo a sequência da microplusina e a análise dos dados foi realizada através do programa que acompanha o aparelho Mastercycler® Eppendorf Realplex Real-Time PCR System (Eppendorf).

4.3.3.1 PCR quantitativo em tempo real da linhagem PF6

A linhagem **PF6** teve um grande aumento na quantidade de transcritos de microplusina 24 horas após o repasto sanguíneo, apresentando em média $2,6 \times 10^7$ cópias mRNA/ μg RNA) no 1º ciclo gonotrófico e 2×10^7 cópias mRNA/ μg RNA no 2º ciclo gonotrófico. O nível médio de mRNA de microplusina reduziu nos demais intervalos de tempo analisados do 1º ciclo (48h- $0,3 \times 10^4$ cópias mRNA/ μg RNA; 72h- $0,2 \times 10^4$ cópias mRNA/ μg RNA; 96h- $0,1 \times 10^4$ cópias mRNA/ μg RNA) e do 2º ciclo (48h- $0,2 \times 10^4$ cópias mRNA/ μg RNA; 72h- $0,1 \times 10^4$ cópias mRNA/ μg RNA; 96h- $0,1 \times 10^4$ cópias mRNA/ μg RNA) (Figura 20).

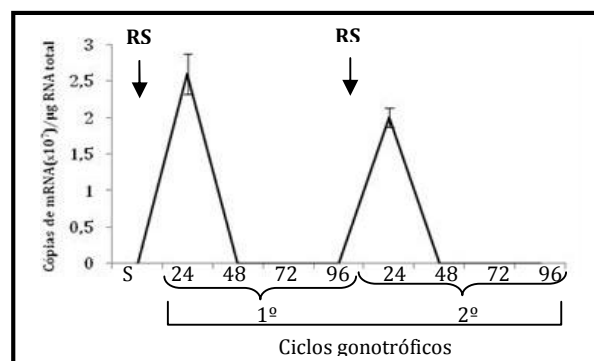


Figura 20. Análise quantitativa por PCR em tempo real de mRNA de microplusina na linhagem transgênica **PF6** de *Aedes aegypti*.

cDNA sintetizado a partir de mRNA de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos foi submetido a PCR em tempo real para quantificação absoluta dos transcritos do gene microplusina. Cada amostra de cDNA foi analisada em triplicata, sendo utilizado SYBR® green para detecção dos fragmentos amplificados. O número de cópias de mRNA/ μg RNA está representado no eixo Y. **RS:** repasto sanguíneo; **S:** fêmea alimentada com sacarose; **24, 48, 72, 96:** horas após repasto sanguíneo. [$p < 0,001$].

4.3.3.2 PCR quantitativo em tempo real da linhagem PM5

Foram quantificadas em média $9,4 \times 10^7$ cópias mRNA/ μg RNA 24h após o repasto sanguíneo no 1º ciclo em mosquitos da linhagem **PM5** e $2,7 \times 10^7$ cópias mRNA/ μg RNA 24h após o repasto sanguíneo no 2º ciclo gonotrófico. Foi detectada uma grande redução na quantidade média de mRNA de microplusina quando analisamos os demais intervalos de tempo do 1º ciclo gonotrófico (48h- $0,08 \times 10^5$ cópias mRNA/ μg RNA; 72h- $0,03 \times 10^5$ cópias mRNA/ μg RNA; 96h- $0,01 \times 10^5$ cópias mRNA/ μg RNA) e 2º ciclo (48h- $0,1 \times 10^5$ cópias mRNA/ μg RNA; 72h- $0,01 \times 10^5$ cópias mRNA/ μg RNA; 96h- $0,08 \times 10^5$ cópias mRNA/ μg RNA) (Figura 21).

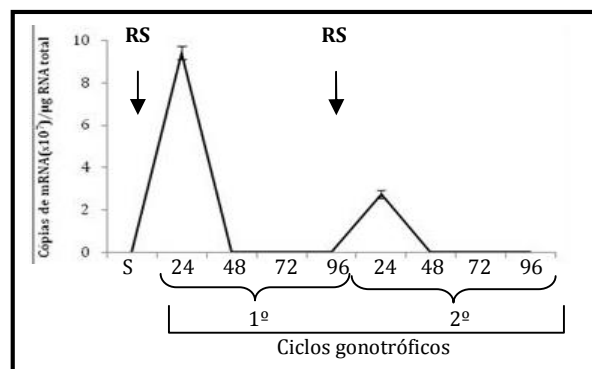


Figura 21. Análise quantitativa por PCR em tempo real de mRNA de microplusina na linhagem transgênica **PM5** de *Aedes aegypti*.

cDNA sintetizado a partir de mRNA de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos foi submetido a PCR em tempo real para quantificação absoluta dos transcritos do gene microplusina. Cada amostra de cDNA foi analisada em triplicata, sendo utilizado SYBR® green para detecção dos fragmentos amplificados. O número de cópias de mRNA/ μg RNA está representado no eixo Y. **RS:** repasto sanguíneo; **S:** fêmea alimentada com sacarose; **24, 48, 72, 96:** horas após repasto sanguíneo. [$p < 0,002$].

4.3.3.3 PCR quantitativo em tempo real da linhagem PM4

A determinação dos níveis de mRNA de microplusina após o repasto sanguíneo da linhagem **PM4** mostrou um aumento no número de transcritos, apresentando em média $17,6 \times 10^8$ cópias mRNA/ μg RNA no intervalo de tempo 24h do 1º ciclo gonotrófico e uma média de $3,3 \times 10^8$ cópias mRNA/ μg RNA quando analisado o intervalo de tempo 24h do 2º ciclo. Os intervalos de tempo posteriores apresentaram uma redução acentuada na quantidade média de transcritos de microplusina nos 2 ciclo gonotróficos (1º ciclo: 48h- $0,5 \times 10^7$ cópias mRNA/ μg RNA; 72h- $0,002 \times 10^7$ cópias mRNA/ μg RNA;

96h- $0,001 \times 10^7$ cópias mRNA/ μg RNA; 2º ciclo: 48h- $0,4 \times 10^5$ cópias mRNA/ μg RNA; 72h- $0,1 \times 10^5$ cópias mRNA/ μg RNA; 96h- $0,08 \times 10^5$ cópias mRNA/ μg RNA) (Figura 22).

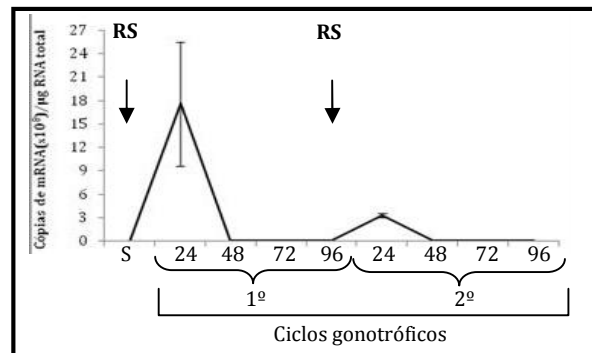


Figura 22. Análise quantitativa por PCR em tempo real de mRNA de microplusina na linhagem transgênica **PM4** de *Aedes aegypti*.

cDNA sintetizado a partir de mRNA de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos foi submetido a PCR em tempo real para quantificação absoluta dos transcritos do gene microplusina. Cada amostra de cDNA foi analisada em triplicata, sendo utilizado SYBR® green para detecção dos fragmentos amplificados. O número de cópias de mRNA/ μg RNA está representado no eixo Y. **RS**: repasto sanguíneo; **S**: fêmea alimentada com sacarose; **24, 48, 72, 96**: horas após repasto sanguíneo. [$p < 0,001$].

4.3.3.4 PCR quantitativo em tempo real da linhagem PM2

Assim como nas demais linhagens transgênicas descritas, a linhagem **PM2** também apresentou níveis elevados de mRNA de microplusina 24h após o repasto sanguíneo, tendo em média $1,6 \times 10^8$ cópias mRNA/ μg RNA no 1º ciclo gonotrófico e $1,7 \times 10^8$ cópias mRNA/ μg RNA no 2º ciclo. O Mesmo perfil de redução na quantidade média de transcritos foi observado no 1º ciclo (48h- $0,06 \times 10^6$ cópias mRNA/ μg RNA; 72h- $0,02 \times 10^6$ cópias mRNA/ μg RNA; 96h- $0,2 \times 10^6$ cópias mRNA/ μg RNA) e no 2º ciclo gonotrófico (48h- $0,01 \times 10^6$ cópias mRNA/ μg RNA; 72h- $0,01 \times 10^6$ cópias mRNA/ μg RNA; 96h- $0,01 \times 10^6$ cópias mRNA/ μg RNA) (Figura 23).

As análises realizadas com as 4 linhagens transgênicas mostraram que houve um aumento no número de cópias de mRNA de microplusina em 24 horas após o repasto sanguíneo durante os 2 ciclos gonotróficos observados e redução nos demais intervalos de tempo, assim como foi constatado anteriormente nos experimentos de RT-PCR semi quantitativo.

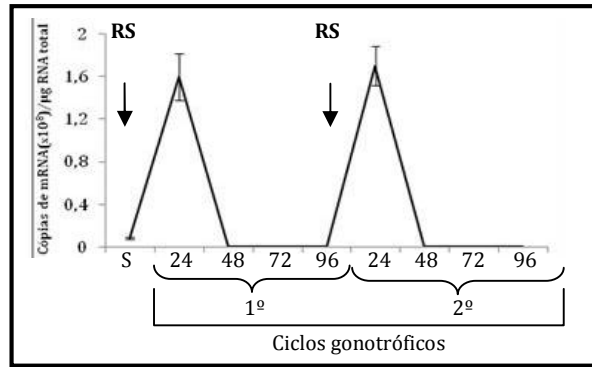


Figura 23. Análise quantitativa por PCR em tempo real de mRNA de microplusina na linhagem transgênica **PM2** de *Aedes aegypti*. cDNA sintetizado a partir de mRNA de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos foi submetido a PCR em tempo real para quantificação absoluta dos transcritos do gene microplusina. Cada amostra de cDNA foi analisada em triplicata, sendo utilizado SYBR® green para detecção dos fragmentos amplificados. O número de cópias de mRNA/µg RNA está representado no eixo Y. **RS:** repasto sanguíneo; **S:** fêmea alimentada com sacarose; **24, 48, 72, 96:** horas após repasto sanguíneo. [$p < 0,001$].

4.3.4 Análise da hemolinfa de fêmeas *Aedes aegypti* transgênicas através de RP-HPLC acoplada a um espectrômetro de massas

Inicialmente amostras de microplusina recombinante (padrão) foram injetadas diretamente no espectrômetro de massas para que pudéssemos confirmar seu perfil ESI-MS (Figura 24) e padrão de fragmentação (Figura 25).

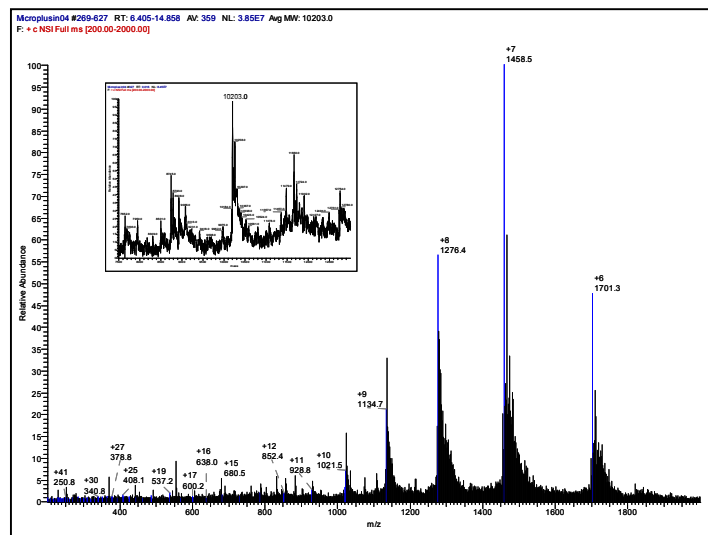


Figura 24. Perfil ESI-MS do peptídeo microplusina recombinante. Visualização da molécula de massa molecular 10.203 Da, com diferentes cargas.

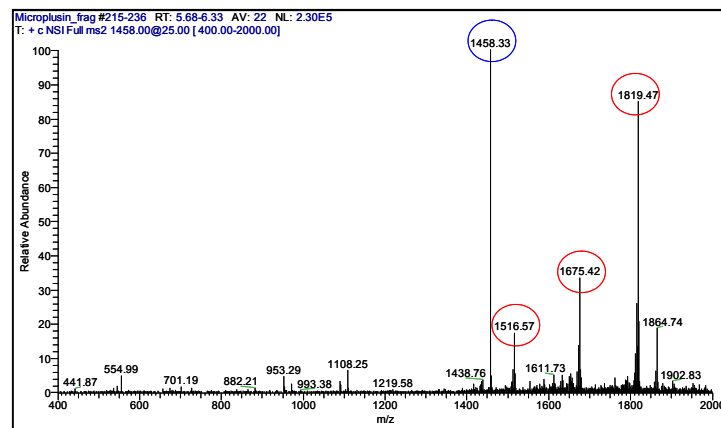


Figura 25. Padrão de fragmentação do peptídeo microplusina recombinante. Perfil de ESI-MS mostrando a fragmentação do ion m/z 1458 e seus íons produtos m/z 1819, m/z 1675 e m/z 1516.

O limite de detecção da microplusina através deste método, determinado com a adição de 0,25 pmoles, 2,5 pmoles e 25 pmoles de microplusina recombinante nas amostras de hemolinfa de *pool* de 30 fêmeas selvagens 36 horas após o repasto sanguíneo ficou em 25 pmoles de microplusina (Figura 26).

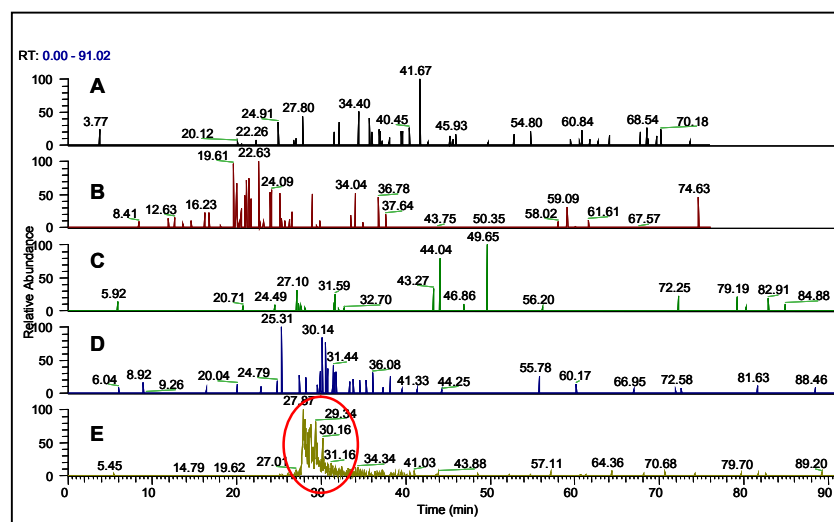


Figura 26. Detecção da microplusina recombinante em amostras de hemolinfa de *Aedes aegypti* selvagem. Cromatograma reconstruído mostrando a intensidade relativa dos íons m/z 1516; m/z 1617 e m/z 1819 (íons produto da fragmentação do ion parental de m/z 1458) x tempo. **A:** corrida em branco; **B:** hemolinfa selvagem; **C:** hemolinfa selvagem + 0,25 pmoles microplusina; **D:** hemolinfa selvagem + 2,5 pmoles microplusina; **E:** hemolinfa selvagem + 25 pmoles microplusina.

A fim de detectar a expressão da microplusina na linhagem transgênica **PM2** de *Ae. aegypti*, foi coletada hemolinfa de um *pool* de 30 fêmeas 36 horas após o repasto

sanguíneo e este material foi analisado através de RP-HPLC acoplada a um espectômetro de massa. A análise realizada utilizando esta metodologia não detectou a proteína (Figura 27).

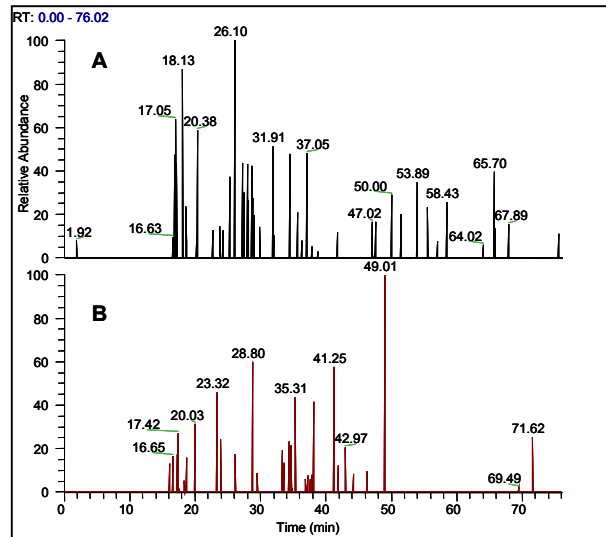


Figura 27. Detecção da microplusina recombinante em amostras de hemolinfa de *Aedes aegypti* transgênico.

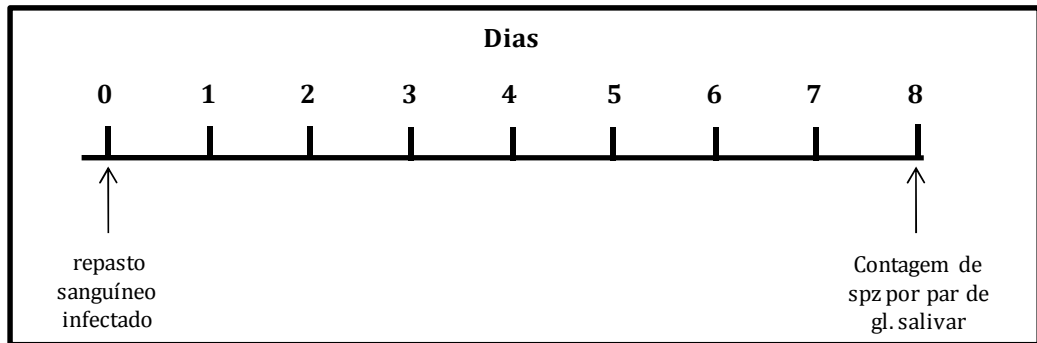
A e B: experimentos independentes com hemolinfa de 30 fêmeas da linhagem **PM2** coletada 36 horas após o repasto sanguíneo.

4.4 Efeito da microplusina no bloqueio da transmissão de *Plasmodium gallinaceum* em mosquitos transgênicos infectados

Para testar a interferência da microplusina expressa nos mosquitos transgênicos sobre o desenvolvimento do *Plasmodium gallinaceum*, foram elaborados dois desenhos experimentais onde fêmeas transgênicas e selvagens copuladas realizaram o repasto sanguíneo simultaneamente no mesmo pintainho infectado com parasitemia entre 5-10% (Figura 28 A, B). Uma parte das fêmeas alimentadas com sangue infectado realizaram a oviposição a partir do 3º dia após o repasto sanguíneo e no 5º dia após a 1ª alimentação infectada, foi oferecido repasto sanguíneo em pintainho *Gallus gallus domesticus* não infectado. As fêmeas que realizaram um ou dois repastos sanguíneos foram mantidas com sacarose 10% até o 8º dia após o repasto sanguíneo infectado, quando foram dissecadas as glândulas salivares dos mosquitos selvagens (grupo controle) e transgênicos para contagem do número de esporozoítas. Os desenhos experimentais foram elaborados baseados no perfil de transcrição e tradução da

proteína endógena (vitelogenina), cujo promotor foi utilizado na construção do transgene.

(A) 1º desenho experimental (1 repasto sanguíneo infectado)



(B) 2º desenho experimental (repasto sanguíneo infectado/oviposição/repasto sanguíneo não infectado)

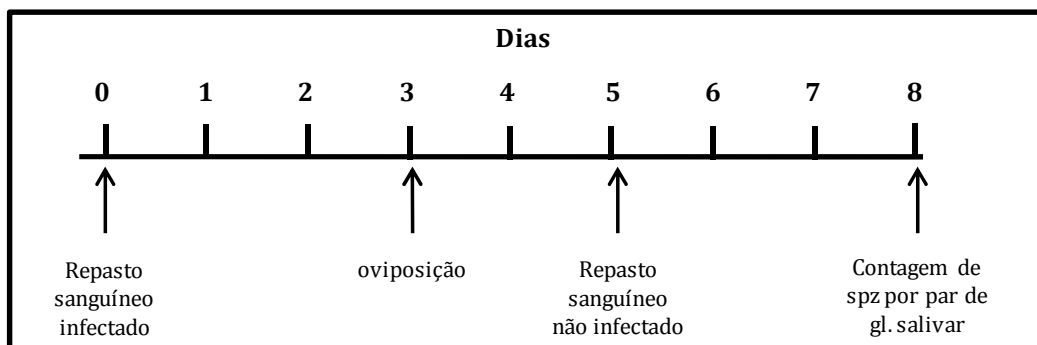


Figura 28. Esquema dos desenhos experimentais para o teste da ação do transgene sobre a infecção de *Plasmodium gallinaceum* em mosquitos transgênicos.

A: fêmeas que se alimentaram uma única vez em pintainhos infectados; **B:** fêmeas que realizaram o 1º repasto sanguíneo em pintainho infectado e o 2º repasto sanguíneo em pintainho não infectado.

4.4.1 Linhagem PF6

Em experimentos independentes baseados no 1º desenho experimental, utilizando fêmeas transgênicas e selvagens (como controle do experimento), a maior redução observada no número de esporozoítas na glândula salivar foi de 53,3% quando comparada com mosquitos selvagens (Tabela 6; Figura 29). No entanto, esta porcentagem de redução não representou uma diferença estatisticamente significativa entre o número de esporozoítas presentes em mosquitos transgênicos e selvagens ($p > 0,05$). Quando analisados os experimentos baseados no 2º desenho experimental, a

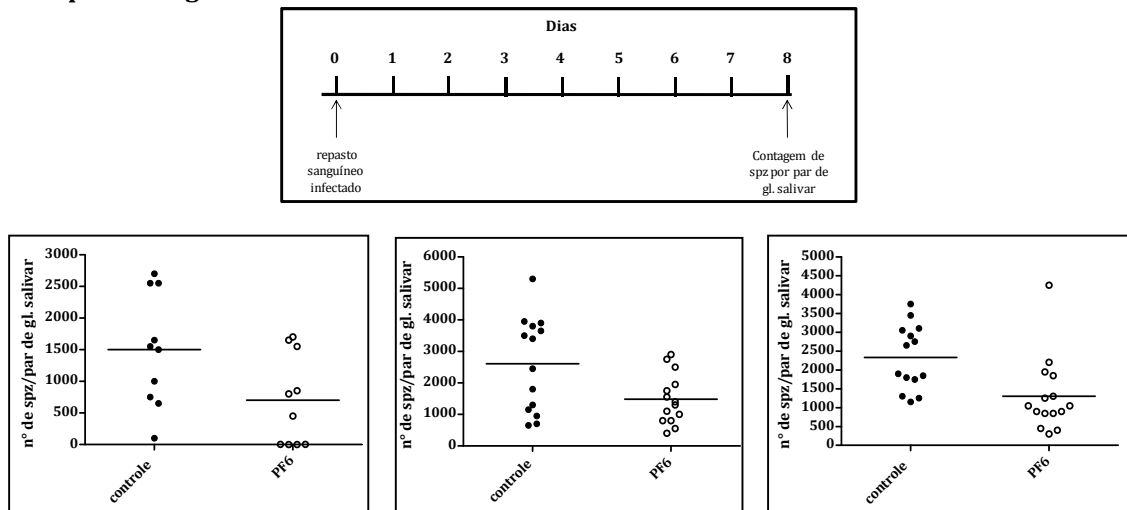
maior redução obtida foi de 50,3% no número de esporozoítas quando comparada com mosquitos selvagens (Tabela 6; Figura 29), não havendo diferença significativa entre o valor médio de esporozoítas nos mosquitos transgênicos e selvagens. ($p>0,05$).

Tabela 6- Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Aedes aegypti* transgênico linhagem **PF6**.

| Repasto sanguíneo | Linhagem | Prevalência ^a | Esporozoítas ^b | Inibição ^c |
|-------------------|-----------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 RS | Controle. | 100% (10/10) | 1500 (100-2700) | - |
| | PF6 | 100% (10/10) | 700,7 (0-1700) | 53,3% * |
| | Controle | 100% (14/14) | 2607,1 (650-5300) | - |
| | PF6 | 100% (14/14) | 1482,1 (400-2900) | 43,2% ** |
| | Controle | 100% (13/13) | 2273 (1150-3750) | - |
| | PF6 | 100% (15/15) | 1303,3 (300-4250) | 42,7% * |
| 2 RS | Controle | 100% (10/10) | 1775 (350-4050) | - |
| | PF6 | 100% (10/10) | 881,6 (5-2450) | 50,3% * |
| | Controle | 100% (15/15) | 3803,3 (450-7700) | - |
| | PF6 | 100%(15/15) | 2820 (250-5500) | 25,8% * |
| | Controle | 100% (13/13) | 2823 (550-6750) | - |
| | PF6 | 100% (14/14) | 2489,2 (300-5800) | 11,8% * |

^a Porcentagem de mosquitos infectados; ^b média do n° de spz/par de gl. salivar (menor e maior valor de spz/par de gl. salivar); redução de spz/par de gl. salivar em porcentagem; **1 RS**: 1 repasto sanguíneo; **2 RS**: 2 repastos sanguíneos. * $p>0,05$; ** $p<0,05$.

1 Repasto Sanguíneo: 1º desenho experimental (1 repasto sanguíneo infectado)



2 Repastos Sanguíneos: 2º desenho experimental (repasto sanguíneo infectado/oviposição/repasto sanguíneo não infectado)

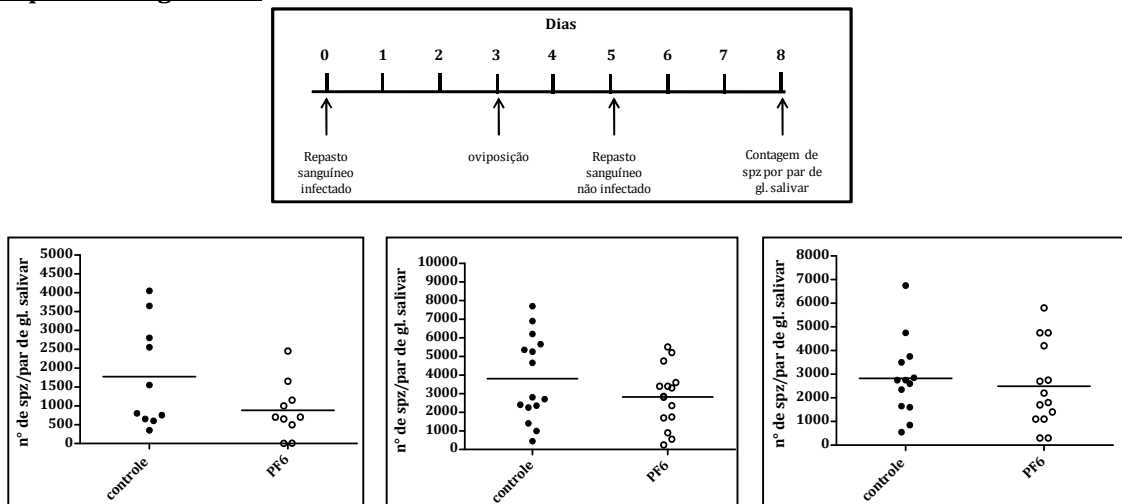


Figura 29. Efeito da microplúsina sobre o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Aedes aegypti* transgênico.

Fêmeas de *Aedes aegypti* transgênicas linhagem **PF6** e fêmeas selvagens 8 dias após realizarem o repasto sanguíneo tiveram as glândulas salivares dissecadas e o número de esporozoítas foi determinado. Cada ponto corresponde a um mosquito dissecado.

4.4.2 Linhagem PM5

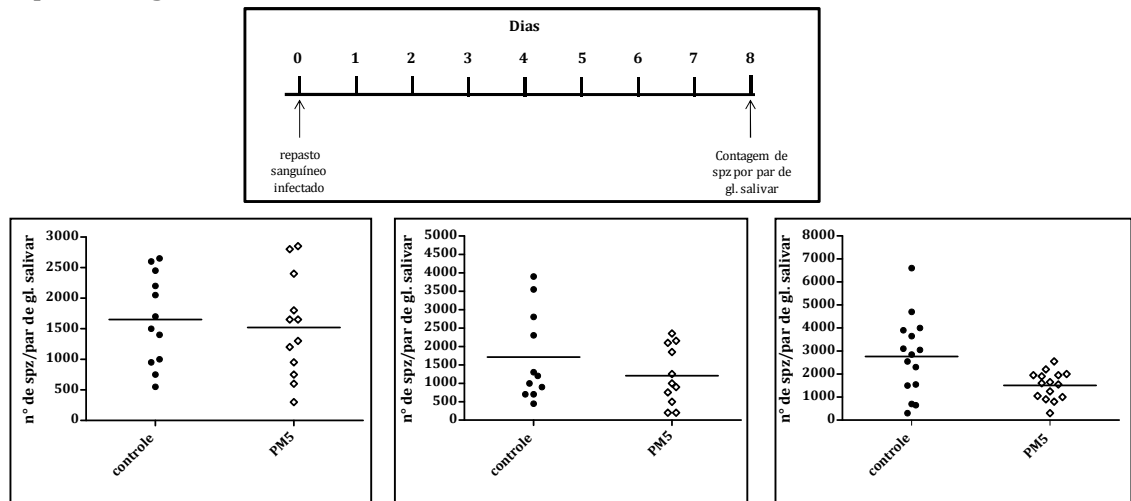
Foram realizados 3 experimentos independentes baseados nos 2 desenhos experimentais, utilizando fêmeas transgênicas e selvagens (como controle do experimento). Nos experimentos com 1 alimentação sanguínea a maior redução no número de esporozoítas obtida foi de 45% quando comparada com mosquitos selvagens (Tabela 7; Figura 30), havendo diferença significativa entre os valores médios de esporozoítas nos mosquitos selvagens e transgênicos ($p < 0,05$). A análise dos experimentos baseados no 2º desenho experimental mostrou uma redução máxima de 50,3% no número de esporozoítas quando comparada com mosquitos selvagens (Tabela 7; Figura 30). No entanto não houve diferença significativa entre a média de esporozoítas dos mosquitos transgênicos e selvagens. ($p > 0,05$).

Tabela 7- Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Aedes aegypti* transgênico linhagem **PM5**.

| Repasto sanguíneo | Linhagem | Prevalência ^a | Esporozoítas ^b | Inibição ^c |
|-------------------|----------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 RS | Controle | 100% (12/12) | 1650(550-2650) | - |
| | PM5 | 100% (12/12) | 1520,8 (300-2850) | 8% * |
| | Controle | 100% (11/11) | 1709 (450-3900) | - |
| | PM5 | 100% (11/11) | 1204,5 (200-2350) | 29,6% * |
| | Controle | 100% (15/15) | 2760 (300-6600) | - |
| | PM5 | 100% (15/15) | 1510 (300-2550) | 45% ** |
| 2 RS | Controle | 100% (9/9) | 1561,1 (950-3200) | - |
| | PM5 | 100% (8/8) | 1081,2 (400-2700) | 31% * |
| | Controle | 100% (15/15) | 2743,3 (450-7200) | - |
| | PM5 | 100% (15/15) | 2426,6 (450-6650) | 12% * |

^a Porcentagem de mosquitos infectados; ^b média do n° de spz/par de gl. salivar (menor e maior valor de spz/par de gl. salivar); redução de spz/par de gl. salivar em porcentagem; **1 RS**: 1 repasto sanguíneo; **2 RS**: 2 repastos sanguíneos. * $p > 0,05$; ** $p < 0,05$.

1 Repasto Sanguíneo: 1º desenho experimental (1 repasto sanguíneo infectado)



2 Repastos Sanguíneos: 2º desenho experimental (repasto sanguíneo infectado/oviposição/repasto sanguíneo não infectado)

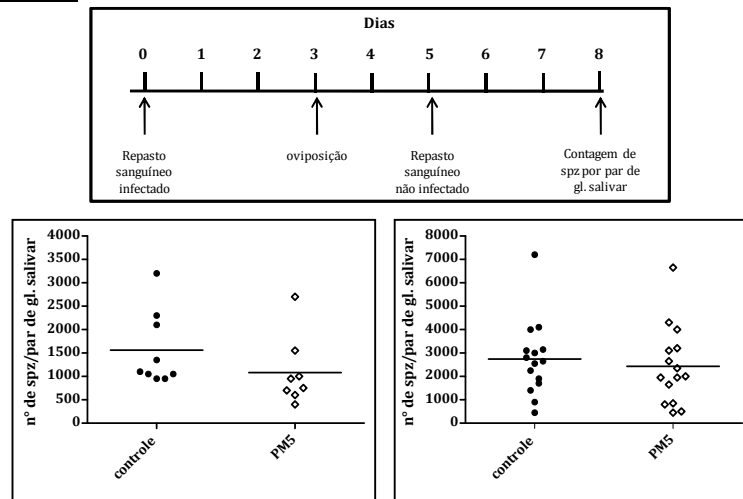


Figura 30. Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Aedes aegypti* transgênico.

Fêmeas de *Aedes aegypti* transgênicas linhagem **PM5** e fêmeas selvagens 8 dias após realizarem o repasto sanguíneo tiveram as glândulas salivares dissecadas e o número de esporozoítas foi determinado. Cada ponto corresponde a um mosquito dissecado.

4.4.3 Linhagem PM4

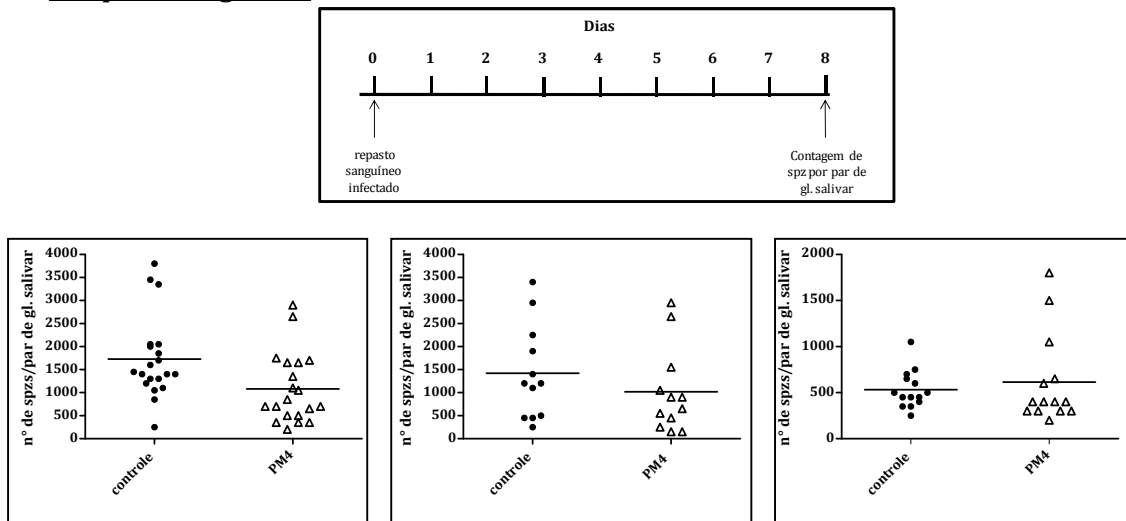
Em experimentos independentes realizados com fêmeas transgênicas e selvagens (como controle do experimento) alimentadas 1 vez com sangue infectado a maior redução no número de esporozoítas obtida foi de 37,3% quando comparada com mosquitos selvagens (Tabela 8; Figura 31), havendo diferença significativa entre os valores médios de esporozoítas nos mosquitos selvagens e transgênicos ($p < 0,05$). No entanto ao analisarmos os experimentos onde as fêmeas realizaram 2 repastos sanguíneos a redução máxima foi de 31% (Tabela 8; Figura 31), não havendo diferença significativa entre a média de esporozoítas dos mosquitos transgênicos e selvagens. ($p > 0,05$).

Tabela 8- Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Aedes aegypti* transgênico linhagem **PM4**.

| Repasto sanguíneo | Linhagem | Prevalência ^a | Esporozoítas ^b | Inibição ^c |
|-------------------|----------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 RS | Controle | 100% (20/20) | 1727,5 (250-3800) | - |
| | PM4 | 100% (20/20) | 1082,5 (200-2900) | 37,3% ** |
| | Controle | 100% (12/12) | 1420,8 (250-3400) | - |
| | PM4 | 100% (12/12) | 1016,6 (150-2950) | 28,4% * |
| | Controle | 100% (14/14) | 532,1 (250-1050) | - |
| | PM4 | 100% (14/14) | 614,2 (200-1800) | 0% * |
| 2 RS | Controle | 100% (14/14) | 1967,8 (350-3400) | - |
| | PM4 | 100% (15/15) | 2020 (200-4700) | 0% * |
| | Controle | 100% (10/10) | 740 (350-1100) | - |
| | PM4 | 100% (10/10) | 510 (250-1250) | 31% * |

^a Porcentagem de mosquitos infectados; ^b média do nº de spz/par de gl. salivar (menor e maior valor de spz/par de gl. salivar); redução de spz/par de gl. salivar em porcentagem; **1 RS**: 1 repasto sanguíneo; **2 RS**: 2 repastos sanguíneos. * $p > 0,05$; ** $p < 0,05$.

1 Repasto Sanguíneo: 1º desenho experimental (1 repasto sanguíneo infectado)



2 Repastos Sanguíneos: 2º desenho experimental (repasto sanguíneo infectado/oviposição/repasto sanguíneo não infectado)

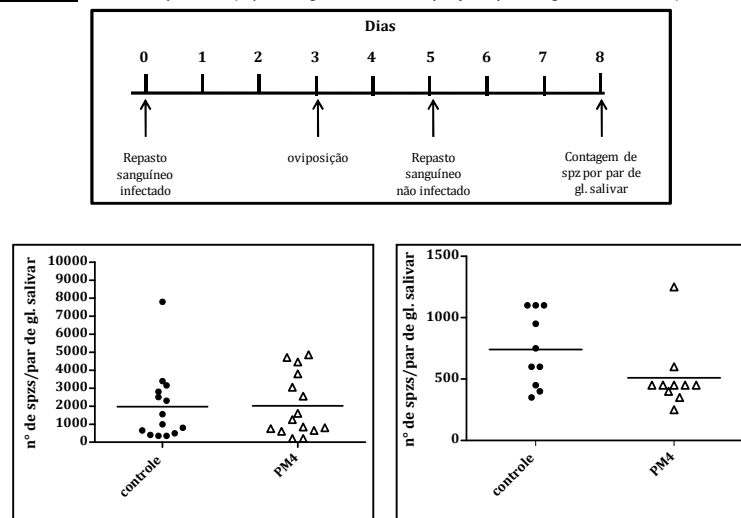


Figura 31. Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Aedes aegypti* transgênico.

Fêmeas de *Aedes aegypti* transgênicas linhagem **PM4** e fêmeas selvagens 8 dias após realizarem o repasto sanguíneo tiveram as glândulas salivares dissecadas e o número de esporozoítas foi determinado. Cada ponto corresponde a um mosquito dissecado.

4.4.4 Linhagem PM2

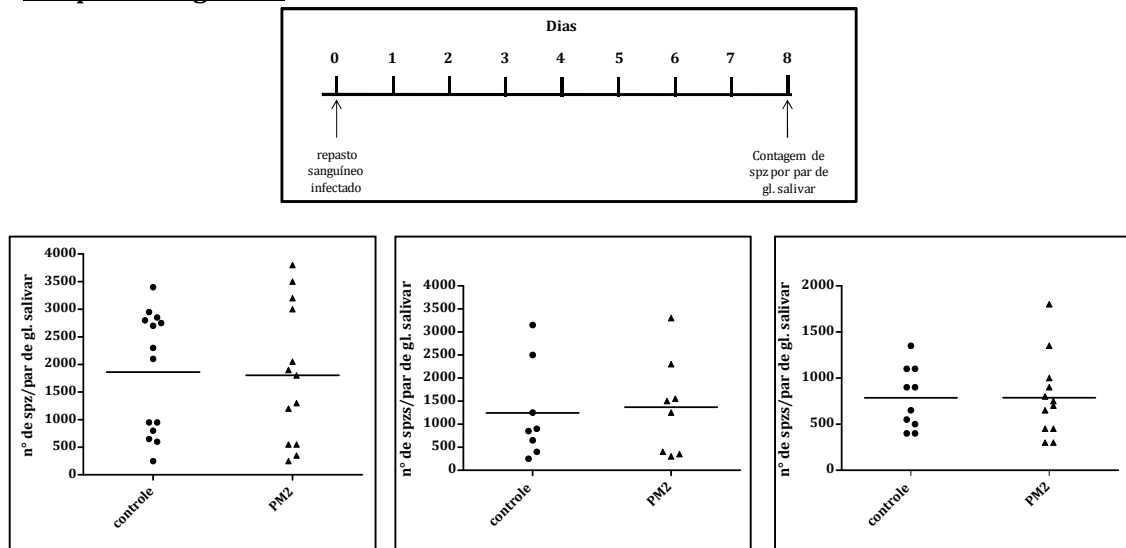
A maior redução no número de esporozoítas obtida em experimentos independentes realizados com fêmeas transgênicas e selvagens (como controle do experimento) alimentadas apenas 1 vez com sangue infectado foi de 3,1% quando comparada com mosquitos selvagens (Tabela 9; Figura 32), não havendo diferença significativa entre os valores médios de esporozoítas nos mosquitos selvagens e transgênicos ($p>0,05$). No entanto ao analisarmos os experimentos onde as fêmeas realizaram 2 repastos sanguíneos a redução máxima foi de 63% (Tabela 9; Figura 32), havendo uma diferença extremamente significativa entre a média de esporozoítas dos mosquitos transgênicos e selvagens. ($p<0,001$).

Tabela 9- Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Aedes aegypti* transgênico linhagem PM2.

| Repasto sanguíneo | Linhagem | Prevalência ^a | Esporozoítas ^b | Inibição ^c |
|-------------------|-----------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 RS | Controle | 100% (14/14) | 1860,7 (250-3400) | - |
| | PM2 | 100% (13/13) | 1803,8 (250-3800) | 3,1% * |
| | Controle | 100% (8/8) | 1243,7 (250-3150) | - |
| | PM2 | 100% (8/8) | 1368,7 (300-3300) | 0%* |
| | Controle | 100% (10/10) | 785 (400-1350) | - |
| | PM2 | 100% (12/12) | 787,5 (300-1800) | 0% * |
| 2 RS | Controle. | 100% (9/9) | 2738,8 (1650-4900) | - |
| | PM2 | 100% (9/9) | 1016,6 (350-1900) | 63% *** |
| | Controle | 100% (5/5) | 1400 (750-2700) | - |
| | PM2 | 100% (5/5) | 690 (400-1250) | 51% * |
| | Controle | 100% (11/11) | 995,4 (250-2850) | - |
| | PM2 | 100% (10/10) | 635 (200-1600) | 36% * |

^a Porcentagem de mosquitos infectados; ^b média do n° de spz/par de gl. salivar (menor e maior valor de spz/par de gl. salivar); redução de spz/par de gl. salivar em porcentagem; **1 RS**: 1 repasto sanguíneo; **2 RS**: 2 repastos sanguíneos. * $p>0,05$; *** $p<0,001$.

1 Repasto Sanguíneo: 1º desenho experimental (1 repasto sanguíneo infectado)



2 Repastos Sanguíneos: 2º desenho experimental (repasto sanguíneo infectado/oviposição/repasto sanguíneo não infectado)

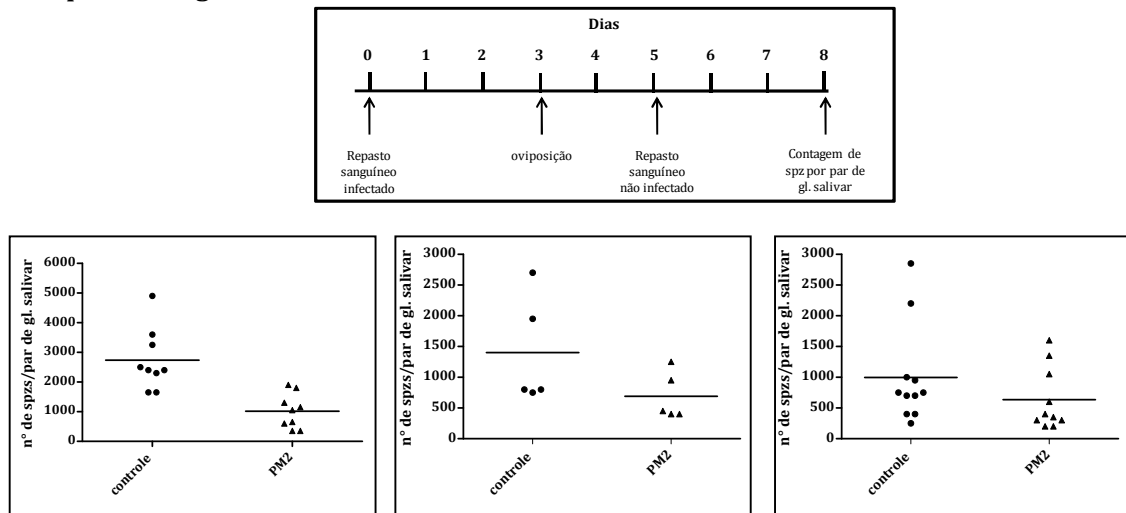


Figura 32. Efeito da microplusina sobre o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Aedes aegypti* transgênico.

Fêmeas de *Aedes aegypti* transgênicas linhagem **PM2** e fêmeas selvagens 8 dias após realizarem o repasto sanguíneo tiveram as glândulas salivares dissecadas e o número de esporozoítas foi determinado. Cada ponto corresponde a um mosquito dissecado.

4.5 Análise do *fitness* de mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos da linhagem PM2 expressando microplusina

Para verificar se a inserção do transgene interferiu no *fitness* dos mosquitos transgênicos, alguns parâmetros biológicos, como fecundidade (ovos/fêmea), fertilidade (larvas eclodidas/ovos ovipostos) e longevidade foram analisados em duplicatas.

Nenhuma diferença significativa seja entre machos transgênicos e selvagens ou entre fêmeas transgênicas e selvagens foi observada na longevidade dos mosquitos adultos (Figura 33 A, B). Nenhuma diferença foi observada entre mosquitos transgênicos e selvagens quando analisamos os dados referentes à fecundidade e fertilidade (Figura 34). Os resultados indicam que o transgene não resultou em um custo biológico para os mosquitos transgênicos.

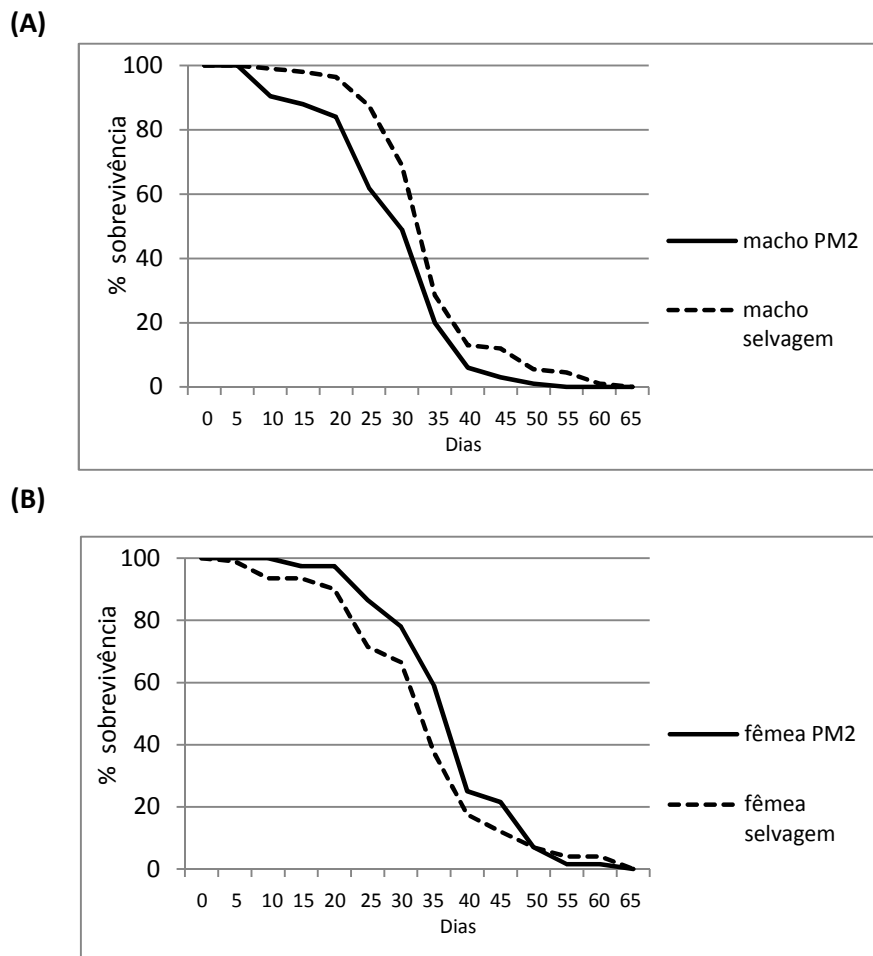


Figura 33. Sobrevivência de *Aedes aegypti* transgênico e selvagem. A sobrevivência foi plotada em proporção ao número de mosquitos adultos sobreviventes em cada dia observado. **A:** machos da linhagem **PM2** comparados com machos selvagens. **B:** fêmeas da linhagem **PM2** comparadas com fêmeas selvagens. Cada gráfico mostra a média de dois experimentos independentes. ($p > 0,05$).

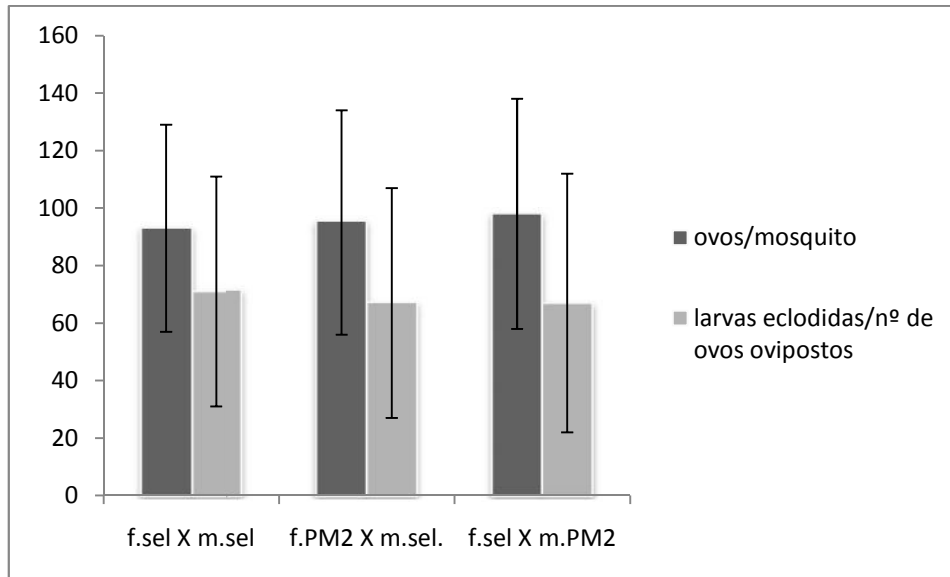


Figura 34. Comparação da fecundidade e fertilidade entre mosquitos *Aedes aegypti* transgênicos e selvagens.

Fêmeas transgênicas da linhagem **PM2** foram copuladas por machos selvagens e fêmeas selvagens foram copuladas por machos transgênicos da linhagem **PM2**. O cruzamento entre machos e fêmeas selvagens foi utilizado como controle. **Coluna cinza escuro:** número médio de ovos ovipostos por cada mosquito ($p>0,05$); **coluna cinza claro:** número médio de larvas eclodidas em relação ao número de ovos ovipostos ($p>0,05$); **f. sel.:** fêmea selvagem; **m. sel.:** macho selvagem; **f. PM2:** fêmea da linhagem **PM2**; **m. PM2:** macho da linhagem **PM2**. Experimentos realizados em duplicata.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Um dos desafios na erradicação de doenças parasitárias tem sido conseguir bloquear a transmissão do parasita atingindo seus diversos estágios de desenvolvimento.

Na busca por uma molécula anti-*Plasmodium* 100% efetiva contra um determinado estágio de desenvolvimento do parasita, peptídeos antimicrobianos, sejam eles endógenos, exógenos ou sintéticos, foram testados e apresentaram alguma atividade contra estágios esporogônicos (GWADZ et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1995; SHAHABUDDIN et al., 1998; ARRIGHI et al., 2002; KIM et al., 2004; MOREIRA et al., 2007; MACIEL et al., 2008).

Ausência de toxicidade ao mosquito vetor, atividade contra *Plasmodium* e rápida ação sobre o parasita, são alguns dos critérios a serem considerados quando se busca uma molécula anti-*Plasmodium* (CARTER et al., 2010).

A microplusina, peptídeo antimicrobiano pertencente à família das defensinas de insetos, purificada da hemolinfa livre de células e de ovos do carrapato *R. (B.) microplus* (FOGAÇA et al., 2004; ESTEVES et al., 2009), inicialmente teve sua atividade anti-*Plasmodium* avaliada em um estudo realizado por Rodrigues (2005) em nosso laboratório. Os resultados deste estudo mostraram que o peptídeo foi altamente tóxico aos esporozoítas imaturos de *P. gallinaceum*, forma do parasita presente na hemolinfa do mosquito, em uma concentração relativamente baixa (10 µM). O peptídeo também não apresentou toxicidade aos mosquitos *Ae. aegypti* mesmo quando injetados intratoraxicamente em altas concentrações (100 µM). Sua rápida ação sobre esporozoítas (30 minutos) foi confirmada, sugerindo ser uma interessante molécula anti-*Plasmodium* a ser utilizada na geração de mosquitos transgênicos.

Estudos sobre como inicia a atração entre um peptídeo antimicrobiano e a membrana celular, ligação, inserção e permeabilização têm sido relatados (BULET et al., 1999; BROGDEN, 2005). Acredita-se que peptídeos antimicrobianos atuem de maneira a perturbar a membrana alvo, levando à alteração do potencial de membrana, perda de metabólitos e por fim à lise celular (ZASLOFF, 2002; LAMAZIÈRE et al., 2007; FERNANDEZ et al., 2009). Resultados de estudos com peptídeos, como por exemplo, cecropina, sugerem que sua atividade esteja associada à composição lipídica da membrana da célula, com a qual interagem antes de iniciar a lise da membrana (SHAHABUDDIN et al., 1998).

Os resultados de Rodrigues (2005) mostraram claramente que a microplusina induziu a permeabilização da membrana celular do parasita. Sendo a porção lipídica da membrana da célula do *Plasmodium* altamente conservada entre as espécies (SHERMAN, 1998), a microplusina mostrou ser uma interessante molécula a ter sua toxicidade testada sobre as demais espécies de *Plasmodium*.

No presente trabalho, geramos e caracterizamos linhagens transgênicas de *Ae. aegypti* expressando a microplusina como molécula efetora contra *P. gallinaceum*. Neste estudo verificamos a ação anti-*Plasmodium* do peptídeo na sua forma original para que de acordo com os resultados gerados, pudéssemos aperfeiçoar a molécula através da síntese gênica.

Diante dos resultados obtidos por Rodrigues (2005), utilizamos na construção do transgene o promotor da vitelogenina de *Ae. aegypti* para direcionar a expressão da microplusina para a hemolinfa após o repasto sanguíneo. Para a escolha do promotor, consideramos sua capacidade de dirigir fortemente a expressão da molécula efetora no corpo gorduroso e acumulá-la na hemolinfa após o repasto sanguíneo (KOKOZA et al., 2000; JASINSKIENE et al., 2007). Com a escolha deste promotor, restringimos portanto a expressão do transgene à um intervalo de tempo determinado e tecido específico com o objetivo de obter o efeito máximo da molécula sobre os parasitas, gerando um baixo custo ao *fitness* do inseto transformado.

Promotores que dirigem a expressão da proteína exógena para um tecido específico mostraram-se mais vantajosos que os promotores constitutivos, que expressam a proteína em vários tecidos reduzindo o *fitness* do mosquito transgênico (MOREIRA et al., 2002b; MARRELLI et al., 2006).

Na busca por promotores capazes de direcionar a expressão de moléculas efetoras para outros tecidos, a fim de bloquear outros estágios do desenvolvimento do parasita, promotores presentes no trato digestivo e glândula salivar foram caracterizados e utilizados com sucesso na transgenia de mosquitos vetores de patógenos (COATES et al., 1999; MOREIRA et al., 2000; ITO et al., 2002; MOREIRA et al., 2002a; ABRAHAM et al., 2005; YOSHIDA et al., 2006; YOSHIDA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; CORBY-HARRIS et al., 2010; MATSUOKA et al., 2010).

Os mosquitos transgênicos foram gerados através da microinjeção de ovos embrionados de *Ae. aegypti* com uma mistura de dois plasmídeos: o primeiro contendo o transgene e o gene repórter inseridos entre as repetições terminais invertidas do

transposon *mariner* e o segundo plasmídeo, o auxiliador, contendo a sequência codificadora da respectiva transposase.

A detecção dos mosquitos transformados foi possível com a utilização do gene marcador, composto pela proteína verde fluorescente eGFP dirigida pelo promotor de 3xP3(HORN; WIMMER, 2000). A expressão da proteína eGFP foi detectada em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito (Figura 15), com forte expressão nos olhos, corroborando com resultados obtidos em trabalhos anteriores onde utilizaram este mesmo promotor para direcionar a expressão do eGFP (HORN et al., 2000; ITO et al., 2002; MOREIRA et al., 2002a; ABRAHAM et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008; KOKOZA et al., 2010).

Iniciamos a caracterização das linhagens transgênicas de mosquito *Ae. aegypti*, confirmando a presença do gene marcador e do transgene através da técnica de PCR utilizando DNA genômico, metodologia já aplicada em outros trabalhos com mosquitos transformados (KOKOZA et al., 2000; KOJIN, 2009) . A inserção foi confirmada nos mosquitos transgênicos através da visualização em gel de agarose dos produtos da amplificação correspondentes a cada gene (Figura 17).

O nível de transcrição de mRNA do transgene expresso no corpo gorduroso foi determinado por RT-PCR semi quantitativo utilizando cDNA de machos, fêmeas pré-vitelogênicas (alimentadas com sacarose) e fêmeas 24, 48, 72 e 96 horas após repasto sanguíneo. Os transcritos de microplusina foram detectados somente nas linhagens transgênicas, especificamente em fêmeas vitelogênicas, com altos níveis de mRNA 24 horas após o repasto sanguíneo (Figura 19), correspondendo ao pico de transcrição do gene endógeno da vitelogenina (RAIKHEL et al., 1999; KOKOZA et al., 2001; ARAUJO et al., 2011). Este mesmo padrão de transcrição foi visto em diferentes linhagens transgênicas de *Ae. aegypti* (KOKOZA et al., 2000; KOKOZA et al., 2001; KOKOZA et al., 2010) e *An. stephensi* (NIRMALA et al., 2006) em que foi feito uso do promotor de vitelogenina para direcionar a expressão de diferentes genes.

A utilização deste promotor ativado somente após o repasto sanguíneo nos forneceu a possibilidade de induzirmos a transcrição do transgene somente no momento desejado, quando os esporozoítas estavam presentes na hemolinfa do mosquito.

A técnica de quantificação absoluta por PCR em tempo real, possibilitou a determinação do número de cópias de mRNA do transgene em cada linhagem

transgênica. Nossos resultados mostraram que, como citado anteriormente nos experimentos de RT-PCR semi quantitativo, as fêmeas transgênicas apresentaram um pico de transcrição do gene de microplusina 24 horas após o repasto sanguíneo (Figuras 20 a 23).

A metodologia de espectrometria de massas foi utilizada por Kokoza et al. (2010) para comparar a composição de peptídeos presentes na hemolinfa de mosquitos transgênicos e selvagens na busca pelos peptídeos expressos pelo transgene. No presente trabalho, para verificar se os transcritos do peptídeo estavam sendo traduzidos nos mosquitos transgênicos, utilizamos a técnica RP-HPLC acoplada ao espectrômetro de massa para analisar os componentes presentes na hemolinfa de fêmeas 36 horas após o repasto sanguíneo. A análise realizada utilizando esta metodologia não detectou o peptídeo (Figura 27). Através da padronização deste método, utilizando hemolinfa de fêmeas selvagens em que foi adicionada a microplusina, o limite de detecção do peptídeo ficou entre 0,25 e 2,5 pmoles (Figura 26). Este resultado sugere que provavelmente o peptídeo não tenha sido detectado na hemolinfa dos mosquitos transgênicos por encontrar-se em uma concentração inferior ao limite de detecção.

A atividade anti parasítica da microplusina foi avaliada através de ensaios de bloqueio ao *P. gallinaceum* em *Ae. aegypti* transformados. Como não tínhamos dados sobre a estabilidade do peptídeo expresso na hemolinfa do mosquito, foram elaborados dois desenhos experimentais baseados no perfil de transcrição e tradução da proteína endógena (vitelogenina), cujo promotor foi utilizado na construção do transgene (Figura 28). No primeiro desenho experimental um grupo de fêmeas selvagens e transgênicas realizou um único repasto sanguíneo, enquanto que no segundo desenho experimental fêmeas selvagens e transgênicas realizaram dois repastos sanguíneos para reativação do transgene.

Em um trabalho anteriormente realizado neste mesmo laboratório (MIRANDA, 2006), estudamos o tempo de desenvolvimento da esporogonia de *P. gallinaceum* em *Ae. aegypti* e os resultados mostraram que a partir do 7º dia após a infecção oral dos mosquitos alguns oocistos rompidos foram detectados no trato digestivo assim como a presença de esporozoítas na hemolinfa e somente no 8º dia foram detectados esporozoítas na glândula salivar. Por isso neste trabalho determinamos que, para os dois desenhos experimentais, a contagem de esporozoítas presentes nas glândulas salivares dos mosquitos selvagens e transgênicos seria realizada no 8º dia após a infecção. Para o

desenho experimental com dois repastos sanguíneos, ficou estabelecido que as fêmeas alimentadas inicialmente com sangue infectado, realizariam o segundo repasto sanguíneo não infectado dois dias antes (5º dia após a infecção) do rompimento dos oocistos e liberação dos esporozoítas, para que o peptídeo estivesse presente na hemolinfa no 7º dia após a infecção (MIRANDA, 2006). Esta estimativa se baseou no tempo de desenvolvimento do parasita e expressão da microplusina no mosquito transformado.

A redução na quantidade de esporozoítas presentes nas glândulas salivares variou entre as diferentes linhagens transgênicas e até mesmo dentro da linhagem em experimentos independentes (Tabelas 6 a 9). Variações na inibição do desenvolvimento do parasita também foram obtidas em linhagens transgênicas expressando PLA2 mutado (RODRIGUES et al., 2008). Estas variações podem ser resultado da ação de diversos fatores, como a parasitemia do pintainho após a infecção, o nível de infecção dos mosquitos e a expressão da proteína nas diferentes linhagens (ARAUJO et al., 2010; PERERA et al., 2002; MARCUS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2008). Tais fatores refletem em uma heterogeneidade dentro das linhagens e entre elas, visto que cada mosquito naturalmente possui uma resposta imunológica própria e nível de infecção e expressão da molécula efetora diferentes entre si. Este perfil heterogêneo também foi encontrado entre os grupos experimentais de mosquitos transgênicos expressando anticorpo recombinante N2scFv e validado quando o número de esporozoítas presentes nas glândulas salivares foi plotado individualmente indicando a existência de dois grupos de mosquitos, o grupo afetado em que se via o efeito da molécula efetora sobre os parasitas e o grupo não afetado (JASINSKIENE et al., 2007).

Os efeitos da integração e expressão do transgene variam devido a maneira aleatória com que se insere no genoma, podendo resultar na interrupção ou alteração da expressão de gene endógenos, na expressão de molécula tóxica ao mosquito, ou no consumo de recursos importantes para a sobrevivência e reprodução normal do mosquito. A intensidade da expressão do transgene pode ser influenciada pela cromatina presente entorno do local de inserção (MARRELLI et al., 2006). Portanto, quando a intensidade da expressão do transgene é um requisito importante, várias linhagens obtidas para a mesma construção devem ser analisadas.

Mosquitos transgênicos expressam múltiplos genes, o gene marcador e o gene efetor, sendo que o acúmulo destas proteínas exógenas pode resultar em toxicidade às

células em que são expressas (MARRELLI et al., 2006), fato já relatado em mosquitos expressando PLA2, cuja fertilidade foi reduzida devido a danos causados pela proteína exógena expressa nas células epiteliais do intestino (MOREIRA et al., 2004; ABRAHAM et al., 2005).

Observações feitas indiretamente durante a manutenção da colônia de mosquitos transgênicos indicam que a expressão de tais genes não comprometeu o “fitness”, pois atualmente estamos na 13ª geração heterozigota de mosquitos transgênicos.

Estudos têm mostrado que o efeito da inserção e/ou expressão do transgene sobre o “fitness” varia entre mosquitos heterozigotos e homozigotos (LI et al., 2008) resultando em redução no “fitness” de mosquitos homozigotos (CATTERUCCIA et al., 2003; IRVIN et al., 2004), o que já não foi observado em mosquitos heterozigotos (MOREIRA et al., 2004). Vários pesquisadores acreditam que esta redução esteja associada ao efeito recessivo da endogamia presente entre os homozigotos (CATTERUCCIA et al., 2003; IRVIN et al., 2004; MARRELLI et al., 2006; AMENYA et al., 2010).

A inserção do transgene pode ocorrer em uma região ativa do genoma, impedindo a expressão de um gene endógeno essencial para a sobrevivência do mosquito. No entanto, segundo Marrelli et al. (2006), a redução no “fitness” devido a inserção do transgene não é um evento que ocorra com frequência.

Para avaliar o impacto da integração do transgene no genoma sobre o “fitness” dos mosquitos transgênicos, alguns parâmetros biológicos foram aplicados neste trabalho. Analisamos a sobrevivência e reprodução, avaliados através da análise dos seguintes parâmetros: fertilidade, fecundidade, longevidade dos adultos (MENGE et al., 2005; AMENYA et al., 2010) e os resultados obtidos mostraram que a integração do transgene não acarretou em custos para o desempenho biológico, seja na sobrevivência ou na reprodução dos mosquitos transgênicos quando comparados com mosquitos selvagens.

Sabe-se que diversos fatores, tais como sequência do promotor, elementos de regulação e sequência de códons são importantes na determinação do nível de expressão do gene (LITHWICK et al., 2003). Diferentes organismos mostram uma preferência particular por um dos vários códons que codificam o mesmo aminoácido, sendo um dos fatores limitantes quando o objetivo é a expressão de uma proteína exógena, principalmente em casos onde um organismo expressa um gene exógeno que

necessita de códons que não se assemelham aos códons utilizados pelo organismo (FUGLSANG, 2003).

Diante desta informação e dos resultados obtidos, adotamos a estratégia de otimização dos códons (resultados não apresentados), pois a sequência da microplusina utilizada na construção do transgene presente nas linhagens transgênicas descritas neste trabalho possui os códons utilizados pelo organismo do qual foi purificada (o carrapato). A otimização foi realizada baseada na substituição dos códons originais por códons mais frequentes em *Ae. aegypti* (Anexo E). Essa substituição envolve a alteração dos códons raros do gene alvo por códons mais frequentes no organismo de interesse, sem modificar a sequência de aminoácidos da proteína codificada (PUIGBÒ et al., 2007).

Acredita-se que essa substituição de códons resultará no aperfeiçoamento da molécula e possivelmente em uma maior redução do número de esporozoítas nas glândulas salivares do mosquito.

Além disso, o desenho de peptídeos sintéticos baseados em moléculas como a microplusina possibilitará que candidatos promissores sejam melhorados e novas moléculas efectoras sejam desenvolvidas e utilizadas na geração de mosquitos transgênicos refratários a diversos patógenos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O promotor da vitelogenina utilizado na construção dos mosquitos transformados foi ativado após repasto sanguíneo, ativando a expressão do transgene.
- A expressão do gene marcador foi semelhante à de outras linhagens transgênicas descritas na literatura.
- O perfil de transcrição do transgene foi semelhante ao do gene endógeno de vitelogenina.
- A redução na quantidade de esporozoítas presentes nas glândulas salivares variou entre as quatro linhagens estudadas. A maior redução foi obtida com a linhagem **PM2**.
- O *fitness* dos mosquitos transgênicos da linhagem **PM2** não foi alterado pela inserção do transgene quando comparado com mosquitos não transformados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

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, p. 271-279, 2005.

ADELMAN, Z. N.; ANDERSON, M. A. E.; MORAZZANI, E. M.; MYLES, K. M. A transgenic sensor strain for monitoring the RNAi pathway in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, p. 705-713, 2008.

ADELMAN, Z. N.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A. Development and applications of transgenesis in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 121, p. 1-10, 2002.

ALPHEY, L.; ANDREASEN, M. Dominant lethality and insect population control. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 121, p. 173-178, 2002.

ALPHEY, L.; BENEDICT, M.; BELLINI, R.; CLARK, G. G.; DAME, D. A.; SERVICE, M. W.; DOBSON, S. L. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. **Vector-Borne Zoonot.**, v. 10, p. 295-311, 2010.

ALPHEY, N.; BONSTALL, M. B.; ALPHEY, L. Modeling resistance to genetic control of insects. **J. Theor. Biol.**, v. 270, p. 42-55, 2011.

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

AMENYA, D. A.; BONIZZONI, M.; ISAACS, A. T.; JASINSKIENE, N.; CHEN, H.; MARINOTTI, O.; YAN, G.; JAMES, A. A. Comparative fitness assessment of *Anopheles stephensi* transgenic lines receptive to site-specific integration. **Insect. Mol. Biol.**, v. 19, p. 263-269, 2010.

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE. Malaria Vector Control in Africa: Strategies and Challenges. 2001. Disponível em: <<http://www.aaas.org/international/africa/malaria/toure>> Acesso em: 17 Dec. 2010.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AMSTERDAM, A.; LIN, S.; HOPKINS, N. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. **Dev. Biol.**, v. 171, p. 123-129, 1995.

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA, L. A.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 87, p. 253-256, 2003.

ARAUJO, R. V.; MACIEL, C.; HARTFELDER, K.; CAPURRO, M. L. Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. **J. Insect Physiol.**, v. 57, p. 265-273, 2011.

ARRIGHI, R. G.; NAKAMURA, C.; MIYAKE, J.; HURD, H.; BURGESS, G. Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malaras. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 46, p. 2104-2110, 2002.

ATKINSON, M. P.; SU, Z.; ALPHEY, N.; ALPHEY, L. S.; COLEMAN, P. G.; WEI, L. M. Analyzing the control of mosquito-borne diseases by a dominant lethal genetic system. **PNAS**, v. 104, p. 9540-9545, 2007.

ATKINSON, P. W.; PINKERTON, A. C.; O'BROCHITA, D. A. Genetic transformation systems in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 46, p. 317-346, 2001.

ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 661-675, 2005.

BEARD, C. B.; CORDON-ROSALES, C.; DURVASULA, R. V. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 47, p. 123-141, 2002.

BIAN, G.; SHIN, S. W.; CHEON, H. M.; KOKOZA, V.; RAIKHEL, A. S. Transgenic alteration of Toll immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. **PNAS**, v. 102, p. 13568-13573, 2005.

BIAN, G.; XU, Y.; LU, P.; XIE, Y.; XI, Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induce resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. 1-10, 2010.

BILLKER, O.; SHAW, M. K.; MARGOS, G.; SINDEN, R. E. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* *in vitro*. **Parasitol.**, v. 114, p. 1-7, 1996.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature**, v. 3, p., 238-250, 2005.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L.; HOFFMAN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 23, p. 329-344, 1999.

CAMARGO, E. P. A malaria encenada no grande teatro social. **Est. Avan.**, v. 9, n. 24, p. 211-228, 1995.

CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 1, p. 26-30, 2003.

CAPURRO, M. L.; COLEMAN, J.; BEERNTSEN, B. T.; MYLES, K. M.; OLSON, K.E. Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, p. 427-433, 2000.

CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 1991.

CARTER, R. Transmission blocking malaria vaccines. **Vaccine**, v.19, p. 2309-2314, 2001.

CARTER, V.; HURD, H. Choosing anti-*Plasmodium* molecules for genetically modifying mosquitoes: focus on peptides. **Trends. Parasitol.**, v. 26, p. 582-590, 2010.

CATTERUCCIA, F.; GODFRAY, H. C. J.; CRISANTI, A. Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. **Science**, v. 299, p. 1225-1227, 2003.

CARY, L. C.; GOEBEL, M.; CORSARO, B. G.; WANG, H. G.; ROSEN, E.; FRASER, M. J. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. **Virology**, v. 172, p. 156-169, 1989.

CATTERUCCIA, F.; BENTON, J. P.; CRISANTI, A. An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, p. 1414-1417, 2005.

CATTERUCCIA, F.; CRISANTI, A.; WIMMER, E. A. Transgenic technologies to induce sterility. **Malaria J.**, v. 8, p. 1-8, 2009.

CATTERUCCIA, F.; NOLAN, T.; BLASS, C.; MÜLLER, H. M.; CRISANTI, A.; KAFATOS, F. C.; LOUKERIS, T. G. Toward Anopheles transformation: Minos element activity in anopheline cells and embryos. **PNAS**, v. 97, p. 2157-2162, 2000a.

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, p. 959-962, 2000b.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **World Malaria Report 2009**. 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/features/world_malaria_report_2009> Acesso em: 16 Dec. 2010.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHERF, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.

CHAPMAN, R.F. **The Insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University, 1998. 770 p.

CHRISTOPHIDES, G. K. Transgenic mosquitoes and malaria transmission. **Cell. Microbiol.**, v. 7, p. 325-333, 2005.

CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes**. Londres: Chapman & Hall, 1992. v. 1, 509 p.

COATES, C. J.; 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, p. 317-325, 1998.

COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 712 p.

CORBY-HARRIS, V.; DREXLER, A.; DE JONG, L. W.; ANTONOVA, Y.; PAKPOUR, N.; ZIEGLER, R.; RAMBERG, F.; LEWIS, E. E.; BROWN, J. M.; LUCKHART, S.; RIEHLE, M. A.

Activation of *Akt* signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes. **PLoS Pathogens**, v. 6, p. 1-10, 2010.

COUTINHO-ABREU, I. V.; ZHU, K. Y.; RAMALHO-ORTIGÃO, M. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: Current status and future challenges. **Parasitol. In.**, v. 59, p. 1-8, 2010b.

COUTINHO-ABREU, I.V.; RAMALHO-ORTIGÃO, M. Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases- A review. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 1-12, 2010a.

EDWARDS, M. J.; LEMOS, F. J.; DONNELLY-DOMAN, M.; JACOBS-LORENA, M. Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito *Anopheles gambiae*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 27, p. 1063-1072, 1997.

EDWARDS, M. J.; MOSKALYK, L. A.; DONNELLY-DOMAN, M.; VLASKOVA, M.; NORIEGA, F. G.; WALKER, V. K.; JACOBS-LORENA, M. Characterization of a carboxypeptidase A gene from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, v. 9, p. 33-38, 2000.

ESTEVEES, E.; FOGAÇA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D.; MANSO, P. P.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 33, p. 913-919, 2009.

FINOKIET, M., GONI, B., LORETO, E.L.S. Genetic transformation of *Drosophila willistoni* using *piggyBac* transposon and GFP. **Braz Arch Biol Techn**, v. 50, p. 113-120, 2007.

FOGAÇA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 28, p. 191-200, 2003.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: EDUSP, 2002.

FRANZ, G.; SAVAKIS, C. Mimos, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the Tcl-like family of transposons. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 6646, 1991.

FUGLSANG, A. Codon optimizer: a freeware tool for codon optimization. **Protein Express Purif.**, v. 31, p. 247-249, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/guia_vig_epi_vol_11.pdf> Acesso em: 14 dez. 2010.

GARCIA, G. E.; WIRTZ, R. A.; BARR, J. R.; WOOLFITT, A.; ROSENBERG, R. Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 12003-12005, 1998.

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. **PNAS**, v. 98, p. 13278-13281, 2001.

GHOSH, A.; EDWARDS, M. J.; JACOBS-LORENA, M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 196-201, 2000.

GODWIN, A. R.; STADLER, H. S.; NAKAMURA, K.; CAPECCHI, M. R. Detection of targeted GFP-Hox gene fusions during mouse embryogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 13042-13047, 1998.

GOOD, M. F.; DOOLAN, D. L. Malaria Vaccine Design: Immunological Considerations. **Immunity**, v. 33, p. 555-566, 2010.

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.

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.

HORN, C.; SCHMID, B. G. M.; POGODA, F. S.; WIMMER, E. A. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. **Insect Biochem. Molec.**, v. 32, p. 1221-1235, 2002.

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

IRVIN, N.; HODDLE, M. S.; O'BROCHTA, D. A.; CAREY, B.; ATKINSON, P. T. Assessing fitness costs for transgenic *Aedes aegypti* expressing the GFP marker and transposase genes. **PNAS**, v. 101, p. 891-896, 2004.

ITO, J.; GHOSH, A.; MOREIRA, L. A.; WIMMER, E. A.; JACOBS-LORENA, M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. **Nature**, v. 417, p. 452-455, 2002.

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*, with the *Hermes* element from the housefly. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 3743-3747, 1998.

JASINSKIENE, N.; COLEMAN, J.; ASHIKYAN, A.; SALAMPESSY, M.; MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. Genetic control of malaria parasite transmission: threshold level for infection in an avian model system. **Am. J. Tro. Med. Hyg.**, v. 76, p. 1072-1078, 2007.

JIN, C.; REN, X.; RASGON, J. L. The virulent *Wolbachia* strain wMelPop efficiently establishes somatic infections in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 3373-3376, 2009.

JONES, M. K.; GOOD, M. F. Malaria parasites up close. **Nat. Med.**, v. 12, p. 170-171, 2006.

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.

KAROU, D.; DICKO, M. H.; SANON, S.; SIMPORE, J.; TRAORE, A. S. Antimalarial activity of *Sida acuta* Burm. F. (Malvaceae) and *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, p. 291-294, 2003.

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.

KOJIN, B.B. **Análise da expressão de regiões da proteína circunsporozoíta de *Plasmodium* SP. em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.** 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

KOKOZA, V.; AHMED, A.; SHIN, S. W.; OKAFOR, N.; ZOU, Z.; RAIKHEL, A. S. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **PNAS**, v. 107, p. 8111-8116, 2010.

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 pBac[3xP3-EGFP afm]. **Insect Biochem. Molec.**, v. 31, p. 1137-1143, 2001.

KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G.; FERRARI, W. M. S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat and malaria or plants randomly selected: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1033-1042, 2001.

LACRUE, A. N. **Characterization of the sporozoite and erythrocytic stages (SES) protein**. 2007. 143 p. Tese (Doutorado) - Faculdade da Escola de Pós-Graduação, Universidade de Missouri-Columbia, Columbia, 2007.

LAMAZIÈRE, A.; BURLINA, F.; WOLF, C.; CHASSAING, G.; TRUGNAN, G.; AYALA-SANMARTIN, J. Non-metabolic membrane tubulation permeability induced bioactive peptides. **PLoS One**, v. 2, p. 1-11, 2007.

LI, C.; MARRELLI, M. T.; YAN, G.; JACOBS-LORENA, M. Fitness of Transgenic *Anopheles stephensi* mosquitoes expressing the SM1 peptide under the control of a vitellogenin promoter. **J. Hered.**, v. 99, p. 275-282, 2008.

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

LOBO, N. F.; HUA-VAN, A.; LI, X.; NOLEN, B. M.; FRASER JR, M. J. Germ line transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, mediated by transpositional insertion of a *piggyBac* vector. **Insect Mol. Biol.**, v. 11, p. 133-139, 2002.

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

MACIEL, C.; DE OLIVEIRA JUNIOR, V. X.; FÁZIO, M. A.; NACIF-PIMENTA, R.; MIRANDA, A.; PIMENTA, P. F. P.; CAPURRO, M. L. Anti-*Plasmodium* activity of Angiotensin II and related synthetic peptides. **PLoS One**, v. 3, p. 1-8, 2008.

MARSHALL, J. M.; PITTMAN, G. W.; BUCHMAN, A. B.; HAY, B. A. Semele: A killer-male, rescue-female system for suppression and replacement of insect disease vector populations. **Genet.**, 2010, doi:10.1534/genetics.110.124479.

MATSUOKA, H.; IKEZAWA, T.; HIRA, M. Production of a transgenic mosquito expressing circumsporozoite protein, a malarial protein, in the salivary gland of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Acta. Med. Okayama**, v. 64, p. 233-241, 2010.

MATZ, M. V.; FRADKOV, A. F.; LABAS, Y. A.; SAVITSKY, A. P.; ZARAIISKY, A. G.; MARKELOV, M. L.; LUKYANOV, S. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 969-973, 1999.

MCCLINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. **Genetics**, v. 36, p. 344-355, 1950.

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 malarias: biological and phylogenetic implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 11889-11894, 1996.

MCGRANE, V.; CARLSON, J. O.; MILLER, B. R.; BEATY, B. J. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* OVA and detection of integration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 39, p. 502-510, 1988.

MEDHORA, M., MARUYAMA, K., HART, D.L. Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mosl* in *Drosophila*. **Genet**, v. 128, p. 311-318, 1991.

MENGE, D. M.; GUDA, T.; ZHONG, D.; PAI, A.; ZHOU, G.; BEIER, J. C.; GOUAGNA, L.; YAN, G. Fitness consequences of *Anopheles gambiae* population hybridization. **Malaria J.**, v. 4, p. 1-7, 2005.

MEREDITH, J. M.; BASU, S.; NIMMO, D. D.; LARGET-THIERY, I.; WARR, E. L.; UNDERHILL, A.; MCARTHUR, C. C.; CARTER, V.; HURD, H.; BOURGOUIN, C.; EGGLESTON, P. Site-specific integration and expression of an anti-malarial gene in transgenic *Anopheles gambiae* significantly reduces *Plasmodium* infections. **PLoS One**, v. 6, p. 1-9, 2011.

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. 14, p. 779-781, 1987.

MIRANDA, C. M. **Angiotensina II e peptídeos relacionados são ativos contra esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum***. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MOREIRA, C. K.; RODRIGUES, F. G.; GHOSH, A.; VAROTTI, F. P.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; JACOBS-LORENA, M.; MOREIRA, L. A. Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp. **Exp. Parasitol.**, v. 116, p. 346-353, 2007.

MOREIRA, L.; WANG, J.; COLLINS, F. H.; JACOBS-LORENA, M. Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. **Genetics Society**, v. 166, p. 1337-1341, 2004.

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, p. 10895-10898, 2000.

MOREIRA, L. A.; GHOSH, A. K.; ABRAHAM, E. G.; JACOBS-LORENA, M. Genetic transformation of mosquitoes: a quest for malaria control. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 1599-1605, 2002b.

MOREIRA, L. A.; ITO, J.; GHOSH, A.; DEVENPORT, M.; ZIELER, H.; ABRAHAM, E. G.; 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. 40839-40843, 2002a.

NIRMALA, X.; JAMES, A. A. Engineering *Plasmodium*-refractory phenotypes in mosquitoes. **Trends. Parasitol.**, v. 19, p. 384-387, 2003.

NIRMALA, X.; MARINOTTI, O.; SANDOVAL, J. M.; PHINA, S.; GAKHARB, S.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A. Functional characterization of the promoter of the vitellogenin gene,

AsVg1, of the malaria vector, *Anopheles stephensi*. **Insect Biochem. Molec.**, v. 36, p. 694-700, 2006.

NOLAN, T.; BOWER, M.; BROWN, A. E.; CRISANTI, A.; CATTERUCCIA, F. *piggyback*-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.

O'BROCHTA, D. A.; SETHURARAMAN, N.; WILSON, R.; HICE, R. H.; PINKERTON, A. C.; LEVESQUE, C. S.; BIDESHI, D. K.; JASINSKIENE, N.; COATES, C. J.; JAMES, A. A.; LEHANE, M. J. M.; ATKINSON, P. W. Gene vector and transposable element behavior in mosquitoes. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 3823-3834, 2003.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F. C.; JACOME, R. L. R. P.; VAROTTI, F. P.; POVOA, M. M. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines-Part I- Alkaloids. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 81, p. 715-740, 2009.

OLIVEIRA, F. Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A. U.; BRANDÃO, M. G. L. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 39-42, 2004.

PERERA, O. P.; HARRELL II, 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.

PINKERTON, A. C.; MICHEL, K.; O'BROCHTA, D. A.; ATKINSON, P. W. Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, v. 9, p. 1-10, 2000.

PLAUTZ, J. D.; DAY, R. N.; DAILEY, G. M.; WELSH, S. B.; HALL, J. C.; HALPAIN, S.; KAY, S. A. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. **Genes**, v. 173, p. 83-87, 1996.

PUIGBÒ, P.; GUZMA, E.; ROMEU, A.; GARCIA-VALLVE, S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. **Nucleic Acids. Res.**, v. 35, p. 1-6, 2007.

RAIKHEL, A. S.; DAHDIALA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 217-251, 1992.

RAIKHEL, A. S.; KOKOVZA, V. A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WNG, S. F.; LI, C.; SUN, G.; AHMED, A.; DITTMER, N.; ATTARDO, G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p. 1275-1286, 2002.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 350 p.

RIEHLE, M. A.; SRINIVASAN, P.; MOREIRA, C. K.; JACOBS-LORENA, M. Towards genetic manipulation of wild mosquito populations to combat malaria: advances and challenges. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 3809-3816, 2003.

RIEHLE, M. M.; MARKIANOS, K.; NIARE, O.; XU, J.; LI, J.; TOURÉ, A. M.; PODIOUGOU, B.; ODUOL, F.; DIAWARA, S.; DIALLO, M.; COULIBALY, B.; QUATARA, A.; KRUGLYAK, L.; TRAORÉ, S. F.; VERNICK, K. D. Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. **Science**, v. 312, p. 577-579, 2006.

RODRIGUES, D. G. **Efeito de peptídeos antimicrobianos em esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum***. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RODRIGUES, F. G.; SANTOS, M. N.; DE CARVALHO, T. X.; ROCHA, B. C.; RIEHLE, M. A.; PIMENTA, P. F.; ABRAHAM, E. G.; JACOBS-LORENA, M.; ALVES DE BRITO, C. F.; MOREIRA, L. A. Expression of a mutated phospholipase A2 in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development. **Insect Mol. Biol.**, v. 17, p. 175-183, 2008.

RODRIGUEZ, M. D. C.; ZAMUDIO, F.; TORRES, J. A.; CERON, L. G.; POSSANI, L. D.; RODRIGUEZ, M. H. Effect of a cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. **Exp. Parasitol.**, v. 80, p. 596-604, 1995.

RUBIN, G. M.; SPRADLING, A. C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. **Science**, v. 218, p. 348-353, 1982.

RUIZ, L.; RUIZ, L.; MACO, M.; COBOS, M.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A. L.; ROUMY, V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. **J. Ethnopharmacol.** 2010. doi:10.1016/j.jep.2010.10.039.

RYDER, E.; RUSSEL, S. Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila*. **Brief. Funct. Genomic. Proteomic.**, v. 2, p. 57-71, 2003.

SHAHABUDDIN, M.; FIELDS, I.; BULET, 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.

SHEG, G.; THOUVENOT, E.; SCHUCKER, D.; WILSON, D. S.; DESPLAN, C. Direct regulation of *rhodopsin 1* by *Pax-6/eyeless* in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. **Gene Dev.**, v. 11, p. 1122-1131, 1997.

SHERMAN, I. W. Malarial lipids. In: _____. **A Brief History of Malaria and Discovery of the Parasite's Life Cycle, in Malaria**: parasite biology, pathogenesis, and protection. Washington: ASM PRESS, 1998. p. 159-175.

SHIN, S. W.; KOKOZA, V. A.; RAIKHEL, A. S. Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 3835-3843, 2003.

SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C. P.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; CAMPOS, C. B.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 34735-34746, 2009.

SPERANÇA, M. A.; CAPURRO, M. L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 425-433, 2007.

SRINIVASAN, P.; ABRAHAM, E. G.; GHOSH, A. K.; VALENZUELA, J.; RIBEIRO, J. M. C.; DIMOPOULOS, G.; KAFATOS, F. C.; ADAMS, J. H.; FUJIOKA, H.; JACOBS-LORENA, M. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptomes during oocyst differentiation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 5581-5587, 2004.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS, **Controle integrado**. 2009. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/down/vetores_geral/den_contri.pdf> Acesso em: 17 dez. 2010.

TERENIUS, O.; MARINOTTI, O.; SIEGLAFF, D.; JAMES, A. A. Molecular genetic manipulation of vector mosquitoes. **Cell. Host. Microbe.**, v. 4, p. 417-423, 2008.

THOMAS, D. D.; DONNELLY, C. A.; WOOD, R. J.; ALPHEY, L. S. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. **Science**, v. 287, p. 2474-2476, 2000.

WATERHOUSE, R. M.; KRIVENTSEVA, E. V.; MEISTER, S.; XI, Z.; ALVAREZ, K. S.; BARTHOLOMAY, L. C.; BARILLAS-MURY, C.; CHRISTENSEN, B. M.; DONG, Y.; JIANG, H.; KANOST, M. R.; KOUTSOS, A. C.; LEVASHINA, E. A.; LI, J.; LIGOSYGAKIS, O.; MACCALLUM, R. M.; MAYTHEW, G. F.; PASKEWITZ, S.; SHIN, S. W.; VLACHOU, D.; WNAG, L.; WEI, W.; ZHENG, L.; ZOU, Z.; SEVERSON, D. W.; RAIKHEL, A. S.; KAFATOS, F. C.; DIMOPOULOS, G.; ZDOBNOV, E. M.; CHRISTOPHIDES, G. K. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. **Science**, v. 316, p. 1738-1743, 2007.

WATERS, A. P.; HIGGINS, D. G.; MCCUTCHAN, T. F. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 3140-3144, 1991.

WEBSTER, D. Malaria kills one child every 30 seconds. **J. Public Health Policy**, v. 22, p. 23-33, 2001.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 1084-1092, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health Topics**. 2010. Disponível em: <<http://www.new.paho.org/hq>> Acesso em: 08 Dec. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Media Center**. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacenter/factsheets>> Acesso em: 13 Dec. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2008**. 2008. Disponível em: [tp://www.who.int/malaria/wmr2008](http://www.who.int/malaria/wmr2008)> Acesso em: 08 Dec. 2010.

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.

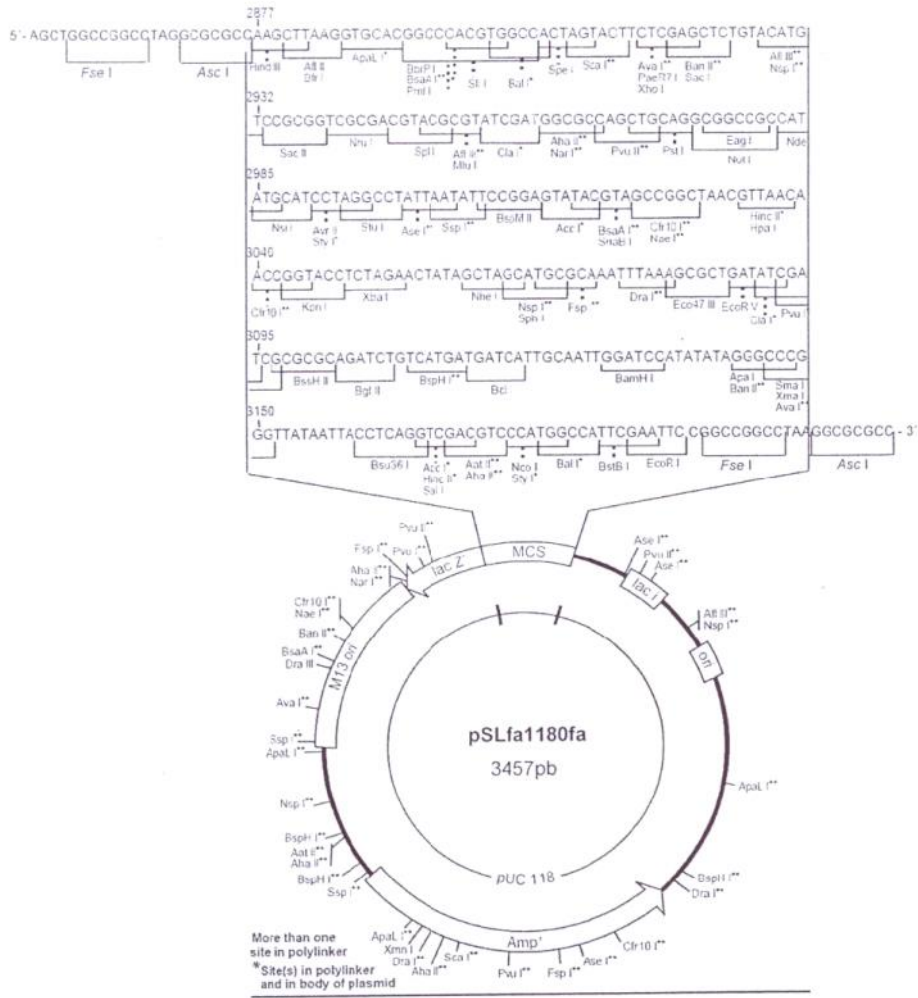
YOSHIDA, S.; SHIMADA, Y.; KONDOH, D.; KOUZUMA, Y.; GHOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M.; SINDEN, R. Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. 1962-1970, 2007.

YOSHIDA, S.; WATANABE, H. Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, p. 403-410, 2006.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

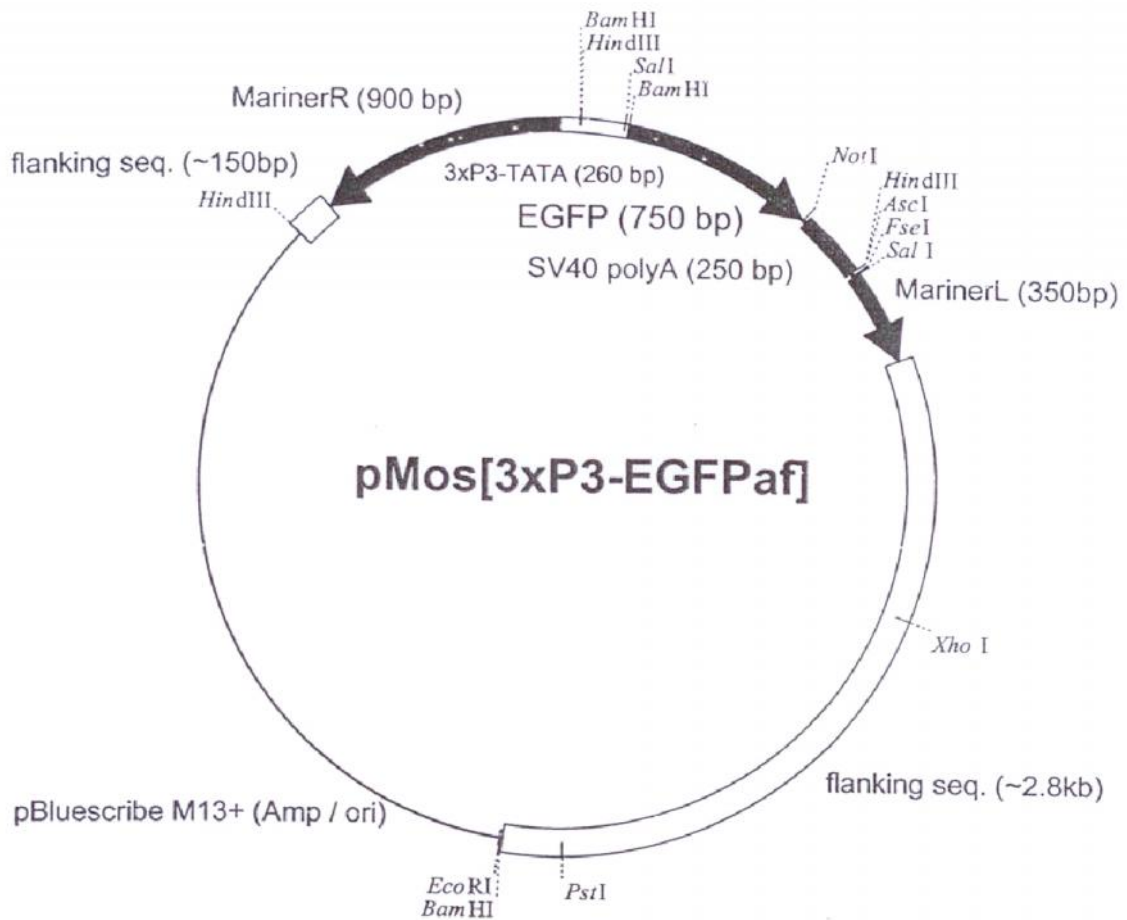
ZIELER, H.; KEISTER, D. B.; DVORAK, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. A snake venom phospholipase A2 blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. **J. Exp. Biol.**, v. 204, p. 4157-4167, 2001.

ANEXO A



Anexo A – Representação esquemática do plasmídeo pSLfa 1180fa.
FONTE: Modificado de www.amershambiosciences.com.

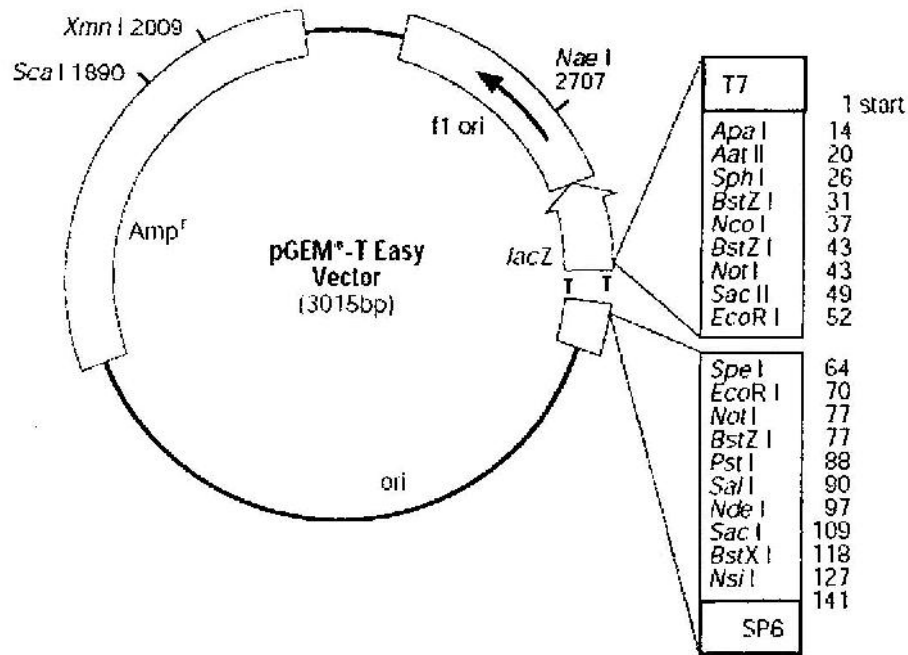
ANEXO B



Anexo B - Representação esquemática do vetor de transgênese doador *pMOS* [3xP3-EGFP].

Mariner R: braço direito do elemento de transposição *pMOS*; 3xP3: promotor de olho; EGFP: gene que codifica a proteína fluorescente melhorada; SV40: 3' UTR do vírus SV40; Mariner L: braço esquerdo do elemento de transposição *pMOS*.

ANEXO C

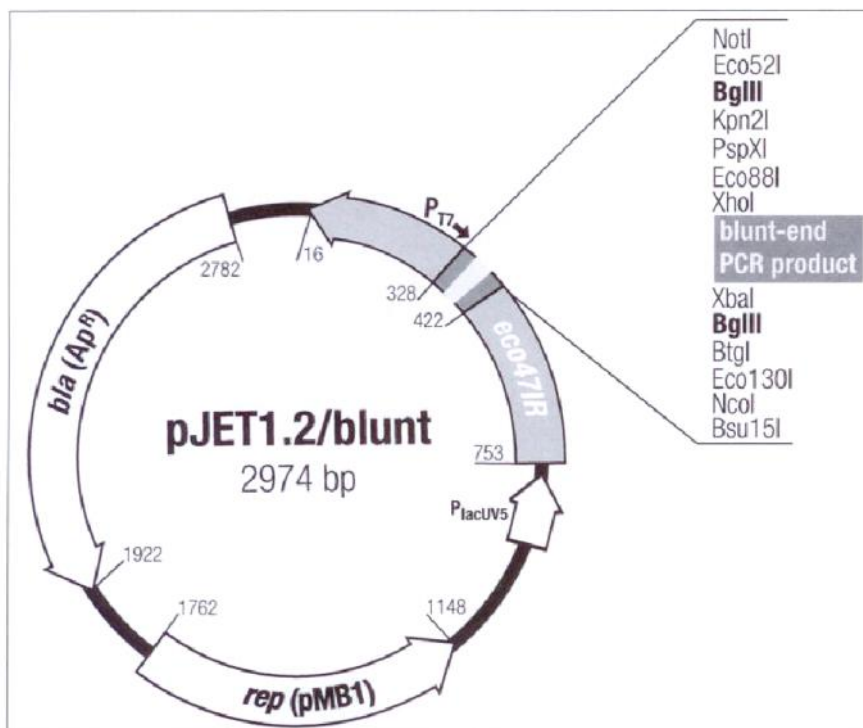


Anexo C – Mapa do vetor de clonagem pGEM®-T Vector.

Ori: origem de replicação; Lac Z: α -peptídeo-região codificadora da β -galactosidase; T7 e SP6: promotores da RNA polimerase que flanqueiam uma região de múltipla clonagem; T: local de inserção da molécula de DNA exógeno; f1 ori: região f1 fago; Amp: gene que confere resistência à ampicilina.

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

ANEXO D



Anexo D – Representação esquemática do vetor de clonagem pJET 1.2.
FONTE: Modificado de www.fermentas.com.

ANEXO E
