

ANDRÉ LUIS DA COSTA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE
GENES EXPRESSOS NO FINAL DO CICLO
GONOTRÓFICO DE *Aedes aegypti***

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

**São Paulo
2011**

ANDRÉ LUIS DA COSTA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE
GENES EXPRESSOS NO FINAL DO CICLO
GONOTRÓFICO DE *Aedes Aegypti***

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

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

Costa da Silva, André Luis.

Identificação e análise molecular de genes expressos no final do ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti* / André Luis Costa da Silva. -- 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: Identification and molecular analysis of genes expressed at the end of *Aedes aegypti* gonotrophic cycle

Descritores: 1. *Aedes aegypti* 2. Ciclo gonotrófico 3. Vitelogênese 4. *In silico* 5. Expressão gênica 6. Ovários I. Guimarães, Margareth de Lara Capurro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB050/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): André Luis Costa da Silva.

Título da Tese: Identificação e análise molecular de genes expressos no final do ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti*.

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)

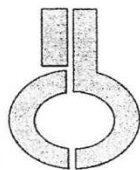
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **133** nas fls. **77** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Margareth de Lara Capurro Guimarães, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Abordagem inovadora no Controle da transmissão de dengue** do qual participou(aram) o(s) alunos **Láisa Sentieri Lorenti, Valéria da Silva Fonseca, Ceres Maciel de Miranda, André Luis da Costa da Silva, Soraia de Lima Oliveira, Kelly Nazaré da Silva Amorim, Diego Soares Azevedo, André Barreto Bruno Wilke e pesquisador Mauro Toledo Marrelli**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **29.10.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 29 de outubro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Prof^o Dr. Ariel M. Silber
Dpto. de Parasitologia
ICB - USP
asilber@usp.br

Dedico esta tese aos meus pais, Eliane e Angelo, e a minha
irmã Ana Paula, por sempre acreditarem em mim, pela
valiosa participação em todas minhas decisões,
pela nobre humildade, e acima de tudo,
pelo amor puro e incondicional.

Obrigado, minha doce
família!

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e amigos:

À minha namorada Priscila Migliori, meu amor e minha querida companheira, que esteve presente em cada momento deste processo e me proporcionou inúmeros ensinamentos grandiosos. Obrigado pelo amor, carinho, paciência, preocupação, por compreender e apoiar minha carreira, por compartilhar sua vida comigo e sempre me incentivar. Seu abraço foi o melhor cantinho nas horas mais difíceis, e seu sorriso foi força propulsora primordial para a conclusão deste trabalho, fenômenos que nenhum experimento consegue explicar! Priscila, você é a minha melhor descoberta!

À minha mãe Eliane, por ser esta mulher extraordinária e minha grande amiga, que me ensina belos valores a cada dia da nossa convivência. Obrigado por me ensinar o bom caráter, o altruísmo, o amor e a generosidade. Obrigado por sempre ter lutado pela minha vida, a começar pelo meu difícil nascimento, e por continuar acalmando, fortalecendo e alegrando meu coração em todos os sentidos da minha vida!

Ao meu incrível pai Angelo, pelo amor, carinho e amizade, pela eterna disposição e pelos exemplos de força e determinação. Obrigado por ter me ensinado a nunca desistir nas horas mais adversas, por ter mostrado que sempre há tempo para um recomeço e por me ensinar a ter paciência para enfrentar e transpor as dificuldades. Você é meu atleta predileto, exemplo nos esportes e na vida. Agora, acordar às 4:30 da manhã para ir correr com você já é demais!

À minha sempre irmãzinha Ana Paula, pelo amor e carinho, pelas conversas, pela amizade de Irmã com I maiúsculo. Obrigado por me ensinar a não abandonar um sonho, mesmo sendo árduo o caminho para alcançá-lo! Suas qualidades de persistência, criatividade, objetividade, dedicação e superação são inspiradoras e me encantam todos os dias. Continue assim e você será uma grande arquiteta e terá uma carreira brilhante!

À Nina, pela companhia, por fazer a alegria da casa e renovar minhas energias.

À Zélia, minha querida mãe de consideração, pelo cuidado e afeto e por todas as conversas divertidas que por muitas vezes sem ela saber, aliviaram a tensão nos momentos mais delicados.

Ao meu avô Alencar e minha avó Ida pelos laços de amor, carinho e por estarem sempre presentes em minha vida. Faço o mesmo agradecimento a todos familiares, tios, tias e primos por mim tão queridos!

Aos meus eternos amigos de colégio, de bandas de rock e da vida: Luiz Júnior (Juninho), Alexandre Gidaro (Alê), Thiago (Pizza), Marco Aurélio (Marquito), Thiago Oliveira (Thiagão), Otávio (Tato) e Guilherme (Guito) pelos momentos mais divertidos e felizes da minha existência!

Ao Caio Tomazelli, meu estimado cunhado, pelas ótimas conversas sobre atualidades e ciência e por ajudar na revisão de uma parte desta tese.

À família da Priscila por me receber de braços abertos, pelo carinho e por compreender meus atrasos e eventuais ausências.

Aos meus mestres:

À professora e orientadora Margareth Capurro por sempre confiar em mim e em meu trabalho, pelas oportunidades profissionais, pelo apoio e constante incentivo. Obrigado por compartilhar tantas experiências científicas e pessoais e por ensinar a importância de ser uma pessoa expansiva e comunicativa, que possui a mente aberta para absorver constantemente novas oportunidades e conhecimentos. Obrigado por estar sempre disponível para qualquer discussão científica e por tornar o laboratório um ambiente agradável e divertido. E a gente ainda vai tirar nossos transgênicos!

Ao professor Antonio Gildo de Bianchi, pesquisador detentor de carreira acadêmica notável, responsável pela formação de uma nova geração de doutores, os quais foram meus professores durante a pós-graduação. Por ter tido o privilégio de ser seu orientando durante o primeiro ano de mestrado (até o exame de qualificação para o

doutorado direto), pelas conversas científicas sempre tão enriquecedoras e por compartilhar sua sabedoria, experiência e entusiasmo com todos do laboratório.

Ao professor José Eduardo Bracco (SUCEN), melhor dizendo, meu querido e eterno orientador Zeca. Obrigado por ter me apresentado ao *Aedes aegypti*, e por ter ensinado os primeiros passos dentro de um laboratório de pesquisa e no mundo prático da biologia molecular. Seu rigor e seus ensinamentos minuciosos e detalhistas foram tão sólidos e fundamentais que “alteraram meu DNA” e serão levados eternamente comigo para serem aplicados constantemente em minha vida científica.

Ao professor Gerhard Wunderlich pela prontidão em me ajudar, pelas valorosas sugestões e discussões, por disponibilizar os equipamentos do seu laboratório sem cerimônias, pelo exemplo de motivação, pelos seminários brilhantes e acima tudo, pelo privilégio de ter sido aluno na sua disciplina e ter aprendido muito com suas aulas.

Ao professor Carlos Eduardo Winter por sempre me receber prontamente em seu laboratório, pelas ajudas ao longo do doutorado, pelas dicas e idéias sugeridas com valoroso entusiasmo. Pelo constante interesse e por compartilhar seu gigantesco conhecimento científico com tanta humildade. Com todo respeito, agora eu sei que o professor Pardal existe em carne e osso e além de tudo, adora *Caenorhabditis elegans*!

À professora Alcira Tania Bijovsky de Katzin pelos conselhos científicos e sugestões, pelo apoio sempre encorajador, pelas ricas conversas informais e principalmente por não se preocupar apenas com aspectos profissionais, mas com o meu bem-estar.

Ao professor Mauro Marelli, professor da Faculdade de Saúde Pública da USP pelo suporte em momentos cruciais à minha formação, pelos conselhos e preocupação com a minha carreira, por confiar em meu trabalho e pela amizade.

Ao professor Ariel Silber pela confiança, consideração e palavras de incentivo. Pelos momentos de descontração nas curtas conversas pelos corredores do ICB, porém cheias de conhecimento e entusiasmo. Foi muito bom ter sido aluno em seu

curso no início da minha pós-graduação e ter aprendido um pouco sobre o “mundo” dos transportadores de aminoácidos de *Trypanosoma cruzi*.

À professora Sirley Daffre pelo constante apoio e incentivo, pelas conversas científicas, pelos conselhos sempre tão valorosos, por todas as ajudas e pela simpatia ao me receber em seu laboratório. Sua disciplina da pós foi a primeira que cursei e me ajudou muito a entender como um artigo deve ser lido realmente.

À querida professora Márcia Aparecida Sperança pelos ensinamentos no início deste trabalho, pelas valiosas sugestões na redação do projeto inicial e por ser uma fonte inspiradora de sabedoria, caráter, humildade, serenidade e entusiasmo.

Ao professor Paulo Ribolla da UNESP de Botucatu, por ter aberto as portas de seu laboratório e ter me acolhido com atenção durante minha visita. Por todas as ótimas conversas profissionais e informais que tivemos em várias ocasiões.

Às professoras Silvia Uliana, Silvia Alfieri e Marta Teixeira pelo carinho nas curtas conversas nos corredores, pela consideração e ajuda, e por me incentivarem a buscar meus objetivos científicos.

To professors Anthony James, Osvaldo Marinotti and specially for Jennifer Juhn from UCI University, California, for valuable suggestions and important collaboration in hybridization *in situ* experiments in this project.

To professor Erol Fikrig and Post-doc and Dr. Tonya Colpitts, for the opportunity to conclude some experiments for my thesis at Yale School of Medicine, New Haven. For the welcoming, scientific discussions and exchange of experience. Tonya, thanks for teaching me the pronunciation of “course”, simple like a horse”, and many other funny moments, here in Brazil and after at USA! To Debbie Beck from Yale School of Medicine, for receptivity, for helped me so many times in laboratory during my one month stay at New Haven and for your positive energy!

Ao professor Coutinho, do colégio Argumento-Objetivo por me ensinar Botânica de uma forma tão empolgante e por amadurecer minha compreensão e amor pela

Biologia. Ao professor Douglas Mascara, da Universidade de Mogi das Cruzes pela co-orientação durante minha iniciação científica, pelas belas aulas de Bioquímica e Evolução na Faculdade, pelos ensinamentos e por ter me indicado para o laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica de Vetores da SUCEN. Aos doutores Luiz Roberto Nunes, Regina Lucia Batista da Costa de Oliveira, Maria Santina de Castro Morini e Vítor Fernandes Oliveira de Miranda, meus professores inesquecíveis e estimados da Universidade de Mogi das Cruzes pelo apoio, incentivo e por todo conhecimento compartilhado.

Ao professor Marcelo Jacobs-Lorena da Johns Hopkins University, por todas as discussões científicas e não científicas que tivemos durante os encontros em congressos, pelo apoio que antecedeu a apresentação mais importante da minha vida, pela simpatia, pela confiança e oportunidades oferecidas.

Aos amigos do laboratório de mosquitos geneticamente modificados do departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da USP:

À doutora Bianca Burini Kojin por sempre, sempre e sempre confiar em meu trabalho e acreditar no meu potencial, por me ouvir a qualquer hora e me orientar em todas as decisões tomadas, por todas as ajudas incontáveis e por todos os empurrões motivacionais cheios de energia incomparável. Você é a pessoa que me fez enxergar longe, seu incentivo ampliou meus horizontes, e sua amizade é um laço que quero preservar para toda vida. Desejo o melhor para sua carreira como cientista e como mãe de uma jóia tão linda!

À quase doutora e mestre Ceres Maciel de Miranda pelo companheirismo e pelo ombro amigo nas horas mais difíceis, importantes e decisivas. Seu carinho, preocupação, confiança e prestabilidade foram essenciais durante esta longa jornada. Obrigado por todas as conversas agradáveis, tristes, divertidas, científicas, de cunho profissional ou pessoal, que me fizeram refletir no destino do meu barquinho, enquanto estávamos voltando à Zona leste ou “lost” tarde da noite! Você é minha irmãzinha do coração e desejo ótimos frutos nos novos caminhos científicos, e na iminente nova família!

Ao doutor Ricardo Vieira Araújo por todos os ensinamentos, sobretudo durante meu começo neste laboratório. Você é a pessoa mais divertida que conheci e sem dúvida, a mais forte também! Obrigado por todos os exemplos de superação e lições de vida, por todas as conversas e conselhos, pela confiança, por acreditar no meu potencial, por ser um grande amigo e por me ensinar a ser menos quadrado!

À doutora Fabiana Feitosa, pós-doutoranda da Yale School of Medicine, pelo apoio e incentivo durante todo o tempo que estive no laboratório MGM, por me introduzir ao mundo do RNA e pelos protocolos, pelas lições de força e por transmitir determinação sempre. Obrigado por todas as ajudas essenciais durante este processo e também durante minha estada na Yale School of Medicine, New Haven.

Ao biólogo João Vicente de Camargo e Silva (Johnny) pelo apoio e pelas intensas discussões científicas, filosóficas, éticas e pessoais. Realmente aprendi muito com você e obrigado também por me ensinar técnicas avançadas de “como se tornar um pegador profissional na balada!” Agora, perguntem se eu me tornei um?!

Às mestres Fernanda Rosa, Thalita Borges e Daniela Rodrigues pelo convívio diário tão agradável e divertido durante o tempo em que vocês estiveram no laboratório. Agradeço pelo carinho, pelas discussões, por compartilharem experiências científicas e de vida e por serem parte integrante deste processo.

À Laisa Lorenti, minha querida aluna adotiva de iniciação científica e futura bióloga, se não sair pelo mundo vendendo sua arte! Obrigado por ter sido uma grande companheira em discussões científicas, em experimentos e em parcerias. Sua amizade, carinho e incentivo me ajudaram muito e fizeram toda diferença em várias etapas deste projeto. Aprendemos muitas coisas juntos, como lisar células no ultra-som e outras aventuras! Mas realmente espero ter transmitido bons ensinamentos. Você tem um talento enorme e quero trabalhar em mais projetos com você no futuro, principalmer com *Anopheles aquasalis*, é claro! E aí, vai topar Valdinha?!

À nova geração do laboratório: Soraia, pelo carinho e amizade, pelos agradáveis bate-papos, pela maturidade compartilhada e por mostrar na prática e com muito

trabalho que nunca é tarde para correr atrás dos nossos sonhos; Danilo, pela amizade, pelos momentos de descontração, pelas palavras nobres, pelos exemplos de atitude e dedicação e por me apresentar o mojito (haha!) durante o curso de Biossegurança na Colômbia; Rafaella, pelo carinho e nova amizade e por me entusiasmar com sua dedicação e interesse desde a redação do projeto; Diego, pelo respeito, por me ouvir atentamente, por confiar e seguir minhas dicas científicas.

À técnica Neuza (querida Neuzinha) por me impressionar com sua humildade, generosidade, disposição e alegria em viver - qualidades que não se abalam nunca, independente das circunstâncias. Obrigado por compartilhar este grande ensinamento.

À técnica Lurdes por manter o laboratório sempre em ordem e deixar todos os materiais limpos e prontos para o uso, pelo carinho e pelas conversas matinais.

À técnica e futura bióloga Ediane pelos auxílios em experimentos, pelas conversas do cotidiano, brincadeiras, risadas e momentos de sudorese no insetário, principalmente durante a manutenção de *Anopheles aquasalis*. Já estava esquecendo: e por admitir que o time do Corinthians é o melhor, melhor até que o São Paulo! Para terminar, quando iremos ao Big X Picanha mesmo?

À bióloga, técnica e futura mamãe Isabel, recém chegada ao grupo, pelas boas palavras e solicitude. Infelizmente não houve tempo para nos conhecermos melhor, mas desejo boa sorte em sua carreira!

Aos amigos do laboratório da professora Tânia, meus queridos “culequentos”:

Ao doutor André Cardoso, vulgo cabelo, pela grande amizade cultivada ao longo destes anos e por todas as ajudas e discussões científicas. Sua paixão pela pesquisa e dedicação aos seus projetos são contagiantes. Você é um cara com um caráter especial, possuidor de uma humildade admiradora e com um senso de humor quase inabalável, que alegra a vida de todos ao seu redor. Nossa parceria científica foi ótima e espero colaborar contigo em muitos outros projetos!

Ao amigo, técnico e agora Farmacêutico Alexandre Santos de Moura por ter participado no sequenciamento de amostras da minha iniciação científica (parece que foi ontem a gente conversando na salinha do sequenciador, lembra?), por ter acompanhado toda a construção desta tese e ter sido sempre prestativo. Você possui um coração enorme e merece toda felicidade do mundo.

Ao mestre e estudante de doutorado Fabinho, meu estimado amigo Fio, por todas as conversas, por estar sempre presente, mesmo acompanhando de mais longe agora, e pelos ótimos momentos que tivemos em congressos, viagens de lazer, baladas, finais de semana e outros tantos outros memoráveis.

À quase farmacêutica e pequena Larissa, tão grande em seu potencial e dedicação, pelos bate-papos agradáveis nos almoços ou na “fila do termociclador”.

Aos amigos do departamento de Parasitologia e de outras instituições:

Ao André Wilke (Picachu), mestre e doutorando da Faculdade de Saúde Pública, pela amizade e por todas as conversas, discussões e bate-papos durante os cafés vespertinos. Sem dúvida é uma das pessoas mais positivas e motivadas que já conheci. Valeu por todas as risadas e períodos de descontração, por compartilhar sua biblioteca cerebral, por se preocupar com minha carreira e minha realização pessoal.

À Alessandra Fratus, mestre e doutoranda, por toda ajuda com o protocolo de expressão de proteínas recombinantes, pela participação nos experimentos, pela simpatia e por compartilhar suas fotos maravilhosas.

À doutora Daniela Almenara, por ser esta pessoa dotada de sabedoria notável e precisa, por sempre me receber de forma tão gentil e solícita no laboratório e por todas as ajudas que fizeram uma boa diferença neste projeto.

Ao doutor Fernando e a estudante Maira, pelas conversas descontraídas, pelas ajudas com os rotores e centrífugas e por serem sempre tão cordiais. Também ao mestre Rodrigo Belmonte, pelas ajudas bioquímicas e discussões científicas.

À estudante de doutorado e mestre Bianca Cechetto Carlos, minha amiga do interiorrrrrr. No começo ela dizia que nunca moraria em São Paulo, mas os caminhos da vida a trouxeram para a cidade grrrande! Muito obrigado por todas as ajudas com *Anopheles aquasalis*, receptividade durante minhas visitas à UNESP de Botucatu e por ser uma pessoa tão agradável e gentil.

Ao doutor e pós-doutorando Jayme Netto, por todos os emails com ajudas e dicas e por ter gentilmente me recebido nas minhas visitas à Botucatu e posteriormente à Johns Hopkins.

Aos técnicos: Manuel Aparecido Peres, por ter realizado inoculações em camundongos, por estar sempre disponível para ajudar, pelos “bons-dias” cheios de disposição, pela tranquilidade e humildade; Márcio Massao Yamamoto, por sequenciar grande parte das amostras deste trabalho, pelas dicas nos ajustes de protocolo de sequenciamento, pelo profissionalismo e serenidade.

Às queridas secretárias Wilma Garcia de Souza, Angela Maria Casemiro de Jesus e Sabrina Moraes de Freitas por toda a prestabilidade nas tarefas acadêmicas extra-laboratoriais e por sempre me receberem com atenção e carinho na secretaria. E à Sandra Regina Alexandre por me ajudar com a parte burocrática do projeto, por sanar dúvidas em relação ao Biotério, pela atenção, carinho e pelos bate-papos tão agradáveis.

A todos os funcionários e colegas do departamento de Parasitologia e para todos aqueles que porventura foram momentaneamente esquecidos aqui, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e merecem um sincero agradecimento.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho e ao longo de minha formação científica e acadêmica.

“Nada em Biologia faz sentido, exceto à luz da evolução”
(Theodosius Dobzhansky)

“O mundo e o universo são lugares extremamente
belos, e quanto mais os compreendemos
mais belos eles parecem.”
(Richard Dawkins)

RESUMO

COSTA-DA-SILVA, A. L. **Identificação e análise molecular de genes expressos no final do ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti***. 2011. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As fêmeas da espécie *Aedes aegypti* apresentam enorme capacidade reprodutiva. Compreender a fisiologia da reprodução deste mosquito, vetor primário dos vírus causadores de dengue e de febre amarela, é uma etapa básica para o desenvolvimento de novos métodos de controle do vetor. Baseado nesta premissa, estudos de expressão gênica durante o ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti* foram realizados neste trabalho e foram explorados genes ativados pelo repasto sanguíneo na fase de término do período vitelogênico, uma vez que modificações disparadas pela hematofagia na fase de síntese concentram a maioria dos estudos de expressão gênica diferencial. Depois de varredura em banco de dados, buscas por similaridade, análises comparativas *in silico* e experimentos de RT-PCR, foram encontrados seis genes com expressão elevada na fase de término do período vitelogênico e três deles são expressos em ovários 48 horas após o repasto. Interessantemente, foi mostrado que o gene AAEL01714, anotado *in silico* como codificante para uma proteína ligadora de odor atípica OBP45 (ZHOU et al., 2008), é transcrito nas células foliculares que envolvem os oócitos. Foram sequenciados 2.5 kb da região a montante deste gene e sítios preditos de ligação de fatores de transcrição foram detectados neste fragmento. A caracterização da sequência completa do cDNA do transcrito AAEL010714 levou a identificação de uma fase aberta de leitura (ORF) que, teoricamente traduzida, gera uma proteína com a região C-terminal mais longa em relação à proteína codificada pelo gene AAEL010714, anotada no VectorBase. Assim, a sequência protéica foi nomeada de OBP45B atípica. Experimentos de *Western blot* evidenciaram que esta proteína é sintetizada nos ovários. Este estudo descreve a primeira caracterização molecular de um gene de *Aedes aegypti* que codifica para uma OBP atípica, expressa em ovários.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Ciclo gonotrófico. Vitelogênese. *In silico*. Expressão gênica. Ovários. OBPs. Mosquitos transgênicos.

ABSTRACT

COSTA-DA-SILVA, A. L. **Identification and molecular analysis of genes expressed at the end of *Aedes aegypti* gonotrophic cycle.** 2011. 186 p. Ph. D. Thesis (Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The females of *Aedes aegypti* species have enormous reproductive capacity. Understanding reproductive physiology of this mosquito, the primary vector of the viruses that cause dengue and yellow fever, is a basic step to develop new vector control methods. Based on this premise, studies on gene expression during *Aedes aegypti* gonotrophic cycle were performed in this work and genes activated by blood meal at the end phase of vitellogenic period were explored, once modifications triggered by hematophagy at the synthesis phase comprise the majority of studies on differential gene expression. After scanning the database, similarity searches, *in silico* comparative analysis and RT-PCR experiments, we found six genes with high expression at the end phase of the vitellogenic period and three of them are expressed in ovaries 48 hours after blood meal. Interestingly, it was shown that the gene AAEL01714, *in silico* annotated as encoding for atypical odorant binding protein OBP45 (ZHOU et al., 2008), is transcribed in the follicle cells surrounding the oocyte. The 2.5 kb upstream region of this gene was sequenced and transcription factors binding sites were predicted in this fragment. Characterization of AAEL010714 full length cDNA led us to identify an open reading frame (ORF), which theoretical translation encodes for a protein with a C-terminal region longer in relation to a protein encoded by the gene AAEL010714, annotated in VectorBase. Thus, the protein sequence originated from ORF theoretical translation was named as atypical OBP45B. *Western blot* experiments showed that this protein is synthesized in the ovaries. This study describes the first molecular characterization of an *Aedes aegypti* gene encoding for an atypical OBP that is expressed in ovaries.

Key words: *Aedes aegypti*. Gonotrophic cycle. Vitellogenesis. *In silico*. Gene expression. Ovaries. OBPs. Transgenic mosquitoes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Preservação de insetos em resina vegetal fossilizada denominada âmbar ...34
- Figura 2** - Ciclo de vida holometábolo de um mosquito, exemplificado pela espécie *Aedes aegypti*.....35
- Figura 3** - Capas de 2 edições do jornal acadêmico *Science*, com destaque para a conclusão do sequenciamento dos genomas de duas espécies de mosquitos.36
- Figura 4** - Distribuição mundial de dengue, febre amarela e do mosquito *Aedes aegypti*, vetor principal dos agentes etiológicos de ambas as doenças.....38
- Figura 5** - Identificação do mosquito adulto de *Aedes aegypti* através da ornamentação em forma de lira.39
- Figura 6** - Fêmeas de *Aedes aegypti* durante e após o processo de hematofagia, com marcante alteração morfológica no abdômen.43
- Figura 7** - Diagrama esquemático do processo de vitelogênese, disparado pelo repasto sanguíneo.....46
- Figura 8** - Representação esquemática dos títulos de hormônios e níveis de transcrição de genes envolvidos na cascata hierárquica disparada pela alimentação sanguínea de *Aedes aegypti*, durante os períodos do processo de vitelogênese.47
- Figura 9** - Representação esquemática do algoritmo para busca manual de candidatos gênicos tardios em banco de dados.....55
- Figura 10** - Esquema de produção de RNA dupla-fita (dsRNA) com molde de cDNA clonado em vetor.....90

Figura 11 - Representação gráfica dos perfis de expressão de 33 genes de <i>Anopheles gambiae</i> identificados no banco angAGEDUCI.	976
Figura 12 - Amplificação genômica de fragmentos dos 6 genes candidatos de <i>Aedes aegypti</i>	101
Figura 13 - Perfil temporal de transcrição pela técnica de RT-PCR dos genes selecionados de <i>Aedes aegypti</i>	103
Figura 14 - Perfil espacial de transcrição pela técnica de RT-PCR dos genes tardios selecionados de <i>Aedes aegypti</i>	105
Figura 15 - Amplificações e clonagens dos fragmentos de aproximadamente 150 pb para geração das curvas-padrão gene específicas.....	106
Figura 16 - Exemplo de quantificação do número de cópias para cada gene estudado através da técnica de RT-PCR em tempo real.	107
Figura 17 - Exemplos de curvas de dissociação obtidas nos experimentos de quantificação dos genes analisados em aparelho Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf).	108
Figura 18 - Quantificação do acúmulo de transcritos dos genes AAEL000377 e AAEL000714 por RT-PCR em tempo real em fêmeas vitelogênicas de <i>Aedes aegypti</i>	110
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão do clone parcial do transcrito AAEL010714.	112
Figura 20 - Esquema simplificado de um par de ovários de mosquito.	113

Figura 21 - Hibridização <i>in situ</i> de sondas de RNA senso e anti-senso de AAEL010714 em folículos ovarianos de <i>Aedes aegypti</i>	114
Figura 22 - Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 mediante a infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	115
Figura 23 - Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 em fêmeas virgens e copuladas de <i>Aedes aegypti</i>	116
Figura 24 - Esquema da estratégia de subclonagem do fragmento de cDNA parcial do transcrito AAEL010714 para obtenção do vetor de expressão, e géis de agarose mostrando os resultados das etapas de subclonagem.	119
Figura 25 - Expressão da proteína recombinante AAEL010714 fusionada à GST.....	120
Figura 26 - Amplificação e clonagem da região 2,5 kb a montante do ATG inicial putativo do gene AAEL010714.....	121
Figura 27 - Alinhamento da sequência nucleotídica do promotor putativo do gene AAEL010714.	122
Figura 28 - Reações de 5'- e 3- RACE para amplificação das extremidades do transcrito AAEL010714.	124
Figura 29 - Sequência nucleotídica e composição predita de aminoácidos do gene AAEL010714 de <i>Aedes aegypti</i>	125
Figura 30 - Alinhamento das sequências do gene AAEL010714.....	126
Figura 31 - Alinhamento e árvore por método neighbor-joining de 4 polipeptídeos maduros preditos de OBPs atípicas de <i>Aedes aegypti</i>	129

Figura 32 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% de extratos de proteína total de ovários e <i>Western blot</i> para detecção da proteína AaegOBP45B.	131
Figura 33 - Eletroforese dos produtos de dsRNA de AAEL010714 e DsRED gerados por transcrição <i>in vitro</i>	132
Figura 34 - Quantidade relativa de transcritos de AAEL010714 em fêmeas injetadas com 2 µg de dsRNA de AAEL010714, controle DsRED ou apenas água.	133
Figura 35 - Comparação de número de ovos ovipostos por fêmea injetada com 2 µg de dsRNA de AAEL010714, controle DsRED ou apenas água.....	134
Figura 36 - Comparação de parâmetros de fertilidade entre fêmeas injetadas com 2 µg de dsRNA de AAEL010714, controle DsRED ou apenas água.....	135
Figura 37 - Esquema para o teste da hipótese de funcionamento do possível promotor de 1 kb do gene AAEL010714 em linhagens transgênicas de <i>Aedes aegypti</i>	137
Figura 38 - Esquema das etapas de clonagem e subclonagem para construção do vetor de transformação para teste de promotor <i>pMos</i> [3xP3-EGFP-DsRED].	138
Figura 39 - Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do gene marcador DsRED contendo a região 3'-UTR do vírus SV40 e dos produtos de digestão de DNA dos plasmídeos pCR [®] 2.1-DsRED e <i>pMos</i> [3xP3-EGFP-DsRED], gerados nas etapas de clonagem e subclonagem do gene marcador.....	139
Figura 40 - Esquema das etapas de amplificação, clonagem e subclonagem para inserção do promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714 no vetor <i>pMos</i> [3xP3-EGFP-DsRED], gerando o vetor de transformação <i>pMos</i> [3xP3-EGFP- promotor1kb-DsRED].	140

Figura 41 - Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714 e dos produtos de digestão do DNA dos plasmídeos pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb e *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED], gerados nas etapas de clonagem e subclonagem do do promotor putativo.141

Figura 42 - Representação esquemática do vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP-Promotor1kb -DsRED] e eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão do DNA de plasmídeo *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED] antes e após recombinação, para obtenção de mapa de restrição.145

Figura 43 - Esquema das etapas de amplificação, clonagem e subclonagem para inserção do gene quimérico [promotor 1kb AAEL010714-DsRED] no DNA do vetor *pMos*[3xP3-EGFP], gerando o vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP- promotor1kb-DsRED] em nova orientação cabeça-cauda.....147

Figura 44 - Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714 e dos produtos de digestão do DNA dos plasmídeos pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb e pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb-DsRED.....148

Figura 45 - Eletroforese em gel pjet 1.2-Promotor 1 kb-DsRED e *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED] com nova orientação, gerados nas etapas de clonagem e subclonagem.....149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nos experimentos de PCR, RT-PCR e RT-PCR em tempo real para amplificação de fragmentos dos genes candidatos.....	57
Tabela 2 - Iniciadores utilizados nos experimentos de RT-PCR e RT-PCR em tempo real para amplificação de fragmentos dos genes constitutivos.	57
Tabela 3 - Iniciadores gene - específico (GSPs) utilizados nos experimentos de amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE).	81
Tabela 4 - Iniciadores utilizados nos experimentos de amplificação, clonagem, sequenciamento da região a montante do gene AAEL010714, e na construção dos vetores para análise funcional do promotor de 1kb.....	84
Tabela 5 - Genes com expressão restrita 48 horas após o repasto de <i>Anopheles gambiae</i> e resultado da busca por seqüências similares contra o banco de <i>Aedes aegypti</i> da TIGR gene indices.	95
Tabela 6 - Resultado da análise por blastn dos transcritos selecionados de <i>Anopheles gambiae</i> do banco angaGEDUCI contra os ESTs de <i>Aedes aegypti</i> depositados no banco da TIGR gene indices.	98
Tabela 7 - Sumário das análises de atualização no banco VectorBase dos candidatos de ESTs de <i>Aedes aegypti</i> selecionados no banco da TIGR gene indices.....	99
Tabela 8 - Resultado dos experimentos de microinjeção em ovos embrionados de <i>Aedes aegypti</i>	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – micrograma

μL – micro Litro

μM – micromolar

CDC – Centers for disease control and prevention

DEPC – dietil-pirocarbonato

DEN – vírus dengue

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO – densidade óptica

dNTP – desoxirribonucleosídeo trifosfato

DTT – dietiltreitól

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

ESTs – expressed sequence tags (etiquetas de sequências expressas)

IPTG – isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo

kb – kilobase

kDa – kilodalton

LB – meio de cultura Luria-Bertani

M – Molar

mL – mililitro

mM – milimolar

nL – nano Litro

OBPs – proteínas ligadoras de odor

pb – pares de bases

PBS – salina tamponada com fosfato

PMSF – fluoreto de fenilmetano sulfonila

PCR – reação em cadeia da polimerase

p/v – porcentagem peso-volume

q – quantitativo

RNA – ácido ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

SDS – duodecil sulfato de sódio

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato-EDTA

TE – Tris-EDTA

TIGR – The institute for genomic research

TEMED - N, N, N', N', - tetrametil-etilenodiamina

U – unidade

UTR – região não-traduzida

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	32
1.1 Mosquitos – aspectos gerais	33
1.2 <i>Aedes aegypti</i>	37
1.3 Alimentação sanguínea, vitelogênese e produção de ovos	42
2 OBJETIVOS	49
2.1 Geral	50
2.2 Específicos	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Animais	52
3.1.1 <i>Colônia e manutenção de <i>Aedes aegypti</i> em insetário</i>	52
3.1.2 <i>Manutenção de <i>Gallus gallus domesticus</i></i>	53
3.1.3 <i>Manutenção de <i>Plasmodium gallinaceum in vivo</i></i>	53
3.2 Análises <i>in silico</i>	54
3.2.1 <i>Busca de candidatos</i>	54
3.2.2 <i>Atualizações das análises <i>in silico</i> nos bancos TIGR gene indices e VectorBase</i>	55
3.3 Iniciadores usados nas análises de transcrição	56
3.3.1 <i>Iniciadores para os genes candidatos</i>	56
3.3.2 <i>Controles endógenos (genes normalizadores)</i>	56
3.4 Extrações de ácidos nucléicos	58
3.4.1 <i>Extração de DNA genômico</i>	58
3.4.2 <i>Extração de RNA total</i>	59

3.5 Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose	60
3.5.1 <i>Eletroforese de DNA</i>	60
3.5.2 <i>Eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante</i>	60
3.6 Amplificação de DNA	61
3.7 Amplificação e análise temporal de perfil de transcrição por RT-PCR	62
3.7.1 <i>Quantificação de RNA total</i>	62
3.7.2 <i>Tratamento de RNA total com DNase</i>	62
3.7.3 <i>Síntese da 1ª fita de DNA complementar (cDNA)</i>	63
3.7.4 <i>PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando moldes de cDNA</i>	63
3.8 RT-PCR em tempo real	64
3.8.1 <i>Preparação do DNA de plasmídeos e geração de curvas-padrão</i>	64
3.8.2 <i>Quantificação dos transcritos</i>	65
3.9 Bactérias utilizadas e protocolos de preparação	66
3.9.1 <i>Linhagens de Escherichia coli (E. coli) e genótipos</i>	66
3.9.2 <i>Preparação de bactérias eletrocompetentes</i>	67
3.9.3 <i>Transformação de bactérias eletrocompetentes</i>	67
3.9.4 <i>Preparação de bactérias quimiocompetentes</i>	68
3.9.4.1 <i>Escherichia coli, cepa BL21</i>	68
3.9.4.2 <i>Escherichia coli, cepas DH5α e SURE</i>	68
3.9.5 <i>Transformação de bactérias quimiocompetentes</i>	69
3.10 Purificação dos produtos de PCR	70
3.11 Excisão de gel de agarose e purificação de fragmentos de DNA	70
3.12 Extração e purificação de DNA de plasmídeo	70
3.13 Clivagem de DNA de plasmídeo com endonucleases	71
3.14 Desfosforilação de vetores para subclonagem	71
3.15 Ligação de fragmentos de DNA (insertos) em vetores	72

3.16 Sequenciamento de DNA	73
3.17 Análises do gene AAEL010714	74
3.17.1 <i>Hibridização in situ em ovários</i>	74
3.17.2 <i>Experimentos de comparação dos níveis de transcrição do gene AAEL010714</i>	74
3.17.2.1 Comparação entre fêmeas virgens e copuladas.....	74
3.17.2.2 Fêmeas sadias e infectadas com <i>Plasmodium gallinaceum</i>	75
3.17.3 <i>Expressão de proteína recombinante</i>	75
3.17.3.1 Subclonagem do fragmento de cDNA em vetor de expressão	75
3.17.3.2 Re-transformação do vetor, indução de expressão, purificação e detecção da proteína recombinante	76
3.17.3.3 Imunização de camundongos da linhagem Balb/c.....	77
3.17.4 <i>Síntese comercial do peptídeo e produção de antisoro</i>	78
3.17.5 <i>Obtenção de proteínas solúveis de ovários e quantificação das amostras</i> ..	78
3.17.6 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)</i> ...	79
3.17.7 <i>Análise por Western Blot</i>	80
3.17.8 <i>Amplificação rápida de extremidades de cDNA 5' e 3' (RACE) do transcrito AAEL010714</i>	81
3.17.9 <i>Alinhamento de nucleotídeos</i>	82
3.17.10 <i>Análises de sequências de proteínas, peptídeo sinal, predição de sítios de glicosilação, alinhamentos e análises filogenéticas</i>	82
3.17.11 <i>Análise da sequência a montante do gene AAEL010714</i>	83
3.17.11.1 Amplificação, clonagem, sequenciamento e predição de sítios de ligação de fatores de transcrição	83
3.17.11.2 Construção de vetor de transformação para teste de promotor em linhagens transgênicas de <i>Aedes aegypti</i>	85
3.17.11.3 Amplificação, clonagem e subclonagem do gene marcador DsRED em vetor de transformação <i>pMos[3xP3-EGFP]</i>	85

3.17.11.4 Amplificação, clonagem e subclonagem do promotor em vetor de transformação <i>pMos</i> [3xP3-EGFP-DsRED].....	85
3.17.11.5 Construção de vetor de transformação <i>pMos</i> [3xP3-EGFP] com o gene promotor 1kb – DsRED em nova orientação	86
3.17.12 <i>Técnica de microinjeção de ovos embrionados de Aedes aegypti</i>	87
3.17.13 <i>Experimento de silenciamento gênico por método de RNA de interferência (RNAi)</i>	89
3.17.13.1 Síntese dos RNAs dupla-fita.....	89
3.17.13.2 Injeção de RNA dupla fita (dsRNA) nos mosquitos	91
3.17.13.3 Análises de parâmetros de fecundidade e fertilidade	91
3.18 Análise estatística dos experimentos	92
4 RESULTADOS	93
4.1 Identificação de candidatos gênicos de <i>Aedes aegypti</i> com expressão tardia	94
4.1.1 <i>Análises in silico iniciais</i>	94
4.1.2 <i>Atualização das anotações no banco VectorBase</i>	98
4.1.3 <i>Amplificação genômica de fragmentos dos genes candidatos</i>	101
4.2 Caracterização dos perfis transcricionais dos genes selecionados	102
4.2.1 <i>Obtenção dos perfis temporais</i>	102
4.2.2 <i>Obtenção dos perfis teciduais</i>	104
4.3 Análises quantitativas de acúmulo de transcritos em fêmeas vitelogênicas .	105
4.3.1 <i>Clonagem e obtenção de DNA de plasmídeos para elaboração de curvas-padrão</i>	106
4.3.2 <i>Perfis quantitativos de transcrição dos genes tardios</i>	108
4.4 Hibridização <i>in situ</i> dos transcritos do gene AAEL010714 em ovários	111

4.5 Análise de acúmulo dos transcritos do gene AAEL010714 mediante infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	114
4.6 Análise de acúmulo dos transcritos do gene AAEL010714 mediante cópula.	115
4.7 Expressão de proteína recombinante codificada pelo gene AAEL010714	117
4.8 Caracterização da sequência promotora putativa e do transcrito completo (<i>full-length</i>) do gene AAEL010714	120
4.8.1 <i>Obtenção da sequência a montante do gene AAEL010714</i>	120
4.8.2 <i>Obtenção da sequência nucleotídica do transcrito</i>	123
4.8.3 <i>Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas preditas codificadas pelo gene AAEL010714 e das proteínas AAEL01718 parálogas</i>	127
4.9 Identificação da proteína AegOBP45B em extratos protéicos de ovários de <i>Aedes aegypti</i>	130
4.10 Tentativa de silenciamento do gene AAEL010714 para identificação da possível função da proteína AegOBP45B	132
4.11 Teste do promotor putativo do gene AAEL010714 em linhagens transgênicas de <i>Aedes aegypti</i>	136
4.11.1 <i>Clonagem do gene marcador DsRED no vetor de transformação pMos[3xP3-EGFP]</i>	137
4.11.2 <i>Clonagem do promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714 no vetor de transformação pMos[3xP3-EGFP-DsRED]</i>	139
4.11.3 <i>Experimentos de microinjeção de ovos embrionados de <i>Aedes aegypti</i> com o vetor de transformação pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]</i>	142
4.11.4 <i>Detecção de eventos de recombinação no vetor de transformação pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]</i>	143

4.11.5 Construção de um novo vetor de transformação <i>pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]</i> para microinjeção de ovos embrionados de <i>Aedes aegypti</i> .	146
5 DISCUSSÃO	151
6 CONCLUSÕES	159
REFERÊNCIAS	161
ANEXOS	179
ANEXO A - Mapa do vetor de clonagem comercial pCR [®] 2.1 e sequências nucleotídicas adjacentes ao sítio de clonagem.	180
ANEXO B - Mapa do vetor de clonagem comercial pCR [®] 2.1-TOPO [®] e sequências nucleotídicas adjacentes ao sítio de clonagem.	181
ANEXO C - Mapa do vetor de clonagem comercial pCR [®] II-TOPO [®] e sequências nucleotídicas adjacentes ao sítio de clonagem.	182
ANEXO D - Mapa do vetor de clonagem comercial pjet1.2, indicando sítio múltiplo de clonagem e sequências adjacentes ao sítio de clonagem	183
ANEXO E - Mapa do vetor de expressão comercial pGEX-4T-3 e sequências adjacentes ao sítio de clonagem.	184
ANEXO F - Mapa do vetor de transformação doador <i>pMos[3xP3-EGFP]</i> , exibindo sítio de múltipla clonagem	185
ANEXO G - Mapa do vetor auxiliar pKhsp82MOS, com destaque para os sítios de restrição	186

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mosquitos – aspectos gerais

Mosquitos, também conhecidos popularmente como pernilongos são insetos dípteros pertencentes à família Culicidae (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). Esta família monofilética forma um dos grupos taxonômicos menos derivados da ordem Diptera e apresenta 3528 espécies formalmente reconhecidas, que estão classificadas filogeneticamente entre as subfamílias Anophelinae e Culicinae (HARBACH, 2007, 2011). Atualmente, os mosquitos são encontrados em abundância nas regiões tropicais e temperadas do planeta, mas também existem em regiões situadas além do círculo ártico (FANG, 2010; HARBACH, 2011). De fato, um gradiente latitudinal pode ser observado na biodiversidade destes insetos, sendo que a riqueza de espécies aumenta em direção ao equador (FOLEY; RUEDA; WILKERSON, 2007).

O pequeno tamanho e a fragilidade destes organismos são características que refletem na escassez de registros fósseis para o estabelecimento confiável das relações evolutivas da família Culicidae, porém, preservado em âmbar, o membro mais antigo já encontrado desta família possui datação entre 100 a 90 milhões de anos atrás (Figura 1) e estima-se que os culicídeos tenham uma origem ainda mais antiga, no período Jurássico, há cerca de 190 milhões de anos (BORKENT e GRIMALDI, 2004)

Os mosquitos são holometábolos, isto é, realizam metamorfose completa durante o ciclo de vida, que é dividido em fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2). De modo geral, a cada ciclo reprodutivo as fêmeas depositam entre 50 a 500 ovos na superfície de corpos de água ou em lugares úmidos potencialmente inundáveis. As larvas sempre aquáticas e com corpo vermiforme eclodem dos ovos submersos e, na maioria das espécies, utilizam material orgânico particulado ou microorganismos presentes na água como alimento. Durante o crescimento, passam por quatro estágios larvais até atingirem a fase de pupa. O processo de metamorfose ocorre nesta fase e o organismo não se alimenta até a emergência dos adultos alados, quando ocorre a transição do meio de vida aquático para o terrestre. Os adultos alados são delicados, possuem o corpo afilado, probóscide, antenas e apêndices compridos e escamas que recobrem quase todas as partes do corpo, muitas vezes formando ornamentações relevantes à identificação e taxonomia. Quando adultos, machos de todas as espécies

utilizam seivas vegetais como alimento exclusivo e o mesmo se aplica para fêmeas de um grande número de espécies. Porém, para fêmeas de muitas outras espécies a anautogenia é conservada, isto é, a alimentação com sangue obtido em vertebrados é imprescindível para produção de ovos. Em contrapartida, a autogenia também é observada em algumas espécies. Nestas, as fêmeas que normalmente realizam repasto sanguíneo podem produzir ovos sem hematofagia. A atividade copulatória pode ser efetuada antes ou após o repasto sanguíneo das fêmeas, e os espermatozoides são armazenados na espermateca para posterior fertilização dos oócitos que acontece durante a oviposição. (CLEMENTS, 1992; CONSOLI e OLIVEIRA 1994, HARBACH, 2007).

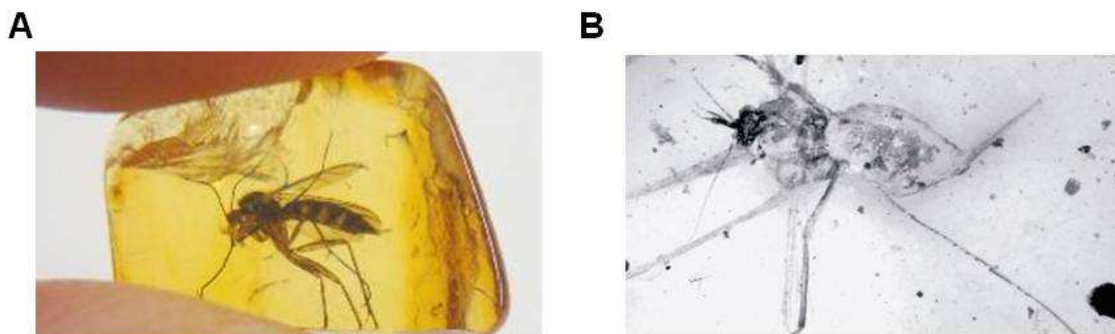


Figura 1 - Preservação de insetos em resina vegetal fossilizada denominada âmbar. **A.** Âmbar contendo inseto é vendido como artigo decorativo. **B.** *Burmaculex antiquus*, o membro mais antigo da família Culicidae foi encontrado preservado em âmbar de Burmese (Myanmar), com datação estimada entre 100 a 90 milhões de anos atrás.
FONTES: **A.** Idigidinos (2011). **B.** Grimaldi; Engel e Nascimbene (2002).

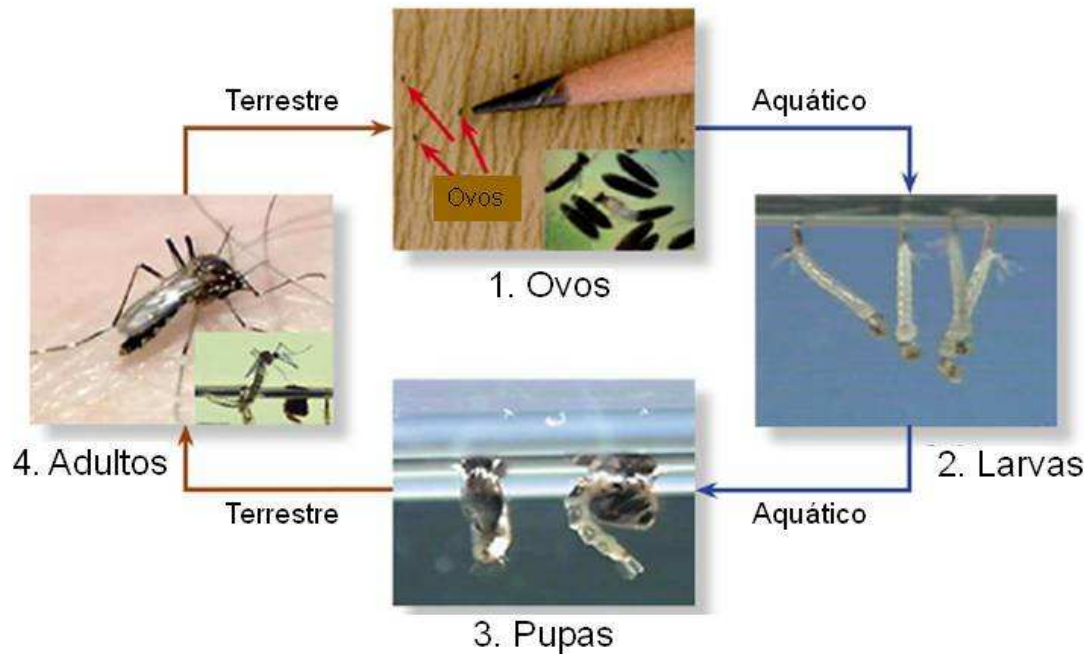


Figura 2 - Ciclo de vida holometábolo de um mosquito, exemplificado pela espécie *Aedes aegypti*. As fêmeas colocam os ovos (1, indicados pelas setas vermelhas) em superfícies internas de recipientes com água. As larvas (2) eclodem quando os ovos entram em contato com a água. As larvas passam por 4 estágios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4). As larvas L4 transformam-se em pupas (3) e a metamorfose é iniciada. Os adultos (4) emergem das pupas. O ciclo biológico consiste de 2 fases: aquática (larvas e pupas) e terrestre (adultos e ovos). FONTES: CDC (2009); Urdaneta-Marquez e Failloux (2010).

O conhecimento básico acumulado sobre a classificação, história natural, morfologia, fisiologia e ciclo biológico dos mosquitos são vastos nos dias atuais (REY, 2002), mas é interessante notar que uma grande lacuna seria observada se as mesmas informações fossem buscadas no início do século XIX. Decisivamente, a mudança deste paradigma acontece com a associação entre a ocorrência de doenças humanas e atividade hematofágica dos mosquitos, iniciada pela descoberta de Patrick Manson em 1878, que comprovou a transmissão do helminto *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da elefantíase em humanos, pela picada de mosquitos culicíneo do gênero *Culex*. Na última década do século XIX, os estudos de Ronald Ross forneceram as bases para um grupo italiano coordenado por Giovanni Battista Grassi confirmar a transmissão de protozoários do gênero *Plasmodium*, causadores da malária humana,

por mosquitos anofelinos do gênero *Anopheles*. Nesta mesma década, Carlos Juan Finlay e a equipe de Walter Reeds confirmaram a transmissão do vírus da febre amarela pelo mosquito culicíneo *Aedes aegypti*, inseto que também foi caracterizado também como vetor do vírus dengue na primeira década do século XX. Em períodos praticamente concomitantes, estas descobertas revelaram que helmintos, protozoários e vírus eram transmitidos aos humanos por mosquitos, sendo marcos cruciais que levaram ao surgimento da entomologia médica e posterior efervescência e expansão dos estudos científicos acerca da família Culicidae no século XX (CARDOSO, 2010, HENCHAL e PUTNAK, 1990; SANJAD, 2003;).

No início do século XXI, a comunidade científica especializada em mosquitos foi agraciada com a conclusão dos projetos de sequenciamento dos genomas de *Anopheles gambiae* no ano de 2002, *Aedes aegypti* em 2007 e *Culex quinquefasciatus* em 2010 (ARENSBURGER et al., 2010; HOLT et al., 2002; NENE et al., 2007), sendo respectivamente espécies representantes dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*. Os três estudos que relatam a conclusão dos genomas das três espécies foram publicados no jornal acadêmico *Science*, um dos mais prestigiados do mundo. Destes, dois trabalhos foram capas de edição (Figura 3 A e B), simbolizando a importância das descobertas publicadas.

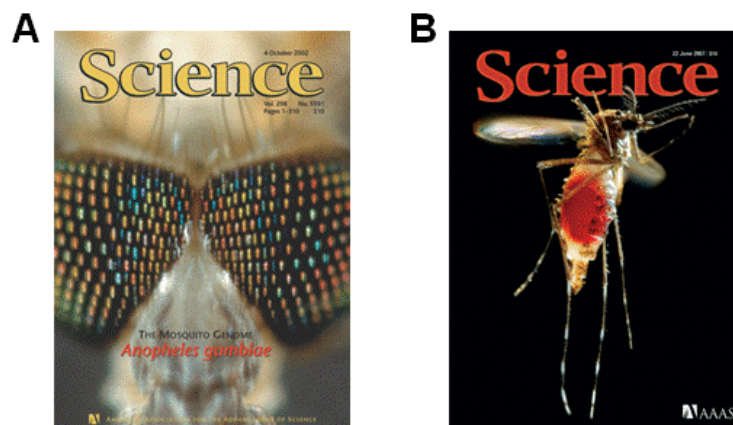


Figura 3 - Capas de 2 edições do jornal acadêmico *Science*, com destaque para a conclusão do sequenciamento dos genomas de duas espécies de mosquitos. **A.** Edição de outubro de 2002, publicando o artigo sobre o genoma de *Anopheles gambiae*. **B.** Edição de junho de 2007, publicando o artigo sobre o genoma de *Aedes aegypti*.
FONTE: Science AAAS (2011).

Assim, a disponibilidade das informações genômicas oferece para este século uma perspectiva incomparável para o estudo aprofundado da biologia básica e evolução dos organismos sequenciados e das outras espécies pertencentes aos três gêneros mais intensivamente estudados da família Culicidae (BESANSKY e COLLINS, 1992; WATERHOUSE; WYDER; ZDOBNOV, 2008). Segundo Harbach (2007), menos de 150 espécies contidas nestes três gêneros são as principais vetoras de agentes etiológicos causadores de doenças humanas, o que equivale a menos de 4% das espécies descritas da família Culicidae. Porém, as mesmas causam indiretamente mais morbidade e mortalidade em humanos se comparadas a qualquer outro grupo de organismos.

1.2 *Aedes aegypti*

O culicíneo *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é autóctone do continente africano, mas atualmente está presente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Figura 4) (CONSOLI e OLIVEIRA 1994; FORATTINI, 2002; REY, 2002). A expansão da distribuição geográfica desta espécie relaciona-se inicialmente ao crescimento das atividades comerciais nos séculos XVII e XVIII, fato que contribuiu para a dispersão passiva deste mosquito (GUBLER, 2004). Segundo Natal (2002) o comércio de pneus usados, os quais são utilizados como sítios para oviposição, também favorece a dispersão geográfica da espécie e as constantes reinfestações em países tropicais, sendo que estudos genéticos de populações de *Aedes aegypti* das Américas e do Brasil sugerem introduções múltiplas do mosquito no continente americano (BRACCO et al., 2007; DA COSTA-DA-SILVA; CAPURRO; BRACCO, 2005; URDANETA-MARQUEZ e FAILLOUX, 2010; PADUAN KDOS e RIBOLLA, 2008). Somado a estes fatores, as mudanças demográficas após intenso fluxo migratório rural-urbano nos países subdesenvolvidos após o fim da segunda guerra mundial, geraram processo desordenado de urbanização. A infra-estrutura e saneamento básico deficientes nestes ambientes modernos fornecem condições adequadas para a infestação do mosquito (TAUIL, 2001).

O adulto alado de *Aedes aegypti* exibe coloração escura, com listras e manchas brancas e é facilmente identificável através de uma ornamentação em forma de lira na região do escudo, composta por escamas branco-prateadas (Figura 5). É um mosquito domiciliado, antropofílico, que apresenta hábitos diurnos de atividade e está adaptado a viver em ambientes urbanos, sobretudo em grandes cidades com aglomerações populacionais. Esta espécie encontra em ambientes doméstico-urbanos uma variedade de criadouros artificiais para o desenvolvimento de suas formas imaturas e as fêmeas possuem preferência em realizar a alimentação sanguínea em humanos. Por estes aspectos biológicos e comportamentais, o mosquito *Aedes aegypti* é conhecido por ser o culicídeo mais fortemente associado e dependente do homem (CONSOLI e OLIVEIRA 1994; NATAL, 2002; REY, 2002; TAUIL, 2001).

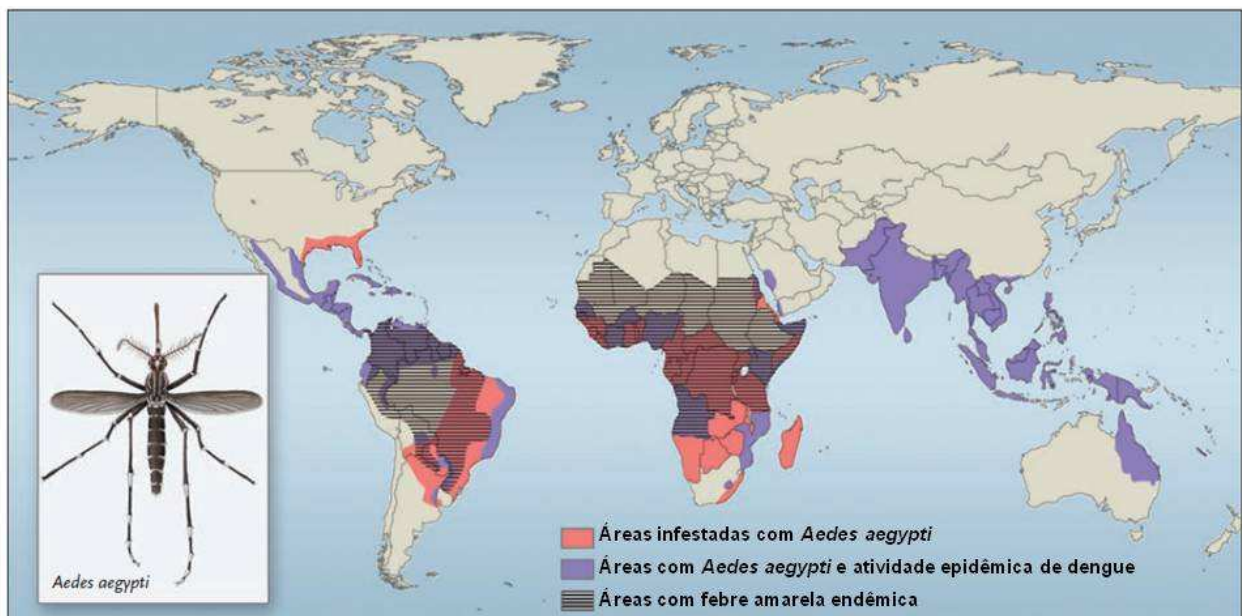


Figura 4 - Distribuição mundial de dengue, febre amarela e do mosquito *Aedes aegypti*, vetor principal dos agentes etiológicos de ambas as doenças.

FONTE: Modificado de Monath (2007).



Figura 5 - Identificação do mosquito adulto de *Aedes aegypti* através da ornamentação em forma de lira. **A.** Instrumento de corda denominado lira. **B.** Uma fêmea da espécie *Aedes aegypti*. A seta amarela indica a região do escudo, com escamas branco prateadas formando o desenho de uma lira. **C.** A figura mostra a região do escudo em detalhe.
 FONTES: **A.** University of South Dakota (USD) (1996). **B.** Lawson et al. (2009). **C.** Walker (2008).

Do ponto de vista humano, mais complexo que as interações sinantrópicas que *Aedes aegypti* estabelece, são os problemas indiretos que este mosquito causa à saúde da espécie *Homo sapiens*. Isto porque o mosquito *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor urbano do vírus da febre amarela e dos 4 sorotipos do vírus dengue (GUBLER, 2002).

A febre amarela já provocou epidemias devastadoras nos séculos XVI, XVII e XVIII no mundo, culminando no aprofundamento dos estudos da doença e no desenvolvimento das primeiras vacinas na década de 30 do século passado (BARRETT e HIGGS, 2007). Muito embora atualmente a vacina 17D seja utilizada no mundo para prevenção da febre amarela (BARRETT e HIGGS, 2007; SELIGMAN e GOLD, 2004; VASCONCELOS, 2003;), as ocorrências de casos da doença cresceram nas duas últimas décadas, sendo relatados pequenos surtos epidêmicos nas regiões tropicais (Figura 4) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Já o dengue é considerado a mais grave arbovirose que afeta o homem e os casos da doença têm aumentado drasticamente nas últimas décadas no mundo. Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco onde mais de 50

milhões de pessoas são infectadas anualmente (Figura 4). Destas, dezenas de milhares de casos são caracterizados por manifestações graves da doença (dengue hemorrágica/síndrome do choque da dengue) com consideráveis taxas de fatalidade (WHO, 2009). Atualmente, não há drogas antivirais disponíveis para o tratamento clínico desta doença (SAMPATH e PADMANABHAN, 2010), nem uma vacina tetravalente para prevenção. Contudo, nove vacinas candidatas estão em fase de desenvolvimento, com duas delas em estágios avançados de testes em humanos (GUZMAN et al., 2010).

Desta forma, o único elo vulnerável na cadeia epidemiológica de dengue é o vetor *Aedes aegypti*. Conseqüentemente, este mosquito é o principal alvo no controle da transmissão do agente etiológico da doença em busca da diminuição das epidemias no mundo.

Geralmente, as estratégias tradicionais usadas no combate ao mosquito resumem-se em atividades preventivas, como a eliminação de criadouros e adoção de medidas comunitárias de conscientização (manejo ambiental), utilização de predadores de larvas (controle biológico) e, principalmente, aplicação estratégica ou emergencial de inseticidas químicos (controle químico) (WHO, 2009).

Esses programas eventualmente não resultam num nível seguro de manutenção de baixas densidades populacionais do mosquito, devido à complexidade de fatores envolvidos na implementação operacional eficaz destas ações (TAUIL, 2001) e a problemas relacionados com a seleção e surgimento de linhagens de *Aedes aegypti* resistentes aos inseticidas utilizados maciçamente no combate (HEMINGWAY, 2000; RODRÍGUEZ et al., 2003; STRODE, 2008), havendo assim um constante risco de transmissão de dengue (MARÇAL JUNIOR e SANTOS, 2004). Além disso, o efeito residual dos inseticidas no meio ambiente e a ação em organismos não-alvos restringem a ampla utilização deste método (IYANIWURA, 1991).

Os inseticidas biológicos, compostos por toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (*Bti*), constituem alternativas seguras aos inseticidas químicos para uso no controle das larvas de *Aedes aegypti*. Entretanto, a persistência destas toxinas no ambiente favorece a seleção de linhagens resistentes do

mosquito e evidências deste processo começam a ser observadas para esta classe de inseticida (PARIS et al., 2011).

Métodos genéticos de supressão e substituição das populações do mosquito surgem como alternativas promissoras de controle e atualmente estão em etapas de aperfeiçoamento para a utilização em programas de manejo integrado de *Aedes aegypti* (JANSEN e BEEBE, 2010; SPERANÇA e CAPURRO, 2007). A estratégia genética de supressão de população utilizando mosquitos transgênicos é um aperfeiçoamento da técnica do inseto estéril (*sterile insect technique* - SIT) (KNIPLING, 1955), e consiste na liberação em massa de machos transgênicos que carregam um gene letal dominante (ALPHEY et al., 2010). Os machos transgênicos liberados cruzam com as fêmeas selvagens, e a prole gerada é inviável, levando a população alvo ao declínio (ALPHEY et al., 2010; HORN e WIMMER, 2003). Já a estratégia de substituição não objetiva a redução da população, mas em contrapartida, os mosquitos transgênicos liberados ao cruzarem com as fêmeas selvagens, transmitem a prole alelos que bloqueiam a infecção do mosquito pelo vírus dengue (SPERANÇA e CAPURRO, 2007).

Através de sistemas baseados em elementos de transposição (ADELMAN; JASINSKIENE; JAMES, 2002; CHEN; MATHUR; JAMES, 2008; SPERANÇA e CAPURRO, 2007), genes quiméricos com atividade antiviral para construção de linhagens transgênicas destinadas à substituição de populações (FRANZ et al., 2006; TRAVANTY et al., 2004), ou genes dominantes letais para produção de insetos para supressão populacional (ALPHEY, 2002; ALPHEY e ANDREASEN, 2002; HORN e WIMMER, 2003; PHUC et al., 2007) são incorporados ao genoma de *Aedes aegypti*, através da técnica de microinjeção (JASINSKIENE; JUHN; JAMES, 2007). Estas moléculas efetoras são controladas por promotores gênicos tecido- e/ou estágio-específico, que ativam os genes efetores em momentos precisos do estágio de vida do mosquito ou de interação do hospedeiro invertebrado e o patógeno (SPERANÇA e CAPURRO, 2007).

Além de linhagens transgênicas de *Aedes aegypti* supressoras de população (ALPHEY et al., 2010; PHUC et al., 2007), mosquitos transgênicos imunes à infecção pelo vírus dengue também já foram gerados (FRANZ et al., 2006; TRAVANTY et al., 2004), mas os denominados *gene drive mechanisms*, isto é, estratégias de introdução

dos mosquitos modificados e fixação dos alelos efetores nas populações naturais ainda estão em desenvolvimento (JAMES, 2005; MARSHALL, 2009; SINKINS e GOULD, 2006). Portanto, linhagens transgênicas de *Aedes aegypti* voltadas à supressão de populações constituem a mais proeminente alternativa genética para o controle deste mosquito, uma vez que esta estratégia não necessita de introdução e fixação de alelos na população a ser suprimida (PHUC et al., 2007), e testes estão sendo realizados em diversos países, com resultados promissores já obtidos nas ilhas Caiman (ENSERINK, 2010).

Mesmo com perspectivas promissoras para geração de novos métodos, o arsenal atual de ferramentas para o controle deste mosquito é bastante limitado e ineficiente. Como alternativa a este problema, aprofundar o conhecimento da biologia básica de *Aedes aegypti* é passo fundamental para o desenvolvimento e aprimoramento de alternativas inovadoras que possam ser aplicadas aos programas de controle do vetor (CHEN; MATHUR; JAMES, 2008; MEGY et al., 2009; WATERHOUSE; WYDER; ZDOBNOV, 2008).

1.3 Alimentação sanguínea, vitelogênese e produção de ovos

Ao contrário de mosquitos autógenos, capazes de realizar pelo menos um ciclo gonotrófico sem repasto sanguíneo (TELANG e WELLS, 2004), as fêmeas de *Aedes aegypti* são exclusivamente anautógenas, sendo a alimentação sanguínea obrigatória na obtenção de nutrientes necessários ao desenvolvimento dos ovários e maturação dos ovos. Assim, o repasto sanguíneo constitui um processo fisiológico essencial no ciclo de vida desta espécie. Em contrapartida, este modo alimentar acarreta na habilidade de transmissão de arboviroses e outros patógenos, obtidos de um vertebrado infectado (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; BRIEGEL, 2003).

Agravando esta situação, ao buscarem um repasto sanguíneo satisfatório, as fêmeas de *Aedes aegypti*, frequentemente fazem alimentações curtas em mais de um hospedeiro humano até o engurgitamento completo (Figura 6) (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). Embora Smith et al. (2004), utilizando modelos matemáticos, tenham demonstrado que a proporção de mosquitos infectados depende principalmente da

estrutura etária de suas populações, havendo taxas de infecções mais altas quando mosquitos mais velhos são encontrados, os autores consideraram que predições realísticas devem levar em conta o modo de procura por alimentação sanguínea. Como consequência, o comportamento alimentar das fêmeas de *Aedes aegypti* aumenta a probabilidade de contaminação do mosquito por um hospedeiro vertebrado reservatório, enquanto que fêmeas infectadas podem amplificar a disseminação de vírus em apenas uma investida alimentar completa.

Uma fêmea de *Aedes aegypti* pode ingerir de 3 a 5 vezes seu respectivo peso corpóreo em sangue durante o repasto no hospedeiro vertebrado (ALVARENGA, 2005; JONES e MADHUKAR, 1974) e muito mais do que a alteração morfológica que ocorre no abdômen (Figura 6), a alimentação sanguínea causa mudanças drásticas no metabolismo basal de fêmeas ingurgitadas (DISSANAYAKE et al., 2010; FEITOSA et al., 2006; SANDERS et al., 2003).

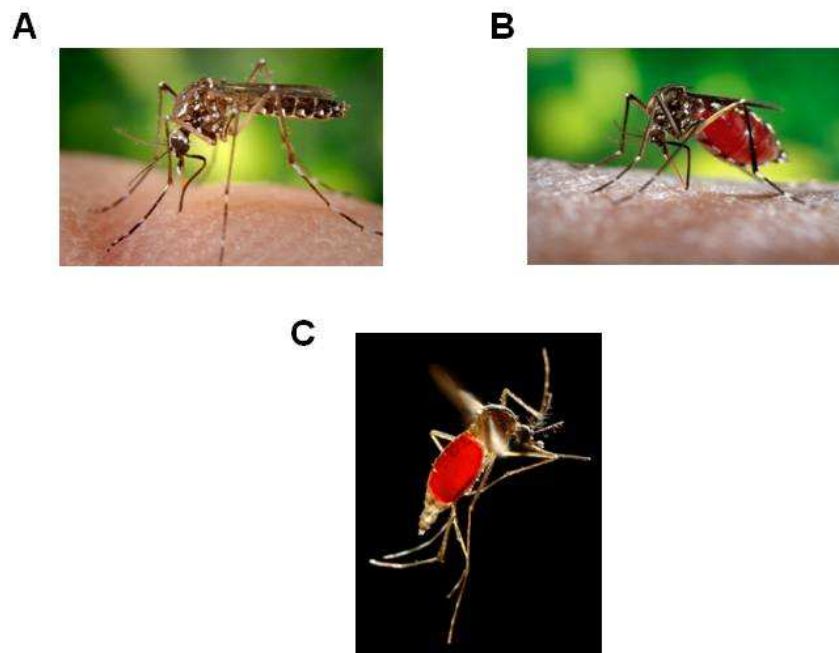


Figura 6 - Fêmeas de *Aedes aegypti* durante e após o processo de hematofagia, com marcante alteração morfológica no abdômen. **A.** A fêmea inicia o repasto sanguíneo em vertebrado. **B.** Fêmea ao final do repasto, com intestino repleto de sangue. **C.** Fêmea, voando após repasto sanguíneo e completo ingurgitamento.

FONTE: James Gathany, Center for Disease Control Public Health Image Library, 2008.

Processos fisiológicos desencadeados após o repasto sanguíneo e aspectos endócrinos envolvidos no ciclo gonotrófico foram estudados extensivamente em *Aedes aegypti* (KLOWDEN, 1997; RAIKHEL, 1987; 1992; RAIKHEL e DHADIALLA, 1992; SAPPINGTON et al., 1998) e trabalhos modernos vêm desvendando os mecanismos moleculares que regulam a produção de vitelo e desenvolvimento dos ovos nesta espécie (ATTARDO et al., 2006; ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005; BRYANT; MACDONALD; RAIKHEL, 2010; CHEN et al., 2004; CRUZ et al., 2009; RAIKHEL et al., 2002; RIEHLE e BROWN, 2002; SUN et al., 2002; SUN; ZHU; RAIKHEL, 2004; ZHU; CHEN; RAIKHEL, 2007).

A vitelogênese, processo de síntese, transporte e acúmulo de proteínas precursoras de vitelo é fundamental para biologia reprodutiva do mosquito. Neste processo, o corpo gorduroso (tecido metabólico dos insetos, análogo ao tecido adiposo e ao fígado dos vertebrados) sintetiza e secreta vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica, catepsina B e lipoforina (as principais proteínas precursoras de vitelo) na hemolinfa, que são incorporadas nos ovócitos em desenvolvimento (Figura 7) (RAIKHEL et al., 2002). A vitelogênese é controlada pela ação do hormônio 20-hidroxiecdisona (RAIKHEL et al., 2002) e recentemente foi mostrado que o corpo gorduroso depende de sinais nutricionais provenientes de aminoácidos para produção das proteínas precursoras de vitelo (Figura 7) (HANSEN et al., 2004)

Resumidamente, a vitelogênese em *Aedes aegypti* pode ser dividida em dois períodos diferenciados: pré-vitelogênico e vitelogênico (Figura 7). O período pré-vitelogênico ocorre antes da ingestão de sangue pela fêmea adulta e corresponde a uma fase preparatória, quando o corpo gorduroso e os ovários são amadurecidos pela atuação do hormônio juvenil III (JH III) nos 3 primeiros dias após a emergência das fêmeas adultas (Figura 7). Após este período, o corpo gorduroso e ovários tornam-se competentes para o período vitelogênico, e a fêmea então entra em um estado de espera, passando para o período vitelogênico somente após a alimentação sanguínea (Figura 7).

O período vitelogênico pode ser subdividido em duas fases: síntese e terminação. A fase sintética é iniciada imediatamente após o repasto (Figura 7). A distensão abdominal causada pelo volume ingerido associada a fatores do sangue ainda não

completamente conhecidos estimulam células neurosecretoras cerebrais a liberarem o hormônio ecdisiotrópico ovariano (Figura 7). Este neuro-hormônio atua nos ovários e estimula as células foliculares epiteliais a produzirem o hormônio ecdisona, que é liberado na hemolinfa e atinge as células do corpo gorduroso. Neste tecido, ocorre a conversão de ecdisona na forma ativa 20-hidroxiecdisona (Figura 7). O hormônio 20-hidroxiecdisona liga-se em receptores nucleares, formando um complexo de transativação que regula hierarquicamente a expressão de fatores de transcrição e genes envolvidos na produção de proteínas precursoras de vitelo pelo corpo gorduroso (Figura 7 e Figura 8). Além disso, nesta fase acontece a ativação dos ovários, para captação dessas proteínas nos oócitos (Figura 7), através de endocitose mediada por receptor e armazenamento em forma de grânulos de vitelo. A fase de síntese do período vitelogênico ocorre durante as primeiras 30 horas após a ingestão de sangue, sendo que os maiores níveis de 20-hidroxiecdisona são detectados entre 18 a 20 horas após o repasto (Figura 8). A queda dos níveis de 20-hidroxiecdisona na hemolinfa leva à fase de término do período vitelogênico, que se inicia em torno de 30 horas após o repasto sanguíneo, culminando com a diminuição da expressão e síntese de proteínas precursoras de vitelo pelo corpo gorduroso (Figura 8). Nesta fase, ocorre produção do córion para maturação dos ovos e o corpo gorduroso volta ao seu estado pré-vitelogênico. A expressão das proteínas precursoras de vitelo atinge níveis basais 48 horas após o repasto (Figura 8) e as fêmeas tornam-se aptas à oviposição 72 horas após o repasto sanguíneo, quando o ciclo gonotrófico é finalizado (ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005; RAIKHEL, 1992; RAIKHEL et al., 2002; RAIKHEL e DHADIALLA, 1992; KLOWDEN, 1997).

Ao final do ciclo gonotrófico, as fêmeas de *Aedes aegypti* podem produzir centenas de ovos (CLEMENTS, 1992). Esta alta capacidade reprodutiva em um curto período de tempo também resulta na dificuldade de controlar populações desta espécie (ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005). Nesse sentido, afetar esta fase do ciclo de vida do mosquito constitui um ponto interessante para elaboração de novos métodos de controle (CHEN; MATHUR; JAMES, 2008) e implica primeiramente na identificação e caracterização de genes envolvidos na fisiologia reprodutiva de *Aedes aegypti*, constituindo etapas básicas na busca de alvos moleculares.

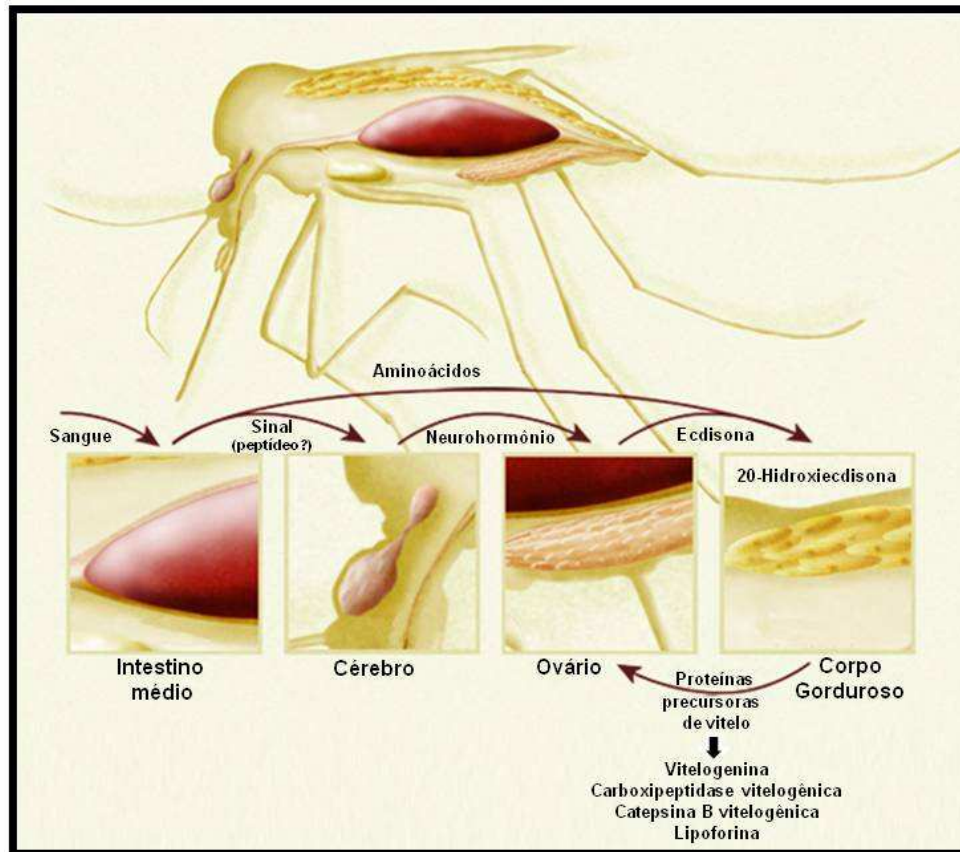


Figura 7 - Diagrama esquemático do processo de vitelogênese, disparado pelo repasto sanguíneo. Após ingestão do sangue, o cérebro recebe um sinal para secreção de um neuro-hormônio que estimula os ovários a produzirem ecdisona. A ecdisona é convertida em 20-hidroiecdisona no corpo gorduroso, e este hormônio ativa direta e indiretamente a expressão de genes que codificam as principais proteínas precursoras de vitelo. O corpo gorduroso também necessita de sinalização de aminoácidos livres para iniciar a síntese das proteínas.
 FONTE: Modificado de Attardo e D'Amico (2011).

Com esta perspectiva, a fase de síntese do período vitelogênico (Figura 8) tem sido bastante explorada em nível molecular. Além da caracterização dos perfis de expressão de genes imediatamente ativados no corpo gorduroso após o repasto sanguíneo (Figura 8, genes revisados em RAIKHEL et al., 2002), vários estudos têm investigado e caracterizado genes expressos restritamente (estágio-específicos) ou que tenham seus níveis transcricionais significativamente aumentados após a ingestão

sanguínea no intestino (NORIEGA e WHELLES, 1999, SMARTT et al., 1998; EDWARDS et al., 2000) e ovários (EDWARDS; SEVERSON; HAGEDORN, 1998; FERDIG et al., 1996, 2000), descrevendo seus respectivos padrões temporais e quantitativos de expressão ao longo da fase de síntese do período vitelogênico.

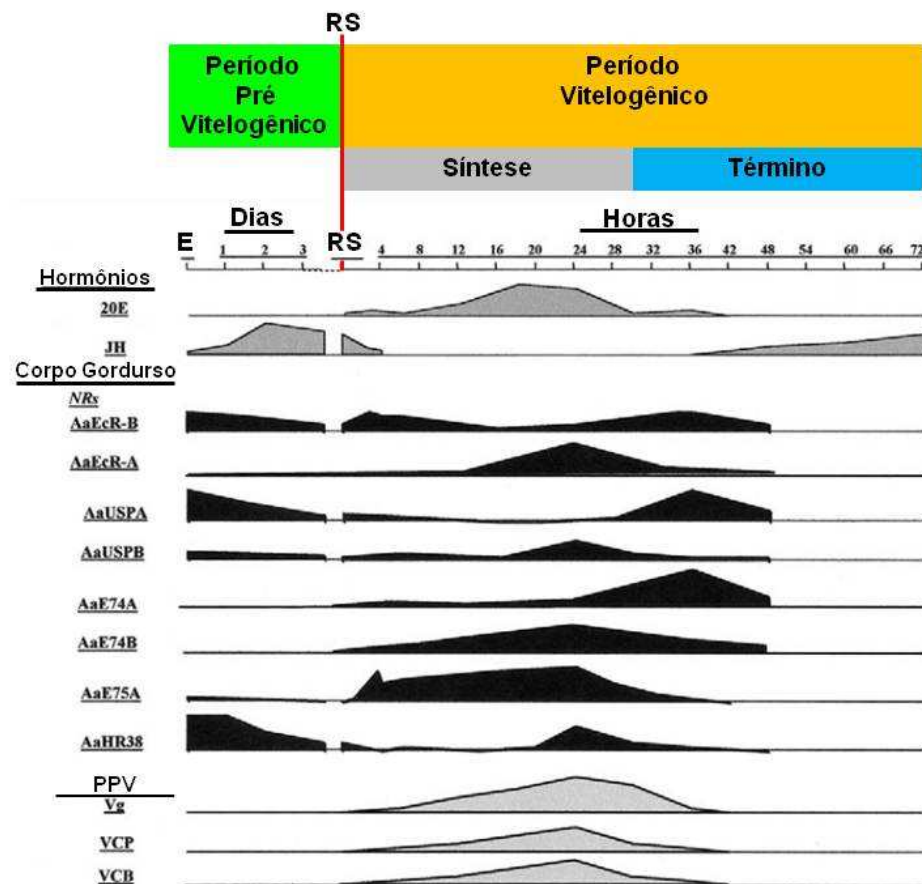


Figura 8 - Representação esquemática dos títulos de hormônios e níveis de transcrição de genes envolvidos na cascata hierárquica disparada pela alimentação sanguínea de *Aedes aegypti*, durante os períodos do processo de vitelogênese. Os títulos dos hormônios juvenil (JH) e 20-hidroxiecdisona (20E) estão representados em cinza-escuro. Os níveis de transcrição dos receptores nucleares (NRs) estão indicados em preto, e das principais proteínas precursoras de vitelo (PPV) vitelogenina (Vg), carboxipeptidase vitelogênica (VCP) e catepsina B vitelogênica (VCB) estão mostrados em cinza-claro. E: Emergência do adulto. RS: Repasto sanguíneo.

FONTE: Modificado de Raikhel et al. (2002).

Embora alguns trabalhos tenham explorado a expressão global de genes durante alguns intervalos durante o processo de vitelogênese em diferentes tecidos como o corpo gorduroso (FEITOSA et al., 2006), intestino médio (SANDERS et al., 2003) e glândula salivar (THANGAMANI e WIKEL, 2009), ainda existe considerável falta de informação acerca de genes restritamente ativados e altamente expressos na fase de término do período vitelogênico, sobretudo 48 horas após o repasto sanguíneo, quando os níveis de transcrição dos principais genes envolvidos na fase de síntese da vitelogênese retornam à patamares não detectáveis (Figura 8). Recentemente, Dissanayake et al. (2010) analisaram as mudanças de expressão de 16.222 transcritos de *Aedes aegypti* em fêmeas sem repasto ou após a alimentação sanguínea, através da técnica de microarranjo. Neste estudo global dos níveis de transcrição dos genes presentes no genoma do mosquito, além de mostraram que 30% destes transcritos variam seus níveis de acúmulo após o repasto, os autores concluíram que a maioria da variação ocorre 48 horas após o repasto.

Sendo assim, a proposta principal do presente estudo foi identificar genes com expressão tardia no ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti* (48 horas após o repasto), assim como caracterizar os perfis de expressão dos respectivos transcritos. Sob a hipótese de que estes genes tardios tenham funções relacionadas à reprodução do mosquito, a identificação e caracterização dos mesmos, além de preencher uma lacuna de informação molecular no processo de vitelogênese, poderão fornecer conhecimento básico para o desenvolvimento de estratégias para interrupção do sucesso reprodutivo das fêmeas de *Aedes aegypti*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Identificar genes regulados tardiamente pela alimentação sanguínea de *Aedes aegypti*, com expressão elevada na fase de término do período vitelogênico, assim como analisar molecularmente os candidatos gênicos selecionados.

2.2 Específicos

- Buscar e selecionar candidatos gênicos de *Aedes aegypti*, ativados 48 horas após o repasto sanguíneo.
- Caracterizar o perfil temporal e espacial de expressão dos genes selecionados ao longo do ciclo de vida de *Aedes aegypti*.
- Caracterizar os produtos de expressão do gene AAEL010714 de *Aedes aegypti*, através da obtenção da sequência completa do RNA mensageiro, localização das moléculas transcritas de RNA, identificação do produto traduzido e isolamento da região promotora predita.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 Colônia e manutenção de *Aedes aegypti* em insetário

Larvas, pupas e adultos da espécie *Aedes aegypti* (cepa Higgs White-eyes) foram alojados em insetário de segurança do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

Os mosquitos eram mantidos em temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 80% de umidade relativa do ar e com fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro). Os ovos aderidos em papel filtro eram mergulhados em água autoclavada contida em frascos de vidro fechados hermeticamente para eclosão sincronizada das larvas. Os estágios imaturos (larvas e pupas) foram criados em recipientes plásticos contendo água destilada e a alimentação era realizada diariamente até o estágio de pupa, com ração de peixe moída Tetramin[®] (Tetra, Melle, Osnabrück, Alemanha).

Através de um separador manual vertical de estágios imaturos (formado por duas placas de vidro alinhadas paralelamente com um espaçamento ajustável, que gerava um gradiente de tamanho sob fluxo de água), as pupas eram primeiramente separadas das larvas, seguindo-se de separação das pupas por critério sexual.

As pupas separadas foram alocadas em copos plásticos de 500 mL (~100 pupas/copo) contendo água para emergência dos adultos alados. Os copos foram vedados com tecido filó e os mosquitos adultos emergidos foram mantidos nos copos plásticos (grupos experimentais), sendo a água descartada, ou foram transferidos para gaiola (colônia) em proporção sexual aproximada de 3 fêmeas:1 macho. Os adultos eram alimentados *ad libitum* com sacarose 10%.

Para produção de ovos e manutenção do ciclo de vida, as fêmeas adultas copuladas obtiveram repasto sanguíneo em camundongos Balb/c anestesiados com injeção de xilazina 10ng/Kg e acepromazina 1ng/Kg. Após repasto sanguíneo, as fêmeas foram mantidas com solução de sacarose 10% *ad libitum*. Potes cilíndricos revestidos internamente com papel filtro e contendo água destilada eram disponibilizados às fêmeas 4 dias após o repasto, para oviposição e posterior coleta dos ovos.

3.1.2 Manutenção de *Gallus gallus domesticus*

Para manutenção *in vivo* de *Plasmodium gallinaceum*, pintainhos com 1 dia de vida foram cedidos pela Granja Kunitomo (Mogi das Cruzes, SP, Brasil) semanalmente. Os pintainhos foram mantidos no Biotério de Aves do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo. Para alimentação das aves, água *ad libitum* e uma ração especial sem antibióticos e antiparasíticos em sua composição (gentilmente fornecida pela Profa. Dra. Lucimara Mendes do Laboratório Biovet) foram disponibilizados. As condições de temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo do biotério eram 26 °C, 60% e 12/12 h (luz/escuro), respectivamente.

3.1.3 Manutenção de *Plasmodium gallinaceum in vivo*

Os experimentos foram realizados com a cepa 8A de *Plasmodium gallinaceum*, cedida gentilmente pela Dra. Antoniana Krettli do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, MG, Brasil. Para início do ciclo *in vivo*, pintainhos com 2 dias de vida foram injetados com amostra de sangue infectado com o protozoário. A parasitemia dos pintainhos injetados foi determinada através de esfregaços de sangue obtidos a partir de 6 dias após inoculação. Para tanto, lâminas com os esfregaços sanguíneos foram coradas com Giemsa para identificação, contagem das células infectadas e cálculo da porcentagem de parasitemia, através de microscopia óptica com aumento de 1000x. Pintainhos que apresentavam parasitemia entre 5 a 10% eram anestesiados através de injeção de xilazina 3ng/Kg e acepromazina 0,3 ng/Kg.

Fêmeas de *Aedes aegypti* contidas em copos plásticos vedados com filó obtiveram repasto sanguíneo infectado por um período de 30 minutos em pintainhos anestesiados, os quais foram sacrificados com CO₂ após a alimentação dos mosquitos. Através do uso de CO₂, os mosquitos foram anestesiados e despejados em uma placa de petri sobre gelo para separação das fêmeas ingurgitadas das não alimentadas com auxílio de uma pinça. De 5 a 10 fêmeas 7 dias após o repasto tiveram seus tratos

digestórios dissecados e os tecidos foram analisados para contagem de oocistos e verificação da infecção do grupo alimentado, através de microscopia de contraste de fase. Para reinício e manutenção do ciclo de *Plasmodium gallinaceum*, fêmeas 14 dias após a infecção obtiveram o segundo repasto sanguíneo em pintainhos sadios (com 2 dias de vida) anestesiados.

3.2 Análises *in silico*

3.2.1 Busca de candidatos

Para identificação de candidatos gênicos de *Aedes aegypti* ativados no final do ciclo gonotrófico do mosquito, uma estratégia comparativa foi elaborada, executando-se uma busca *in silico* inicial no banco de perfis de expressão gênica de *Anopheles gambiae* (angaGEDUCI; <http://www.angaged.bio.uci.edu> - DISSANAYAKE et al., 2006) e usando as sequências selecionadas como isca para a busca de genes ortólogos em *Aedes aegypti*.

O esquema da estratégia delineada está mostrado na Figura 9. De forma detalhada, o filtro do banco de dados foi utilizado e foram filtrados genes de *Anopheles gambiae* com transcrição elevada 48 horas após o repasto. Após obtenção dos gráficos mostrando os perfis de expressão, foram visualmente selecionados os genes que demonstravam transcrição pontual específica e elevada 48 horas após o repasto. Todas as sequências selecionadas de transcritos de *Anopheles gambiae* foram submetidas à análise de similaridade contra o banco de dados de *Aedes aegypti* da TIGR *gene indices* - <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html> (LEE et al., 2005; QUACKENBUSH et al., 2000), através do algoritmo blastn (ALTSCHUL et al., 1990), para identificar possíveis etiquetas de sequências expressas (ESTs) de *Aedes aegypti* depositadas no banco com similaridade aos genes tardios de *Anopheles gambiae*.



Figura 9 - Representação esquemática do algoritmo para busca manual de candidatos gênicos tardios em banco de dados. O processo foi elaborado para a seleção *in silico* de transcritos de *Anopheles gambiae* com expressão tardia no ciclo gonotrófico e busca, por similaridade, de seqüências (ESTs) de *Aedes aegypti* depositadas no banco da TIGR *gene indices*.

3.2.2 Atualizações das análises *in silico* nos bancos TIGR *gene indices* e VectorBase

Após publicação, anotação, depósito e disponibilização pública dos dados do genoma completo de *Aedes aegypti* (NENE et al., 2007) através do banco VectorBase (LAWSON et al., 2007, 2009) e a integração deste com o banco de *Aedes aegypti* da TIGR *gene indices*, análises de atualização das anotações dos transcritos candidatos foram realizadas. Para tanto, as seqüências dos ESTs candidatos de *Aedes aegypti* selecionadas do banco da TIGR *gene indices* (versão 4.0, 2004) foram utilizadas em buscas por similaridade com o uso do algoritmo blastn, contra os bancos VectorBase e TIGR *gene indices* atualizado (versão 5.0, 2008). As anotações foram atualizadas com as informações disponíveis, assim como os códigos dos genes.

3.3 Iniciadores usados nas análises de transcrição

3.3.1 Iniciadores para os genes candidatos

As sequências de *ESTs* de *Aedes aegypti* depositadas no banco TIGR *gene indices* (versão 4.0 - 2004) que apresentaram maior identidade (*best-matched*) com os transcritos selecionados de *Anopheles gambiae* foram utilizadas como molde para desenho de oligonucleotídeos iniciadores *forward* (senso) e *reverse* (reverso) sendo um par de oligonucleotídeos iniciadores para cada cDNA candidato (Tabela 1). Além disso, um iniciador interno *forward* o qual junto com o iniciador *reverse* gera um fragmento de aproximadamente 150pb foi produzido para os genes analisados pela técnica de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) (Tabela 1). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados usando o programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000)

3.3.2 Controles endógenos (genes normalizadores)

Dois genes constitutivos de *Aedes aegypti* (*housekeeping genes*) - Actina 1 (Aaeact-1) e RNA ribossômico 18S (RNAr 18S), já validados anteriormente como genes de referência (ARAUJO, 2010; SANDERS et al., 2003) foram utilizados como controles endógenos e normalizadores nos experimentos de RT-PCR e qRT-PCR. Estes controles forneceram parâmetros importantes para certificação de que variações associadas com integridade do RNA, quantidade variável de tecido inicial e tratamento experimental fossem removidas e não afetassem os resultados finais de quantificação de expressão. Para isso, foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores (TABELA 2) com as mesmas sequências previamente utilizadas nos trabalhos de Sanders et al. (2003) para RNAr 18S, e Araujo et al. (2010) para Aaeact-1.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nos experimentos de PCR, RT-PCR e RT-PCR em tempo real para amplificação de fragmentos dos genes candidatos.

Código no banco TIGR versão 4.0 2004 (Sigla usada)	Código no banco Vectorbase	Sequência dos iniciadores Orientação 5' → 3'	TM (°C)	Iniciadores usados nos experimentos de:			Tamanho esperado dos fragmentos:	
				PCR e RT-PCR	RT-PCR e qRT-PCR	RT-PCR	RT-PCR e qRT-PCR	
TC38081 (Ae81)	AAEL010714	GCAAGTAACGCCGTAGCTCT - <i>F</i>	59,7	x				
		GGACCGAATATCGGACGCTT - <i>In-F</i>	60		x	687 pb		
		CTGATTGCCCTGGATGCATT - <i>R</i>	59	x	x		156 pb	
TC49042 (Ae42)	AAEL000377	CCACAGTCAACATCCTCACC - <i>F</i>	58,9	x				
		TACCTGGACCGCCTTTACACA - <i>In-F</i>	59		x	741 pb		
		TCGATATTTGCTTTCAACGC - <i>R</i>	59	x	x		151 pb	
NACN796TO (Ae96)	AAEL000846	ATACTGCTGCCCTGAAGGTT - <i>F</i>	58,8	x				
		GGACAGACATCCTCCCTGGAT - <i>In-F</i>	59		x	912 pb		
		AATACAACCGACCAGCATGCT - <i>R</i>	58	x	x		151 pb	
TC36931 (Ae31)	AAEL009599	GCCATGAAACACCTAGTGAGC - <i>F</i>	59,8	x	-			
		GTAGTCCCCTCGGAGGCACT - <i>R</i>	59	x	-	828 pb	-	
TC48021 (Ae21)	AAEL003525	ATAGTCCTGCCGTTGCTAGG - <i>F</i>	59,4	x	-			
		CCGAGAAACGTGCAATATTCG - <i>R</i>	59	x	-	592 pb	-	
TC47124 (Ae24)	AAEL011238	ATGTGGCGGCTATTACTGGT - <i>F</i>	59,5	x	-			
		TGCCCAATGTTCACTTG - <i>R</i>	59	x	-	708 pb	-	
TC44745 (Ae45)	-	TGTTACCATTCTGATGTTGGAG - <i>F</i>	57,6	x	-			
		GTTGGTGCCGCAGTGGTAGT - <i>R</i>	60	x	-	678 pb	-	
NABZ660TF (Ae60)	-	CCTCCTAAGGGATAAGCTTGC - <i>F</i>	59,4	x	-			
		TTGACTGCGACAAGAAGCA - <i>R</i>	59	x	-	649 pb	-	

F: Iniciador forward

In-F: Iniciador interno forward

R: Iniciador reverse

x: Indica iniciador usado no experimento

Tabela 2 - Iniciadores utilizados nos experimentos de RT-PCR e RT-PCR em tempo real para amplificação de fragmentos dos genes constitutivos.

Gene Constitutivo	Código GenBank (Nº de acesso)	Sequência dos iniciadores Orientação 5' → 3'	Iniciadores usados nos experimentos de:			Tamanho dos fragmentos gerados:	
			RT-PCR	RT-PCR ou qRT-PCR	RT-PCR	RT-PCR e qRT-PCR	
RNAr 18S	AY988440	CCTTCAACAAGGATCAAGTGG - <i>F</i>	-	x			
		GGAGTAGCACCCGTGTTGG - <i>R</i>	-	x		132bp	
Actina-1 (Aeact-1)	U20287	GAGCGTGGCTACTCCTTAC - <i>F</i>	x	-			
		AGTTTCGTGGATACCGCAAG - <i>R</i>	x	-	249bp		
		ATTGCTCCACCAGAACGTAATACT - <i>F</i>	-	x			
		CAGGATTAACCTAGAAGCACTTGCG - <i>R</i>	-	x		151bp	

F: Iniciador forward

R: Iniciador reverse

x: Indica iniciador usado no experimento

3.4 Extrações de ácidos nucléicos.

3.4.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico de fêmeas de *Aedes aegypti* foi extraído individualmente. A extração foi realizada através do método de fenol-clorofórmio descrito em Sambrook, Fritsch e Maniats (1989), com algumas modificações.

Basicamente, cada mosquito foi macerado suavemente com pistilo de plástico em microtubo com 300 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM, pH 8, contendo EDTA 100 mM, pH 8, SDS 0,5% (p/v)), seguido de adição de mais 300 µL do mesmo tampão. Ao microtubo mantido em gelo foram adicionados 1,5 µL de RNase A 20 µg/ml (Sigma, Aldrich, Steinheim, Alemanha) e após suave homogeneização por inversão, a mistura foi incubada a 37 °C por 45 minutos. Em seguida 3,0 µL de proteinase K 20 mg/mL (Sigma) foram adicionados, a mistura foi agitada suavemente e o microtubo foi incubado a 50 °C por 3 horas. Terminada a incubação, a mistura foi rapidamente resfriada em gelo para adição de 600 µL de fenol equilibrado (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e o microtubo foi agitado com suave inversão em temperatura ambiente por 5 minutos até completa homogeneização da mistura. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 9.000 x g em temperatura de 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante (500 µL) do líquido bifásico obtido foi coletado e transferido para um novo microtubo no qual se adicionou 500 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v). Uma nova homogeneização foi realizada em temperatura ambiente por 5 minutos e a mistura foi novamente centrifugada a 9.000 x g em temperatura de 4 °C por 5 minutos. Foi feita a coleta de 400 µL do sobrenadante e o mesmo foi transferido para um novo microtubo. Após adição de 400 µL de clorofórmio, a amostra foi homogeneizada e centrifugada como descrito na etapa anterior. Em seguida, 300 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo contendo 30 µL acetato de sódio 3 M, seguido de adição de 600 µL de etanol 100% gelado. A mistura foi homogeneizada suavemente por inversão e foi armazenada a -20 °C por 16 horas. O microtubo foi então centrifugado a 9.000 x g em temperatura de 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado para em seguida ser adicionado 1 mL de etanol 100% gelado ao DNA precipitado no fundo

do microtubo. A amostra foi novamente centrifugada a 9.000 x g em temperatura de 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de etanol 70% (v/v) gelado e o microtubo foi centrifugado como descrito no passo anterior. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi seca em temperatura ambiente por 10 minutos. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM, pH 8,0) e armazenado em freezer -20 °C.

3.4.2 Extração de RNA total

O RNA total foi isolado com o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com manual do fabricante. O material isolado foi utilizado em análises temporais e teciduais de acúmulo de transcritos. Para tanto, amostras foram coletadas em diversos períodos de desenvolvimento de *Aedes aegypti*.

Para as análises temporais, 10 insetos inteiros foram definidos como um ponto amostral e os seguintes estágios foram coletados (larvas de 4^o estágio, pupas brancas (0-4 h após pupação), pupas escuras (24 h após pupação), adultos machos e fêmeas recém-emergidos (1 dia de vida) e fêmeas com 5 dias após a emergência nas seguintes condições – alimentadas com sacarose 10% e alimentadas com sangue 24, 48, 60, 72, 84, 96 horas após o repasto.

Já para as análises teciduais, fêmeas com 5 dias após emergência obtiveram repasto sanguíneo e 48 horas após o repasto, os tecidos (corpo gorduroso, intestino médio e pares de ovários) foram dissecados em tampão PBS 1X (NaHPO₄.7 mM, NaH₂PO₄ 2mM, pH 7,0, contendo NaCl 140mM). Após coletados, foram mergulhados em microtubos contendo 500 µL de TRIZOL. Os microtubos foram mantidos em gelo seco antes do processamento do material. Após extração, as amostras foram dissolvidas em água previamente tratada com DEPC (0,1%,v/v) em volume final de 10 a 20 µL, e foram estocadas a -80 °C.

3.5 Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose

3.5.1 Eletroforese de DNA

Cada amostra de DNA foi previamente preparada com a adição de 1/5 do volume de tampão de amostra Orange G, contendo sacarose 65% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 10 mM e Orange G (Sigma) 0,3% (p/v). A eletroforese era realizada em gel composto de agarose (Invitrogen) 1,2%, 1,0% ou 0,8% (p/v) conforme resolução requerida, dissolvida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 50 mM) ou em tampão TAE 1X (Tris 40 mM, Ácido acético 20mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) se, após eletroforese, houvesse necessidade de excisão dos fragmentos de DNA.

Para solubilização completa da agarose, a mistura foi aquecida em forno microondas e posteriormente foi adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/ml). O gel foi transferido para cuba de eletroforese horizontal Owl EasyCast™ E2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e após solidificação, a cuba foi preenchida com tampão TBE 1X ou TAE 1X (dependendo do experimento) até o gel ser coberto e as amostras foram aplicadas. O marcador molecular utilizado nas eletroforeses foi o 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). A eletroforese foi realizada através da aplicação de uma diferença de potencial constante (80 V a 150 V) por um período de tempo suficiente para o fracionamento, ambos definidos de acordo com o experimento executado.

Logo em seguida ao fracionamento das moléculas, a visualização dos fragmentos era realizada com auxílio de aparelho transiluminador ultravioleta UV Transiluminator (UVP, Upland, CA, USA) e o gel era foto documentado em câmera fotográfica digital Olympus SP-350 (Olympus, Tóquio, Japão).

3.5.2 Eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante

A integridade do RNA total extraído foi avaliada pelo fracionamento das moléculas através de eletroforese em gel de agarose desnaturante, até a padronização do protocolo de extração. Todas as soluções foram preparadas com água DEPC e a

eletroforese de RNA total foi realizada em gel agarose 1,4% (p/v) em tampão MOPS 1X (MOPS 40 mM pH 7,0, contendo acetato de sódio 10 mM, EDTA 0,1 mM e formaldeído 18% (v/v)). As amostras de RNA (5 µg), adicionadas ao tampão MOPS 1X, contendo formaldeído 6% (v/v) e formamida 50% (v/v), foram aquecidas a 65°C por 5 minutos e colocadas no gelo. Posteriormente foi adicionado 1/10 do volume de tampão de corrida (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,25% (p/v) e 1 µg de brometo de etídeo) e as amostras foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão MOPS 1X contendo formaldeído 8% em voltagem constante de 100 V. Após fracionamento das moléculas, as bandas de RNA eram visualizadas sob luz ultravioleta e o gel era foto documentado.

3.6 Amplificação de DNA

Moldes de DNA genômicos ou de plasmídeo foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador Biometra[®] (Biometra, Rudolf-Wissel, Goettingen, Alemanha). As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCL 50 mM, Mg⁺⁺ 2,0 mM, dNTPs 0,2mM, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 µL (10 ng) de DNA molde e água ultrapura q.s.p.

O programa básico do termociclador foi configurado para um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 58 °C ou 60 °C (dependendo do par de oligonucleotídeos iniciadores) por 30 segundos, extensão de 72 °C por 1 minuto, e um passo final de alongação a 72 °C por 7 minutos.

Todos os experimentos efetuados foram providos de controle negativo (C-), consistindo de uma reação de PCR com o mesmo par de iniciador da reação experimental, porém sem um DNA molde (substituído por água ultrapura q.s.p.). A ausência de bandas nos resultados da eletroforese do produto das reações C- validava o resultado das outras amostras amplificadas. Além disso, em experimentos com moldes de DNA genômico, um controle positivo (C+) também foi realizado. Para isso, os oligonucleotídeos iniciadores de Actina 1 (Tabela 2) foram utilizados e o programa

do termociclador foi configurado para um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 20 segundos, anelamento a 55 °C por 20 segundos e extensão de 72 °C por 40 segundos, de acordo com Araujo et al. (2010).

3.7 Amplificação e análise temporal de perfil de transcrição por RT-PCR

A presença de transcritos dos *ESTs* selecionados *in silico* foi determinada usando-se a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), assim como a caracterização dos padrões temporais e teciduais de transcrição dos possíveis genes. As amostras de RNA total de *Aedes aegypti*, extraídas em diversos estágios de desenvolvimento do mosquito, em adultos de ambos os sexos, em diferentes intervalos após alimentação sanguínea das fêmeas adultas e também em diferentes tecidos 48 horas após o repasto (como descrito por Material e Métodos no item 3.4.2) serviram como molde para as reações de síntese da 1ª fita de cDNA e posterior amplificação.

3.7.1 Quantificação de RNA total

O RNA total extraído como descrito anteriormente foi quantificado em aparelho espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) ou NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA), considerando-se que uma unidade de absorvância correspondia a 40 µg/ml medido em comprimento de onda de 260 nm. A pureza do RNA extraído foi avaliada pela relação dos valores de absorvância nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm (relação 260/280).

3.7.2 Tratamento de RNA total com DNase

Para eliminar eventuais contaminações por DNA com consequente interferência nos resultados finais de RT-PCR, o RNA total de cada amostra foi tratado com DNase I Amp Grade® (Invitrogen), de acordo com protocolo do fabricante. De forma breve, alíquotas de 2,2 µg de RNA de cada amostra foram tratadas com 2,2 U da enzima. As

reações foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e imediatamente paradas em gelo. Foi adicionado EDTA (concentração final de 2,5 mM) e cada amostra foi incubada a 65 °C por 10 minutos para completa inativação da enzima.

Previamente à síntese de cDNA, a eficiência do tratamento foi certificada pela PCR com oligonucleotídeos iniciadores para β -actina e utilizando-se 200 ng de cada amostra de RNA tratado como molde para a reação. Os produtos da amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose para confirmação da descontaminação das amostras de RNA total. O gel foi corado com brometo de etídeo e apenas as amostras de RNA total que não apresentaram bandas amplificadas serviram como molde para síntese da 1ª fita de cDNA.

3.7.3 Síntese da 1ª fita de DNA complementar (cDNA)

A 1ª fita de cDNA foi produzida com o sistema *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen), seguindo-se protocolo do fabricante. Brevemente, foi utilizado como molde 2,0 μ g de RNA total tratado, 1 μ L de dNTPs 10 mM e 250 ng de oligo(dt)12-18® (Invitrogen) ou iniciador reverso específico (concentração final de 0,5 μ M) quando necessário. As reações foram incubadas por 5 minutos a 65 °C e posteriormente resfriadas em gelo. Então foram adicionados 4 μ L de tampão de síntese de primeira fita 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) e 2 μ L de DTT 0,1 M, e a reação foi incubada 2 minutos a 42 °C. Finalmente, foram adicionadas 200 U da enzima *SuperScript™ II RT* e as reações foram aquecidas por 50 minutos a 42 °C. A enzima foi inativada por 15 minutos a 70 °C e o produto sintetizado foi mantido a -20 °C até a utilização ou foi diretamente usado nas reações de PCR.

3.7.4 PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando moldes de cDNA

Os fragmentos foram amplificados em reações com volume final de 25 μ L contendo 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCL 50 mM, Mg⁺⁺ 2,0 mM, dNTPs 0,2mM, 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 2 μ L de cDNA como molde e água ultrapura q.s.p.

O equipamento utilizado para realização dos ciclos de amplificação foi o termociclador Biometra® (Rudolf-Wissel, Goettingen, Alemanha) e o programa de ciclagem foi configurado para um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 58 °C ou 60 °C (dependendo do par de oligonucleotídeos iniciadores) por 30 segundos, extensão de 72 °C por 1 minuto, e um passo final de alongação a 72 °C por 7 minutos. O mesmo programa foi mantido para amplificação do fragmento de RNA ribossômico 18S (controle endógeno), reduzindo-se apenas o número de ciclos para 20. Já para amplificação do controle endógeno Actina 1, o programa do termociclador foi configurado para um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 20 segundos, anelamento a 55 °C por 20 segundos e extensão de 72 °C por 40 segundos, de acordo com Araujo et al. (2010).

Na etapa de amplificação, os experimentos de RT-PCR foram realizados sempre com a inserção de controles negativos (C-), consistindo de uma reação sem molde de cDNA.

3.8 RT-PCR em tempo real

3.8.1 Preparação do DNA de plasmídeos e geração de curvas-padrão

O DNA de plasmídeos (vetor PCR® 2.1), com inserto referente aos fragmentos de cDNA de ~150 pb dos transcritos sujeitos à quantificação, foram utilizados para preparação de curvas-padrão. Para isso, 100 ng de cada DNA de plasmídeo foram utilizados em reações de digestão com a enzima de restrição *Xba*I para linearização dos mesmos. Após linearização, o DNA de plasmídeos foi purificado e em seguida quantificado em espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Amershan Pharmacia Biotech). A concentração de cada amostra foi utilizada no cálculo do número de cópias de acordo com a seguinte fórmula:

$$\left[\frac{X \text{ g} / \mu\text{L DNA}}{(\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660 \text{ g} / \text{mol})} \right] \times 6,022 \times 10^{23} \text{ cópias} / \text{mol} = Y \text{ cópias} / \mu\text{L}$$

Para cada gene sob estudo dos níveis de transcrição foi gerada uma curva-padrão, através de 5 diluições do DNA de plasmídeo contendo o inserto específico com concentrações entre 1 ng/ μ L até 0,1 fg/ μ L e cada amostra foi medida em triplicata.

3.8.2 Quantificação dos transcritos

O RNA total extraído de 10 fêmeas inteiras em vários pontos amostrais após o repasto sanguíneo foi usado para análise quantitativa de expressão. Para isso, amostras de RNA de 3 replicatas biológicas para cada ponto amostral foram reversamente transcritas para síntese da primeira fita de cDNA usando oligonucleotídeos iniciadores específicos.

As reações foram ajustadas para um volume final de 20 μ L, e cada reação continha 2 μ L de cDNA como molde, 0,4 μ M de cada iniciador, e o kit ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Epsom, SRY, UK) foi utilizado conforme orientação do fabricante para obtenção do número de cópias dos transcritos através da medição da incorporação de marcador fluorescente (SYBR Green) nos produtos de fita dupla gerados.

Para estimar o número de cópias dos transcritos, o DNA de plasmídeos linearizados contendo fragmentos de cDNA de ~150 pb dos transcritos de interesse foi preparado em diluições seriadas, com concentrações variando de 1 ng/ μ L até 0,1 fg/ μ L. O valor do sinal fluorescente de cada amostra experimental foi comparado com a curva-padrão produzida através da amplificação do fragmento correspondente, clonado nos plasmídeos com concentração previamente conhecida.

As reações foram realizadas no equipamento Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), seguindo instruções do manual do fabricante. As condições de amplificação foram: 95 °C por 15 minutos, seguido de 45 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Análises das curvas de dissociação (*melting curve*) referentes às amostras controle e experimentais foram realizadas para certificação da especificidade dos fragmentos amplificados (*amplicons*) e, tanto para os genes alvo quanto para o controle endógeno, somente houve validação

das análises quando as amostras apresentaram pico único no gráfico. Além disso, nenhum sinal fluorescente foi detectado nos controles negativos (reações sem cDNA ou DNA de plasmídeo como molde) dos ensaios utilizados para a análise quantitativa de acúmulo de transcritos.

Para os experimentos, cada pool amostral de 10 fêmeas vitelogênicas (36, 48, 60, 72, 84, 96 horas após o repasto) foi analisado em triplicata e o ensaio foi repetido três vezes com lotes biológicas independentes, exceto para 84 horas após o repasto, medido em duplicata.

O gene actina-1 (*Aaeact-1*) foi adotado e validado em cada análise como controle endógeno através de teste estatístico, com o requerimento de não apresentar variações significativas entre os pontos amostrais. Desta forma, o número de cópias de transcritos deste gene foi usado para normalizar variações na concentração de cDNA total (CHEN et al., 2004; ZHU; CHEN; RAIKHEL, 2007).

3.9 Bactérias utilizadas e protocolos de preparação

3.9.1 Linhagens de *Escherichia coli* (*E. coli*) e genótipos

As linhagens de *E. coli* utilizadas e seus respectivos genótipos foram:

-BL21(DE3)pLysS: F⁻ *ompT hsdSB* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3)pLysS (Cam^r)

-DH10B: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 endA1 araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galJ galK* λ- *rpsL nupG tonA*.

-DH5α (Subcloning efficiencyTM DH5αTM Competent cells, Invitrogen):φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ-.

-DH5α: *supE44* Δ*lac* U169 *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*.

-SURE: e14⁻, (*mcrA*⁻), Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171, *endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC::Tn5(kan^r), uvrC*, [F', *proAB, lacI^fZ*ΔM15:: Tn10(*tet^r*)]

-TOP10 (One shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen): F⁻ *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *araD139* $\Delta(araleu)7697$ *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* λ -.

3.9.2 Preparação de bactérias eletrocompetentes

A partir do estoque de bactérias *Escherichia coli* (cepa DH10B) armazenado a -80 °C, obteve-se um pré-inóculo o qual foi semeado em 5 mL de meio de cultura LB líquido (triptona 10g, extrato de levedura 5g e NaCl 5g para 1L) e incubado sob agitação a 37 °C por 16 horas. A cultura total saturada foi inoculada em 500 mL de meio LB líquido e a mistura foi incubada sob agitação a 37 °C até atingir uma DO_{600nm} de 0,6. A cultura foi repousada em gelo por 30 minutos e em seguida foi centrifugada por 5 minutos a 7000 x g a 4 °C. Após a centrifugação, o meio de cultura líquido foi descartado e as bactérias sedimentadas foram ressuspensas em 500 mL de água resfriada. As células, novamente centrifugadas como descrito anteriormente, foram ressuspensas em 250 mL de água resfriada. O material foi levado ao último passo de centrifugação sob as mesmas condições e finalmente as bactérias foram ressuspensas em 1,5 mL de glicerol 10% (v/v) diluído em água. Microtubos foram colocados em gelo e as células eletrocompetentes foram aliqüotadas (40 μ L/microtubo), congeladas em banho de gelo seco e armazenadas a -80 °C.

3.9.3 Transformação de bactérias eletrocompetentes

À aliqüota (40 μ L) de bactérias eletrocompetentes foi adicionado um volume de 5 μ L da reação de ligação e a mistura foi despejada em cubeta de eletroporação de 0,2 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A cubeta foi colocada em eletroporador Cellject Hybaid (Bioscience Technology, Rockaway, NJ, USA) e as bactérias foram eletroporadas em pulso de 2500 V. Após eletroporação, as bactérias foram recuperadas das cubetas adicionando-se 1 mL de meio de cultura LB líquido, e a mistura foi transferida para novo tubo e mantida a 37 °C por 1 hora em agitação suave. Após este período as bactérias foram plaqueadas em meio de cultura LB-ágar contendo IPTG 1

mM, ampicilina 100 µg/ml e X-Gal 30 µg/mL, ou em placas somente com ampicilina ou outro antibiótico apropriado, dependendo do experimento e do DNA de plasmídeo transformado.

3.9.4 Preparação de bactérias quimiocompetentes

3.9.4.1 *Escherichia coli*, cepa BL21

A preparação foi iniciada com um estoque de bactérias *Escherichia coli* (cepa BL21) mantido a -80 °C. Deste, um pré-inóculo foi semeado em 3 mL de meio LB líquido, e a mistura foi incubada sob agitação a 37 °C por 16 horas. Da cultura saturada, 100 µL foram utilizados como inóculo para semear-se 100 mL de meio LB. A cultura foi incubada sob agitação a 37 °C até atingir uma DO_{600nm} de 0,5. A cultura foi centrifugada por 5 minutos a 7000 x g a 4 °C. Após a centrifugação, o meio de cultura líquido foi descartado e as bactérias sedimentadas foram ressuspensas em 20 mL de solução de acetato de sódio 10 mM, pH 7,5, $MnCl_2$ 50 mM, KCl 100 mM, $CaCl_2$ 100 mM e glicerol 15% (v/v). A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e o passo de centrifugação foi repetido como descrito. A solução foi descartada e as bactérias sedimentadas foram ressuspensas em 2,0 mL de solução de MOPS 10 mM, pH 7,0, KCl 10 mM, $CaCl_2$ 75 mM e glicerol 15% (v/v). A solução de bactérias foi aliquoteada em microtubos previamente mantidos em gelo (25 µL/microtubo), seguida de congelamento em N_2 líquido e armazenamento a -80 °C.

3.9.4.2 *Escherichia coli*, cepas DH5α e SURE

Os estoques de bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α ou SURE foram utilizados para preparação. Para isso, um pré-inóculo foi semeado em 5 mL de meio LB líquido e foi incubado sob agitação a 37 °C por 16 horas. A cultura total saturada foi inoculada em 500 mL de meio LB líquido e a mistura foi incubada sob agitação a 37 °C até atingir

uma DO_{600nm} de 0,6. A cultura foi repousada em gelo por 8 minutos e em seguida foi centrifugada por 5 minutos a $7000 \times g$ a $4^\circ C$, seguido de descarte do sobrenadante. As bactérias sedimentadas foram ressuspensas em solução gelada de $MgCl_2$ 25 mM, seguido de passo de centrifugação como descrito acima. O sobrenadante foi novamente descartado e as bactérias foram ressuspensas em solução gelada de $CaCl_2$ 25 mM. A mistura foi novamente centrifugada como descrito, a solução foi descartada e as bactérias foram ressuspensas em 5,37 ml de solução gelada de $CaCl_2$ 0,1 M contendo glicerol 10% (v/v). Em microtubos previamente mantidos em gelo, a solução de bactérias competentes foi alíquotada (100 μl /microtubo), congelada em N_2 líquido e armazenada a $-80^\circ C$.

3.9.5 Transformação de bactérias quimiocompetentes

DNA de plasmídeo sujeito à re-transformação (10 ng) ou 5 μL do produto da reação de ligação foram misturados à alíquota de bactérias quimiocompetentes cepa DH5 α . O microtubo com a mistura foi mantido por 30 minutos em gelo e posteriormente foi realizado um tratamento de choque térmico nas bactérias por incubação a $42^\circ C$ por 30 segundos. Rapidamente o microtubo foi colocado em gelo por 2 minutos e em seguida 500 μL de meio LB líquido foram adicionados à mistura. O microtubo foi agitado suavemente em temperatura de $37^\circ C$ por 1 hora e 100 a 200 μL da mistura foram plaqueados em LB/ágar contendo antibiótico(s) de acordo com a resistência conferida pelo plasmídeo transformado, em concentração adequada (ampicilina 100 $\mu g/mL$, kanamicina 50 $\mu g/ml$, cloranfenicol 34 $\mu g/ml$).

O vetor *pKhsp82MOS* foi re-transformado em bactérias da cepa SURE, e o vetor de expressão destinado aos experimentos de expressão de proteína recombinante foi re-transformado em bactérias da cepa BL21(DE3)pLysS, todos seguindo o protocolo de transformação por choque térmico descrito acima.

O DNA de plasmídeos obtido nas reações TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) cloning reaction (clonagens efetuadas nos experimentos de amplificação rápida de extremidades de cDNA - 5'- e 3'- RACE) foi transformado em bactérias da cepa TOP10 (Invitrogen) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

As reações de ligação para subclonagem do promotor destinado à caracterização em vetor *pMos[3xP3-eGFP-DsRED]* foram transformadas em DH5 α *Subcloning efficiency*TM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com manual do fabricante.

3.10 Purificação dos produtos de PCR

Tanto para as reações de ligação quanto para as reações de sequenciamento, o volume total dos produtos amplificados pela reação da PCR foi purificado com o uso do kit QIAquick[®] Purification PCR Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) conforme procedimentos descritos pelo fabricante. Quando não utilizados imediatamente, os produtos purificados foram armazenados a -20 °C.

3.11 Excisão de gel de agarose e purificação de fragmentos de DNA

Após fracionamento dos produtos de digestão por eletroforese em gel de agarose dissolvida em tampão TAE 1X, os fragmentos de DNA destinados à subclonagem em DNA de plasmídeo já linearizado e desfosforilado foram visualizados sobre transluminador UV. Após conferência das bandas e com auxílio de uma lâmina cortante esterilizada, os mesmos foram excisados e transferidos para microtubo. A purificação dos fragmentos foi realizada com o QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), conforme manual do fabricante.

3.12 Extração e purificação de DNA de plasmídeo

Após transformação do DNA de plasmídeo e plaqueamento das bactérias, as colônias de interesse foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de LB líquido contendo antibiótico em concentração adequada e a mistura foi incubada sob agitação a 37 °C por 16 horas. Ao término da incubação, 1,5 mL da cultura foi centrifugado por 1 minuto

a 12.100 x g. O meio LB foi descartado e as bactérias sedimentadas foram lisadas para recuperação e purificação do DNA de plasmídeo com o uso do kit QIAGEN Plasmid Mini kit (QIAGEN), de acordo com instruções do fabricante.

3.13 Clivagem de DNA de plasmídeo com endonucleases

Amostras de DNA de plasmídeo (0,1 µg a 1 µg) foram digeridas com o uso de enzimas de restrição da New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA) ou Invitrogen, em condições descritas pelos fabricantes. Brevemente, em reações com volumes finais de 20 µL a 100 µL, as digestões foram realizadas na temperatura ótima e no tempo de incubação ideal para cada enzima (1 a 16 horas) em tampão adequado fornecido pelo fabricante. Todos os produtos de digestão foram conferidos por eletroforese em gel de agarose. Para o DNA de plasmídeo digerido com duas enzimas de restrição (tampões de reação incompatíveis), foi realizada uma digestão inicial com a primeira enzima, seguido de precipitação rápida do DNA de plasmídeo digerido, para então ocorrer a segunda digestão com a enzima seguinte. Para precipitação rápida, a amostra teve seu volume mensurado e foram adicionados 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol 100% gelado. A amostra foi agitada suavemente e o material foi centrifugado por 10 minutos a 12.100 x g. O sobrenadante foi descartado e, ao DNA precipitado, foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado. O material foi novamente centrifugado como descrito, seguido de descarte do sobrenadante. A amostra foi seca por 10 minutos a temperatura ambiente e o DNA foi ressuspensionado em água ultrapura em volume de 25 µL.

3.14 Desfosforilação de vetores para subclonagem

O DNA de plasmídeos utilizado em subclonagens foi digerido com enzima de restrição apropriada e em seguida foi desfosforilado, para prevenir eventos de re-ligação sem os insertos subclonados. Para isso, cada reação foi realizada em volume final entre 20, 50 ou 100 µL contendo 1 µg de DNA de plasmídeo linearizado, 5

unidades da enzima Antarctic phosphatase (New England Biolabs), 1/10 do volume da reação de tampão de desfosforilação 1x (fornecido pelo fabricante) e água ultrapura q.s.p. Após preparação, as reações foram incubadas em temperatura de 37 °C por 15 minutos (para DNA de plasmídeo com extremidade 5' não-pareadas) ou por 60 minutos (para DNA de plasmídeo com extremidade 3' não-pareadas). Em seguida, as reações foram incubadas em temperatura de 65 °C por 5 minutos para completa inativação da enzima.

3.15 Ligação de fragmentos de DNA (insertos) em vetores

Os produtos de PCR já purificados foram ligados, dependendo do experimento, em um dos seguintes vetores comerciais: pCR[®] 2.1 (ANEXO A) com TA Cloning[®] kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (ANEXO B), vetor pCR[®]II-TOPO[®] (ANEXO C) com TOPO TA Cloning kit (Invitrogen), ou em vetor pjet1.2 (ANEXO D) com CloneJET[™] PCR Cloning Kit (Fermentas, Burlington, Ontario, Canadá) seguindo-se instruções do fabricante e em reações com volumes finais de 10, 6, 6 ou 20 µL, respectivamente. A enzima T4 Ligase (Invitrogen) foi adicionada (1 U) nas reações de ligação com o TA Cloning[®] kit.

Para as subclonagens, os fragmentos de DNA purificados foram ligados em DNA de plasmídeos previamente desfosforilado, em relações molares fragmento:vetor de 1:1 e/ou 3:1, de acordo com o experimento. A quantidade em ng de fragmento:vetor para atingir as relações molares descritas foram estimadas de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Tamanho do fragmento (pb)}}{\text{Tamanho do vetor (pb)}} \times \text{quantidade em ng de vetor} = \text{quantidade em ng de fragmento}$$

As reações de ligação para subclonagem de fragmentos de DNA foram realizadas em volume final de 10 µL, contendo 1 U da enzima T4 ligase (Invitrogen) em tampão adequado fornecido pelo fabricante. As reações foram incubadas a 14 °C por 16 horas, seguindo-se então ao procedimento de transformação.

3.16 Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR ou clones de interesse ambos previamente purificados foram utilizados como molde nas reações de sequenciamento realizadas com kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) conforme manual do fabricante. As reações continham 1 µM de oligonucleotídeo iniciador específico, 0,75 µL de BigDye, 3,25 µL de tampão *Save Money* (Tris-HCl 200 mM, pH 9,0, contendo MgCl₂ 5 mM), 100 ng de produto de PCR ou 100 a 200 ng de DNA de plasmídeo e água ultrapura q.s.p.

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Biometra[®] (Biometra) e o programa foi configurado com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 96 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos, e extensão a 60 °C por 4 minutos.

Finalizada a etapa da reação de sequenciamento, a precipitação dos produtos foi efetuada. Para isso a cada reação foi adicionado 90 µl de isopropanol 66% (v/v) e as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente num local protegido de incidência de luz. Os microtubos foram centrifugados a 15.300 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 150 µl de isopropanol 75% (v/v), seguido de novo passo de centrifugação como descrito acima. O sobrenadante foi novamente descartado e as amostras foram secas em temperatura ambiente por 10 minutos. Previamente ressuspendidas em 10 µl de formamida, cada amostra foi sequenciada no aparelho Sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) e as sequências obtidas foram analisadas no programa Seqman (software DNASTar, Lasergene).

Os clones obtidos durante os experimentos de amplificação rápida de extremidades de cDNA (5'- e 3'- RACE) foram sequenciados pela *facility* de análise de DNA Science Hill da Universidade Yale (New Haven, Connecticut, USA), conforme instruções fornecidas.

3.17 Análises do gene AAEL010714

3.17.1 Hibridização *in situ* em ovários

Através do uso de pares de oligonucleotídeos iniciadores para AAEL010714 (Tabela 1) e de molde de cDNA obtido de fêmeas 48 horas após o repasto, o produto amplificado foi ligado em vetor pCR[®]II-TOPO[®] (Invitrogen) e transformado em células competentes. O clone obtido com 687 pb foi sequenciado e a análise de similaridade por blastn foi realizada contra o banco VectorBase. Nesta análise, 686 pb de 687 pb do clone sequenciado mostrou um *e-value* de 0.0, um score de 598 e uma porcentagem de identidade de 96,79% em relação ao transcrito AAEL010714-RA (*best-matched*). Este clone foi usado como sonda. Os procedimentos de hibridização *in situ* foram realizados como anteriormente descrito em Calvo et al. (2005) e Juhn e James (2006).

3.17.2 Experimentos de comparação dos níveis de transcrição do gene AAEL010714

3.17.2.1 Comparação entre fêmeas virgens e copuladas

Nestes experimentos fêmeas 4 dias após emersão as quais eram alimentadas com sacarose 10% *ad libitum* foram utilizadas e dois grupos experimentais foram montados. O primeiro grupo foi composto de fêmeas virgens armazenadas por 24 horas em copo plástico de 500 mL sem disponibilização de machos. Já no segundo grupo, machos foram colocados no mesmo copo plástico contendo fêmeas virgens na proporção 1 macho:1 fêmea e o cruzamento foi realizado durante um período de 24 horas.

Durante este intervalo, a solução de sacarose 10% não foi disponibilizada para ambos os grupos e ao término deste intervalo, as fêmeas virgens e copuladas realizaram o repasto sanguíneo por 20 minutos em camundongos anestesiados.

Somente as fêmeas completamente ingurgitadas foram utilizadas no experimento e foram novamente mantidas com solução de sacarose 10%.

Exatamente 48 horas após o repasto sanguíneo, 10 fêmeas de cada grupo foram coletadas para extração de RNA total (pool de 10 fêmeas virgens e pool de 10 fêmeas copuladas), síntese de cDNA e análise por RT-PCR em tempo real. As medições dos níveis de transcrição entre o grupo de fêmeas virgens e copuladas foram realizadas em três experimentos independentes (triplicata biológica).

3.17.2.2 Fêmeas sadias e infectadas com *Plasmodium gallinaceum*

Nestes experimentos fêmeas 5 dias após emergência, mantidas com sacarose 10% *ad libitum* foram utilizadas. Primeiramente, a sacarose 10% não foi oferecida às fêmeas durante 24 horas que antecederam o repasto sanguíneo. As fêmeas foram divididas em dois grupos. As fêmeas do grupo sadio (controle) realizaram repasto sanguíneo em pintainho sadio e as fêmeas do grupo experimental foram alimentadas através de repasto sanguíneo em pintainho infectado com *Plasmodium gallinaceum*. As fêmeas completamente ingurgitadas de ambos os grupos foram separadas e mantidas novamente com solução de sacarose 10%. Exatamente 48 horas após o repasto sanguíneo, 10 fêmeas de cada grupo foram coletadas para extração de RNA total (pool de 10 fêmeas sadias e pool de 10 fêmeas infectadas), síntese de cDNA e análise por RT-PCR em tempo real. As medições dos níveis de transcrição entre o grupo de fêmeas virgens e copuladas foram realizadas em três experimentos independentes (triplicata biológica). A confirmação da infecção do grupo experimental foi realizada conforme descrito na seção 3.1.3

3.17.3 Expressão de proteína recombinante

3.17.3.1 Subclonagem do fragmento de cDNA em vetor de expressão

Para obtenção da proteína parcial do gene AAEL010714, foi escolhido um sistema de expressão de proteína recombinante fusionada à cauda de glutathione S-transferase (GST). O vetor de expressão pGEX-4T-3 (ANEXO E)(GE Healthcare) foi usado para expressão da proteína recombinante fusionada e o fragmento de cDNA parcial do gene AAEL010714 foi subclonado neste vetor. Para tanto, o DNA do plasmídeo pCR[®] 2.1 contendo o cDNA parcial do gene foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I e o fragmento purificado foi ligado no DNA do vetor de expressão previamente linearizado, o qual foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. Com os sítios de restrição clivados, a ligação foi coesiva com clonagem direcionada do inserto.

Após transformação em bactérias da cepa DH10B, seleção por ampicilina das colônias contendo o DNA de plasmídeo com inserto, purificação, e confirmação da subclonagem do cDNA parcial por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Not*I, o clone foi sequenciado com os iniciadores *pGEX Sequencing Primer* (GE Healthcare), e a sequência obtida foi analisada para conferência da fase de leitura.

3.17.3.2 Re-transformação do vetor, indução de expressão, purificação e detecção da proteína recombinante

O DNA do vetor de expressão pGEX-4T-3 contendo o fragmento de cDNA parcial do gene AAEL010714 foi re-transformado em bactérias da cepa BL21, na qual a expressão da proteína recombinante foi realizada. As colônias de interesse foram selecionadas em placas LB/ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol

A expressão heteróloga em bactérias foi realizado de acordo com protocolo descrito em Fratus (2008), com pequenas modificações. Basicamente, uma colônia transformada com o vetor de expressão foi inoculada (pré-inóculo) em 10 mL de meio líquido LB contendo 100 µg/ml de ampicilina, 34 µg/ml de cloranfenicol e glicose 1% (p/v) e a mistura foi crescida sob agitação em temperatura de 37 °C por 16 horas. Ao término da incubação, a cultura saturada foi inoculada em 100 mL de meio líquido LB

contendo os antibióticos descritos acima na concentração adequada e glicose 1%, e a mistura foi novamente incubada a 37 °C até atingir DO_{600nm} maior que 1 (~3 horas).

A pré-indução das bactérias foi realizada com resfriamento da cultura em temperatura de 4 °C por 30 minutos. Em seguida, a indução foi iniciada com a adição de IPTG em concentração final de 0,2 mM e a cultura foi incubada a 37 °C por 3 horas.

As bactérias foram recolhidas por centrifugação a 1200 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as bactérias sedimentadas foram ressuspensas em 4 mL de tampão de lise (TRIS-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 100mM, Triton, 1% (v/v) e lisozima 20 µg/ml) e o mistura foi em seguida congelado a -20 °C por 16 horas.

Após período de incubação, as células bacterianas foram rompidas por sonicação (3 pulsos de 1 minuto a 40% de eficiência). O lisado foi então centrifugado em temperatura de 4 °C a 12.100 x g por 30 minutos e a fração solúvel foi recuperada. O volume total da fração solúvel foi utilizado para purificação por afinidade da proteína fusionada recombinante, através da resina glutationa-sepharose 4b (Amersham Biosciences), utilizada de acordo com as instruções do fabricante.

Ao término do procedimento de purificação, um volume de 20 µL da fração eluída foi analisado em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e o gel foi corado com solução de Comassie Blue para visualização das bandas. A confirmação da expressão da proteína recombinante foi realizada por método de *Western Blot* utilizando soro murino anti-GST.

3.17.3.3 Imunização de camundongos da linhagem Balb/c

Para imunização dos camundongos e tentativa de produção de anti-soro policlonal, a proteína recombinante eluída foi aplicada em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Ao final da eletroforese, 5 bandas (aproximadamente 20 µg de proteína recombinante) foram recortadas do gel de poliacrilamida e foram maceradas em microtubo de 1,5 mL com 200 µL de tampão TBS 1x, (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 contendo NaCl 0,8% (p/v)). Após completo maceramento das bandas, um volume de 200 µL de

adjuvante completo de Freund (Sigma) foi adicionado, e a mistura foi emulsificada por sonicação.

Para imunização, 4 camundongos com 35 dias de vida foram inoculados com 3 injeções subcutâneas com intervalos de 15 dias entre a 1ª e 2ª inoculações e 7 dias entre a 2ª e 3ª inoculações. Na 1ª inoculação, os camundongos foram injetados com 100 µL da mistura emulsificada (5 µg de proteína recombinante por camundongo). O mesmo protocolo foi realizado para as inoculações subsequentes, porém o adjuvante incompleto de Freund (Sigma) foi utilizado.

Sete dias após a última inoculação, o sangue foi coletado através de punção do plexo venoso retro-ocular com auxílio de um capilar de vidro, e foi incubado a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, o sangue foi incubado a 4 °C por 30 minutos e finalmente foi centrifugado a 2.000 x g por 5 minutos, para separação do plasma e o sobrenadante foi coletado. Às amostras foi adicionado um mesmo volume de glicerol (1:1) e as mesmas foram armazenadas a -20 °C.

3.17.4 Síntese comercial do peptídeo e produção de antisoro

O peptídeo GNQFSSSIDGL foi usado para gerar antisoro anti-AaegOBP45. A sequência do peptídeo foi submetida à análise utilizando o algoritmo blastp contra o banco NCBI para garantir que somente representasse uma sequência única (<10% de sobreposição – “*overlap*”). Este peptídeo foi sintetizado e o antisoro para AaegOBP45 foi gerado em coelhos usando protocolo padrão (Proteimax Biotechnology Ltda., Cotia, São Paulo, Brasil).

3.17.5 Obtenção de proteínas solúveis de ovários e quantificação das amostras

Fêmeas vitelogênicas 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo foram utilizadas para obtenção de proteínas solúveis de ovários. Os pares de ovários (5 a 10 para cada intervalo) foram dissecados e homogeneizados com pistilo apropriado para microtubo em tampão PBS 1X (NaHPO₄.7 mM, NaH₂PO₄ 2mM, pH 7,0, contendo NaCl

140mM e 1µl/mL de coquetel de inibidores de proteases (50 µg/mL de leupeptina, 5 µg/mL de pepstatina, 5 µg/mL quimostatina, 5 µg/mL antipaína, 5 µg/mL PMSF) e E-64 5 µM). O material foi centrifugado a 12.100 x g por 10 minutos e o sobrenadante correspondente à fração solúvel foi coletado. As amostras mantidas em gelo foram quantificadas e em seguida eram armazenadas a -20 °C.

As amostras de proteínas solúveis de ovários foram quantificadas através do método descrito por Bradford (1976) e com o uso do reagente Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para elaboração de curva-padrão, diluições seriadas de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram utilizadas e a leitura de absorvância (comprimento de onda de 595 nm) foi realizada em aparelho Multiskan EX (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA). Os valores gerados pela leitura foram utilizados para obtenção da equação da reta com o auxílio do programa Microsoft Excel.

3.17.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

O fracionamento das proteínas foi realizado em SDS-PAGE descontínuo (LAEMMLI, 1970), e os géis de separação (com concentração de acrilamida de 12%) e empacotamento foram preparados de acordo com o protocolo descrito em Sambrook, Fritsch e Maniats (1989). Os géis foram polimerizados em sistema de mini-gel da Bio-Rad (mini protean III), usando espaçadores de 0,75 mm ou 1,0 mm de espessura, dependendo do experimento.

As amostras, previamente misturadas em tampão de amostra composto de Tris 50 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), DTT 100 mM, glicerol 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,01% (p/v) foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos e aplicadas no gel. O marcador de massa molecular utilizado nas eletroforeses foi o Page Ruler™ Prestained Protein ladder da Fermentas (Burlington, Ontario, Canadá) A eletroforese foi realizada com voltagem constante igual a 20 V/cm e em temperatura ambiente. Após eletroforese, o gel foi retirado das placas de vidro e os polipeptídeos fracionados foram corados com solução de Coomassie blue R 0,2% dissolvido em metanol:ácido acético:água

(50:10:40, v/v/v) por um período de 1 hora. Em seguida o gel foi repetidamente lavado com solução de descoloração composta de etanol:ácido acético:água (25:8:65, v/v/v) e o mesmo foi submetido à última lavagem com água destilada.

3.17.7 Análise por Western Blot

Extratos de proteína total de ovários dissecados 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo (50 µg para cada amostra) foram aplicados em duplicata em gel SDS-PAGE 12% sob condições desnaturantes. Após eletroforese, um gel foi corado com solução de coloração e o outro gel foi utilizado para eletro-transferência em membrana de nitrocelulose *Trans-Blot transfer medium-supported nitrocellulose membrane* (Bio-Rad), através do sistema semi-seco *Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) em presença de tampão Tris 48 mM, glicina 39 mM, 0,037% SDS e metanol 20%, como descrito por Harlow e Lane (1988).

Após a transferência, o bloqueio das membranas, incubações com antisoros e procedimentos de detecção foram realizados seguindo-se instruções descritas no manual do kit *ECL Plus Western Blotting Reagent* (GE Healthcare, Little Chalfont, Duckinghamshire, England). Basicamente, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado 10% por 16 horas e incubada com antisoro primário Anti-AaegOBP45 em uma diluição de 1:500. Já o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Sigma) conjugado com peroxidase foi usado em diluição de 1:2500. A detecção das bandas imunorreativas foi realizada com kit detecção quimioluminescente usando o reagente *ECL Plus Western Blotting Reagent* (GE Healthcare).

Nos experimentos de expressão de proteína recombinante, o mesmo protocolo foi utilizado, porém a proteína recombinante foi detectada com soro murino anti-GST em diluição de 1:1000 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Sigma) em diluição 1:2500.

3.17.8 Amplificação rápida de extremidades de cDNA 5' e 3' (RACE) do transcrito AAEL010714

O RNA total foi extraído de ovários 48 horas após o repasto como descrito no item 3.4.2. As reações para produzir cDNAs 5'- e 3'- RACE foram realizadas usando o kit SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit da Clontech (Mountain View, CA, USA) e as instruções do fabricante foram seguidas. Os oligonucleotídeos iniciadores gene específicos (Gene specific primers – GSPs) GSP1-F e GSP1-R foram usados para amplificar as regiões 3'-UTR e 5'-UTR, respectivamente (Tabela 3) e também foram utilizados juntos (GSP1-F + GSP1-R) em outra reação como controle positivo. Além disso, foram realizadas reações 5'- e 3'- RACE com iniciadores que se anelam em pontos diferentes do transcrito (GSP2-F e GSP3-F para 3'-UTR, e GSP2-R e GSP3-R para 5'-UTR) (Tabela 3), para facilitar a montagem da sequência consenso. As reações de PCR foram realizadas com Advantage 2 polymerase mix (Clontech) e os ciclos de amplificação foram determinados da seguinte maneira: 5 ciclos de 30 segundos a 94 °C e 3 minutos a 72 °C; 5 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 70 °C e 3 minutos a 72 °C; 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 68 °C e 3 minutos a 72 °C; e um passo final de 10 minutos a 72 °C para extensão.

Tabela 3 - Iniciadores gene - específico (GSPs) utilizados nos experimentos de amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE).

Iniciadores	Sequência dos iniciadores Orientação 5' → 3'	Iniciadores usados nas reações de amplificação		
		5'-RACE	3'-RACE	Controle positivo
GSP1-F	GCACTTTGACAAGTTACGCCGAAGCTCT-F		x	x
GSP1-R	ACCTGTCATAACAGCTGACCACCGCTTG-R	x		x
GSP2-F	AGGCAACGGCCTTCGGACGTTTTGTT-F		x	x
GSP2-R	CCTGCGCAAACGATTGCTCGATACTA-R	x		x
GSP3-F	CTGATTGCCCTGGATGCATT-F		x	x
GSP3-R	GCAAGTAACGCCGTAGCTCT-R	x		x

F: Iniciador *forward*

R: Iniciador *reverse*

x: Indica iniciador usado no experimento

Os produtos amplificados foram ligados no DNA do vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen) e após ligação, o DNA foi transformado na cepa *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen). Para montagem da sequência consenso, 19 clones para cada reação (3'-UTR com iniciador GSP1-F e 5'-UTR com iniciador GSP1-R) foram isolados e sequenciados usando oligonucleotídeos iniciadores universais de vetor M13For e M13Rev. Clones adicionais gerados com os iniciadores GSP2-F (4 clones), GSP2-R (4 clones), GSP3-F (8 clones) e GSP3-R (8 clones) foram também isolados e sequenciados, auxiliando na análise. As sequências obtidas foram montadas no programa SeqMan II (DNASar-Lasergene) e uma sequência consenso foi gerada.

3.17.9 Alinhamento de nucleotídeos

Os alinhamentos de sequências nucleotídicas foram feitos usando o programa BioEdit (versão 7.0.9.0) (HALL, 1999) ou programa SeqMan II (DNASar-Lasergene).

3.17.10 Análises de sequências de proteínas, peptídeo sinal, predição de sítios de glicosilação, alinhamentos e análises filogenéticas

A detecção da fase aberta de leitura (ORF) e tradução teórica foi feita usando o programa EditSeq (DNASar-Lasergene). O programa Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) foi usado para predição do peptídeo sinal. A predição de sítios de glicosilação foi realizada usando EnsembleGly, disponível em <http://turing.cs.iastate.edu/EnsembleGly/indices.html> (CARAGEA et al., 2007). Os alinhamentos dos peptídeos maduros foram produzidos no programa ClustalX (versão 2.0) (THOMPSON et al., 1997) com parâmetros padrão. A figura do alinhamento foi feita usando-se o programa GeneDoc, versão 2.7.000 (NICHOLAS; NICHOLAS; DEERFIELD, 1997). Baseado no alinhamento da proteína, relações filogenéticas foram inferidas usando o programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007). Uma árvore não

enraizada foi gerada pelo método de neighbor-joining. Teste de bootstrap foi realizado com 1000 replicatas e um limite de corte de 50 foi aplicado.

3.17.11 Análise da sequência a montante do gene AAEL010714

Todos iniciadores utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento durante o isolamento dos fragmentos de 2.5 kb e 1 kb da região a montante do gene AAEL010714, assim como os iniciadores utilizados durante a construção dos vetores estão listados na Tabela 4 e são citados ao longo dos procedimentos descritos nos tópicos seguintes.

3.17.11.1 Amplificação, clonagem, sequenciamento e predição de sítios de ligação de fatores de transcrição

Baseando-se na sequência de nucleotídeos do Supercontig 1.500 (obtido no VectorBase), uma região de 2.5 kb a montante do sítio de inicial ATG predito do gene AAEL010714 foi identificada. Um par de oligonucleotídeos iniciadores foi desenhado inicialmente usando o programa Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e sítios de restrição para *Bam*HI foram inseridos na sequência (Tabela 4) O DNA genômico de *Aedes aegypti* foi usado como molde para amplificar um fragmento de 2.5 kb, seguindo protocolo descrito na seção 3.6. O programa do termociclador foi configurado para: um passo inicial de 2 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 2 minutos a 72 °C e um passo final de 10 minutos a 72 °C para extensão.

O produto amplificado foi ligado em DNA de plasmídeo pCR[®] 2.1 TA cloning (Invitrogen) e transformado usando procedimentos padrão. O clone obtido foi sequenciado usando oligonucleotídeos iniciadores específicos e também os universais M13 (Tabela 4). A montagem da sequência de nucleotídeos, obtenção da sequência consenso e análises por alinhamento foram realizadas como descrito anteriormente.

Uma sequência consenso foi submetida à análise de predição de sítios de ligação de fatores de transcrição usando o banco de dados JASPAR (BRYNE et al.,

2008; SANDELIN et al., 2004). Modelos de matriz de *Drosophila melanogaster* foram usados para busca dos possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição com um limite de corte de 95% de pontuação. Buscas manuais foram realizadas para tentativa de identificação de outros sítios.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados nos experimentos de amplificação, clonagem, sequenciamento da região a montante do gene AAEL010714, e na construção dos vetores para análise funcional do promotor de 1kb.

Iniciadores utilizados	Sequência dos iniciadores Orientação 5' → 3'	Iniciadores usados nos experimentos de:		Tamanho dos fragmentos gerados na PCR
		PCR	Sequenciamento	
Promotor 2.5 kb- <i>Bam</i> HI	ggatccTGTATTAGCTAACATAGT-F ggatccGATGAAGGGTGGCTGGTA-R	x	x	2522 pb
Promotor 1kb- <i>Fse</i> I	ggccggccccgcggAATATAAGAATTAGAGCAGGATTTTCA-F ggccggccGATGAAGGGTGGCTGGTAGCAA-R	x	x	1022 pb
Promotor 1kb- <i>Bam</i> HI	ggatccAATATAAGAATTAGAGCA-F ggatccGATGAAGGGTGGCTGGTA-R	x	x	1012pb
Sequenciamento dos promotores (iniciadores internos)				
2.5kb	TTTGCGGTCACGCCACT-F		x	
2.5kb	TATGATTCTTGTTCCGGA-F		x	
2.5kb	GCGTTCGCTCGGTTTCGCT-F		x	
2.5kb e 1kb	TCGTATTCAAATGAATAA-F		x	
2.5kb e 1kb	GGAGAAGTGAACCTCTAC-F		x	
Promotor 1kb-DsRED-SV40- <i>Fse</i> I	ggccggccAATATAAGAATTAGAGCA-F ggccggccTAAGATACATTGATGAGT-R	x	x	1992 pb
DsRED-SV40- <i>Asc</i> I	ggcgcgccATGAAGCTTGCCCTCCGAGA-F agtactggcgcgccTAAGATACATTGATGAGTTTGGACA-R	x	x	942 pb
<i>pMos</i> sítios- F	CAAATCATCAATGTATCT-F		x	
<i>pMos</i> sítios-R	ACGTGTGAACGGTGGTTTCA-R		x	
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG-F		x	
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC-R		x	
pjet1.2 Forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-F		x	
pjet1.2 Reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-R		x	

Iniciadores universais M13 e pjet1.2 *sequencing primer* foram usados no sequenciamento dos vetores comerciais pCR2.1 e pjet, respectivamente.

F:Iniciador *forward*

R: Iniciador *reverse*

x:Indica iniciador usado no experimento

3.17.11.2 Construção de vetor de transformação para teste de promotor em linhagens transgênicas de *Aedes aegypti*

Todas as reações de amplificação realizadas para construção dos vetores de transformação seguiram protocolo padrão descrito na seção 3.6. Os plasmídeos *pMos[3xP3-EGFP]* (HORN e WIMMER, 2000) (ANEXO F), *pKhsp82MOS* (COATES et al., 1997) (ANEXO G) e *pAn-Vg-DsRED* foram cedidos gentilmente pelo Dr. Anthony James, da Universidade da Califórnia, Irvine, Califórnia, EUA.

3.17.11.3 Amplificação, clonagem e subclonagem do gene marcador DsRED em vetor de transformação *pMos[3xP3-EGFP]*

A ORF codificante para DsRED com a sequência de terminação do vírus SV40 como 3'UTR foi obtida a partir de plasmídeo doador *pAnVg-DsRED*. A amplificação do fragmento DsRED (marcador) foi realizada com os iniciadores específicos indicados na Tabela 4, e os sítios para a enzima de restrição *Ascl* foram inseridos nas extremidades do fragmento amplificado. O sítio *Scal* (no iniciador reverse) foi inserido para facilitar a conferência da orientação do inserto clonado. Após amplificação, o fragmento purificado foi clonado no DNA do vetor pCR[®] 2.1, gerando o vetor pCR2.1-DsRED, o qual foi sequenciado com iniciadores específicos e universais (Tabela 4) para confirmação. Então, o DNA do plasmídeo pCR2.1-DsRED foi digerido com a enzima *Ascl* e o fragmento purificado foi subclonado no DNA do plasmídeo doador *pMos[3xP3-EGFP]* previamente linearizado com *Ascl* e desfosforilado, obtendo-se assim o vetor doador *pMos[3xP3-EGFP-DsRED]*. O clone obtido foi sequenciado com iniciadores específicos e também com os iniciadores *pMos* sítios (Tabela 4) para conferência da construção final, e o vetor *pMos[3xP3-EGFP-DsRED]* foi utilizado na etapa seguinte.

3.17.11.4 Amplificação, clonagem e subclonagem do promotor em vetor de transformação *pMos[3xP3-EGFP-DsRED]*

A região 1 kb a montante do gene AAEL010714 foi amplificada a partir de molde genômico. O programa do termociclador foi o mesmo descrito na seção 3.17.11. Os iniciadores específicos foram desenhados com base no Supercontig 1.500 (obtido no VectorBase) e foi adicionada sequência para o reconhecimento da enzima de restrição *FseI* (Tabela 4) e para *SacII* (apenas no iniciador forward) para conferência da orientação do inserto clonado. Após amplificação, o fragmento foi clonado no DNA do vetor pCR[®] 2.1, gerando o vetor pCR[®] 2.1 -promotor1kb(*FseI*). Este foi sequenciado com iniciadores específicos e universais (Tabela 4). O DNA do clone confirmado foi digerido com a enzima *FseI* e o fragmento foi subclonado no DNA do plasmídeo *pMos*[3xP3-EGFP-DsRED], previamente linearizado com *FseI* e desfosforilado, obtendo-se assim o vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]. O clone foi sequenciado com iniciadores específicos e também com os iniciadores *pMos* sítios (Tabela 4) para conferência da construção final e foi utilizado para microinjeção, junto com o plasmídeo auxiliador *pKhsp82MOS*.

3.17.11.5 Construção de vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP] com o gene promotor 1kb – DsRED em nova orientação

A região 1 kb a montante do gene AAEL010714 foi amplificada a partir de DNA genômico com programa do termociclador configurado como descrito na seção 3.17.11.1 e os iniciadores específicos contendo sítios de restrição para a enzima *BamHI* (Tabela 4) foram utilizados na amplificação. O fragmento amplificado foi clonado no DNA do vetor pCR[®] 2.1 e o plasmídeo pCR[®] 2.1 -promotor1kb(*BamHI*) foi gerado, sendo sequenciado com iniciadores específicos e universais (Tabela 4). O DNA do clone confirmado foi digerido com a enzima *BamHI* e o fragmento liberado foi purificado e subclonado em no DNA do plasmídeo pCR2.1-DsRED previamente linearizado com a enzima *BamHI* e desfosforilado, gerando o vetor pCR2.1-promotor1kb-DsRED, o qual foi sequenciado com iniciadores específicos e universais (Tabela 4). Então o gene promotor1kb-DsRED foi amplificado com os iniciadores contendo sítios *FseI* (Tabela 4) e o fragmento foi clonado em no DNA do vetor *pjet1.2* (Fermentas). O DNA do plasmídeo *pjet1.2*-promotor1kb-DsRED foi sequenciado com iniciadores específicos e

universais (Tabela 4) e após ser confirmado, foi digerido com a enzima *FseI*. O fragmento liberado foi purificado e em seguida subclonado no DNA do vetor *pMos[3xP3-EGFP]* previamente linearizado com *FseI* e desfosforilado. O DNA do clone foi sequenciado para conferência da orientação com os iniciadores específicos e também com os iniciadores *pMos* sítios (Tabela 4). O vetor doador *pMos[3xP3-EGFP-promotor1kb-DsRED]* em orientação cabeça-cauda em relação aos dois genes foi obtido.

3.17.12 Técnica de microinjeção de ovos embrionados de *Aedes aegypti*

Para obtenção de ovos embrionados, fêmeas e machos adultos do mosquito com 1 dia após emergência foram colocados em mesma gaiola (em proporção de 3 fêmeas: 1 macho) para executarem a cópula, sendo mantidos por 3 dias com algodão umedecido em solução de sacarose 10% (p/v). Após este período, as fêmeas copuladas tiveram acesso ao repasto sanguíneo em camundongo e a solução açucarada foi substituída por algodão embebido em sacarose 3 M (para evitar oviposições indesejadas no algodão).

Os ovos foram obtidos entre 4 a 8 dias após o repasto sanguíneo para realização das microinjeções. Para tanto, 10 a 12 fêmeas foram coletadas da colônia e transferidas para um tubo de plástico cilíndrico vedado com um pedaço de algodão. O tubo era previamente preparado, contendo no fundo um algodão encharcado em água coberto por um papel filtro umedecido. O tubo com as fêmeas foi colocado em ambiente escuro para estimular a oviposição por 90 minutos aproximadamente. Passado este período, as fêmeas foram descartadas em uma segunda gaiola vazia e foi realizada a coleta do papel filtro com os ovos fertilizados recém depositados.

Durante o processo de alinhamento realizado com um pincel, o papel filtro com os ovos foi umedecido constantemente com água destilada e sob lupa estereoscópica, os ovos foram alinhados paralelamente com a região posterior voltada para o mesmo lado, visando à injeção no pólo posterior do embrião.

Uma vez alinhados, os ovos embrionados foram dessecados brevemente (30 segundos a 1 minuto), pressionando-se contra o papel filtro uma tira de papel

absorvente próximo a linha dos ovos. Em seguida, uma lamínula de plástico anteriormente preparada com uma tira de fita dupla-face (Scotch 3M) colada em uma de suas bordas foi pressionada suavemente sobre os ovos alinhados. Para interrupção da dessecação, os ovos aderidos à lamínula foram cobertos com óleo halocarbônico 27 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) e a lamínula foi transferida para o microscópio cirúrgico Leica modelo S6E (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça) para realização da microinjeção.

O procedimento de microinjeção foi executado no equipamento FemtoJet[®] (Eppendorf) associado a um micromanipulador automático TransferMan NK2[®] (Eppendorf). Um aparelho estirador de capilar da Sutter modelo P97 (Sutter Instrument Co, Novato, California, USA) foi utilizado para produção de agulhas através de estiramento de capilares de vidro borossilicato. (World Precision Instrument, Sarasota, Flórida, USA), com os seguintes parâmetros programados em duas etapas: 1º ciclo - aquecimento: 391 / arranque:10 / velocidade: 10 / tempo:190; 2º ciclo -, aquecimento:391 / arranque:80 / velocidade:30 / tempo:130.

Para abertura dos capilares estirados e produção de uma ponta angulada, conferindo uma melhor qualidade à injeção, as agulhas tiveram a ponta lixada por 1 minuto no aparelho KT Brown Type micro-pipette beveler modelo BV-10 (Sutter).

O DNA dos plasmídeos microinjetados foi purificado com o kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) e os ovos embrionados foram microinjetados como uma solução de injeção composta de tampão de injeção 1X (cloreto de potássio 0,5 mM, fosfato de sódio 0,01 mM) contendo uma mistura de dois plasmídeos (sistema bipartido), sendo um doador (contendo a sequência do possível promotor dirigindo o gene marcador) e o outro auxiliador (que possui a sequência codificadora da transposase) nas concentrações de 0,5 µg/µL e 0,3 µg/µL respectivamente. Após preparação da solução de injeção, a mesma foi colocada em filtro Millex[®] GV (Millipore, Billerica, MA, USA) e foi centrifugada por 5 minutos a 7.000 x g. Em seguida, a solução de injeção foi transferida para a agulha pronta com auxílio de uma microponteira (Eppendorf)

Finalizado o procedimento de microinjeção, os ovos embrionados foram descolados da lamínula com uso de um pincel e foram colocados na lateral de um béquer internamente revestido por papel filtro umedecido apoiado sobre um algodão

encharcado de água. Os ovos foram levados ao insetário (temperatura e umidade controladas) onde permaneceram em repouso por 5 dias. Após este intervalo, os ovos foram transferidos para recipientes plásticos com água, para estimular a eclosão das larvas. Cada pupa obtida foi coletada e mantida individualmente em copos plásticos de 500 mL até a emergência dos alados. O sexo dos adultos emergidos foi conferido e os cruzamentos entre mosquitos oriundos de embriões microinjetados e adultos selvagens foi elaborado. Para isso, cada macho virgem injetado (MI) foi colocado em copo com 10 fêmeas virgens selvagens (FS) e 10 fêmeas virgens microinjetadas (FI) foram alocadas em copos com 10 machos virgens selvagens (MS). Três dias após a montagem dos cruzamentos, as fêmeas realizaram repasto sanguíneo em camundongos anestesiados e foram mantidas com solução de sacarose 3M. Um pequeno recipiente de plástico contendo água e revestido internamente com papel filtro foi disponibilizado 3 dias após o repasto, para a realização da oviposição. As posturas foram retiradas 2 dias após a disponibilização dos copos plásticos, os ovos foram mergulhados em água e as larvas foram eclodidas. As larvas L4 foram submetidas à varredura individual sob lupa estereoscópica fluorescente com filtro GFP, para tentativa de detecção do sinal de fluorescência gerado pela proteína marcadora GFP, expressa nos olhos das larvas que tiveram a inserção do cassete transgênico no genoma.

3.17.13 Experimento de silenciamento gênico por método de RNA de interferência (RNAi)

3.17.13.1 Síntese dos RNAs dupla-fita

O RNA dupla-fita (dsRNA) foi sintetizado com o MEGAscript[®] RNAi Kit da Ambion (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e os procedimentos de síntese, digestão com nuclease (para remoção de DNA e RNA simples fita) e purificação foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, a transcrição do dsRNA dupla-fita foi realizada através de 2 moldes de DNA de plasmídeos (pCR[®] 2.1) contendo o mesmo fragmento de cDNA a ser transcrito, porém clonado em orientação

oposta em relação ao promotor T7 de cada vetor, como mostrado no esquema da Figura 10. O fragmento de cDNA parcial do gene AAEL010714 serviu como molde para a síntese de dsRNA injetado no grupo experimental, e o cDNA do gene exógeno DsRED serviu como molde para a produção de dsRNA injetado no grupo controle.

O DNA de plasmídeos foi linearizado com a enzima de restrição *Bam*HI e 1 µg de cada molde foi utilizado em mesmo microtubo para a reação de transcrição *in vitro*.

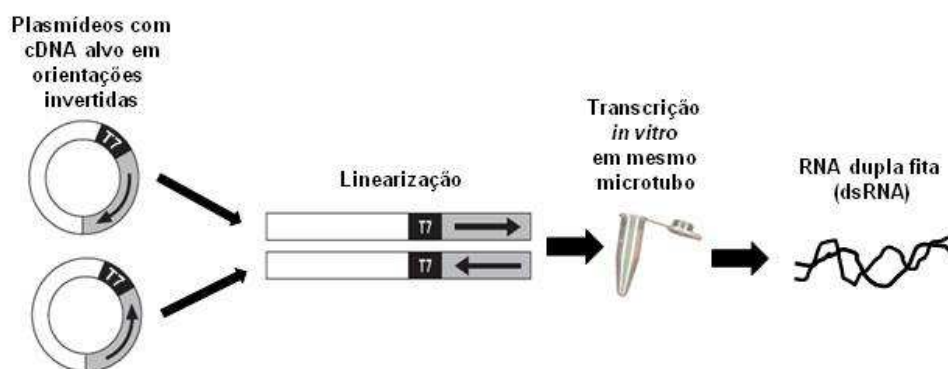


Figura 10 - Esquema de produção de RNA dupla-fita (dsRNA) com molde de cDNA clonado em vetor. O cDNA alvo clonado em orientações opostas no vetor pCR[®] 2.1 serviu como molde na síntese de fitas de RNA através de transcrição *in vitro*.

FONTE: Modificado do manual 1626M do MEGAscript[®] RNAi Kit, 2009.

As moléculas de dsRNA eluídas foram concentradas em centrífuga a vácuo Speed Vac (Savant instruments, Navi, Mumbai, Índia), ressuspendidas em água ultrapura e quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific). Após quantificação, a concentração foi ajustada com água ultrapura para uma solução de concentração 4 µg/µL, e o dsRNA foi em seguida utilizado nas injeções das fêmeas.

3.17.13.2 Injeção de RNA dupla fita (dsRNA) nos mosquitos

Para tentativa de silenciamento do gene AAEL010714 em ovários de *Aedes aegypti*, a técnica de RNA de interferência foi empregada. Em experimento único realizado, fêmeas com 5 dias após emergência e previamente copuladas, foram rapidamente anestesiadas com CO₂ e em seguida colocadas em placa de petri de vidro sobre gelo. As injeções intratorácicas foram realizadas sob lupa estereoscópica, sendo que um volume de 0,5 µL de uma solução de RNA dupla-fita em concentração de 4 µg/µL foi injetado através de uma micro-agulha de vidro (geradas por estiramento de capilares de 50 µL). Os mosquitos injetados (50 fêmeas por grupo) foram colocados em copos plásticos de 500 mL. Após 24 horas de recuperação, camundongos anestesiados foram disponibilizados para cada grupo por 20 minutos, e apenas as fêmeas completamente ingurgitadas foram utilizadas para o experimento, sendo mantidas com solução de sacarose 3 M. Para a quantificação dos níveis de transcrição do gene AAEL010714 entre o grupo controle por injúria (injetados com H₂O ultrapura), o grupo controle com RNA dupla fita sem um gene alvo (injetado com dsRNA DsRED) e o grupo experimental (injetados com dsRNA de AAEL010714), 5 fêmeas de cada grupo tiveram seus pares de ovários dissecados 48 horas após o repasto e o RNA total dos tecidos foi extraído. O cDNA foi sintetizado e serviu como molde para a análise por RT-PCR em tempo real, utilizando o par de iniciadores descritos na tabela 1.

3.17.13.3 Análises de parâmetros de fecundidade e fertilidade

Após injeção, repasto sanguíneo e coleta das amostras para análises dos níveis de transcrição, as fêmeas 72 horas após o repasto que restaram de cada grupo foram colocadas individualmente em frascos cilíndricos de vidro preparados com algodão encharcado de água recoberto com papel filtro umedecido no fundo. As fêmeas foram mantidas por 3 dias nos frascos, sendo retiradas após este período para coleta e contagem dos ovos. Após contagem, os ovos de cada fêmea foram colocados em recipientes de plástico individuais contendo o mesmo volume de água e quantidade de

comida. O número de larvas eclodidas por fêmea de cada grupo foi obtido 5 dias após a eclosão.

3.18 Análise estatística dos experimentos

A análise estatística de todos os experimentos foi feita com o programa GraphPad InStat® versão 3.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Para análise dos experimentos de quantificação dos transcritos ao longo do desenvolvimento do mosquito foi utilizado o teste *one-way* ANOVA. O mesmo teste foi utilizado nos experimentos de comparação de número de ovos por fêmea, número de larvas por fêmea e taxa de fertilidade. Já para os experimentos de infecção por *Plasmodium gallinaceum* e influência de cópula nos níveis de transcrição do gene AAEL010714, o teste Mann-Whitney foi aplicado.

Para todas as análises, independente do teste, foi aplicado um intervalo de confiança (IC) de 95% e valores de probabilidade menores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0,05$) nas comparações indicaram diferença significativa.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação de candidatos gênicos de *Aedes aegypti* com expressão tardia

4.1.1 Análises *in silico* iniciais

Embora muitas estratégias pudessem ser utilizadas para identificar candidatos gênicos tardios de *Aedes aegypti*, uma análise *in silico* de busca e comparação de sequências interespecíficas foi aplicada como ponto de partida deste projeto. Isto porque publicações mostraram que alguns genes ortólogos entre *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, os quais são ativados após o repasto sanguíneo, apresentam conservação no padrão de regulação de transcrição gênica (MOREIRA et al., 2000; MOREIRA et al., 2002), sugerindo que outros genes possam manter a regulação de expressão conservada entre as duas espécies.

Sob essa premissa, um banco de dados de perfis de expressão gênica de *Anopheles gambiae* (angaGEDUCI; <http://www.angaged.bio.uci.edu> – DISSANAYAKE et al., 2006) foi utilizado inicialmente para execução de uma análise *in silico* seletiva (Figura 9, Material e Métodos, item 3.2.1). É importante ressaltar que quando este projeto foi iniciado o único banco de expressão existente para mosquitos Culicídeos era o angaGEDUCI de *Anopheles gambiae*, embora um banco de dados de expressão gênica de *Aedes aegypti* (aeGEPUCI) tenha sido recentemente criado e disponibilizado para consultas públicas (DISSANAYAKE et al., 2010)

Através do uso do filtro do banco angaGEDUCI, a busca forneceu 33 transcritos de *Anopheles gambiae* que apresentam um acúmulo de transcrição 48 horas após a alimentação sanguínea (Figura 11). Os 33 gráficos de perfis de transcrição foram analisados visualmente e os transcritos que mostraram acúmulo de transcrição nos outros estágios de vida (em larvas, machos, fêmeas não alimentadas, fêmeas alimentadas após 3, 24, 72, 96 horas e 15 dias) foram descartados. Sendo assim, esta análise possibilitou a identificação de 22 transcritos com expressão específica 48 horas após a alimentação sanguínea de fêmeas de *Anopheles gambiae* (Figura 11- perfis com código em vermelho) e as sequências destes 22 transcritos de *Anopheles gambiae* foram submetidas à análise de similaridade contra o banco de dados de *Aedes aegypti*

da TIGR *gene indices* versão 4.0 de 2004 (Tabela 5). A análise foi realizada no primeiro semestre de 2006.

Tabela 5 - Genes com expressão restrita 48 horas após o repasto de *Anopheles gambiae* e resultado da busca por sequências similares contra o banco de *Aedes aegypti* da TIGR *gene indices*.

<i>Anopheles gambiae</i> Código dos 22 genes selecionados no banco angaGEDUCI	Análise por blastn no banco da TIGR <i>gene indices</i> de <i>Aedes aegypti</i> Versão 4.0 - 2004	<i>Aedes aegypti</i> ESTs selecionados para estudo	<i>Aedes aegypti</i> Fragmentos amplificados em molde genômico
ENSANGG00000022738	TC37037	Descartado	Não foi analisado
ENSANGG00000009109	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000009086	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000007570	TC47124	Selecionado	Amplificado
ENSANGG00000009087	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000023532	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000010916	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000011084	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000008713	TC36931	Selecionado	Amplificado
ENSANGG00000010904	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000024492	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000020666	NACN796TO	Selecionado	Amplificado
ENSANGG00000025111	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000021710	TC44745	Selecionado	Não foi amplificado
ENSANGG00000008195	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000024843	Não houve sequência similar		
ENSANGG00000016583	TC48021	Selecionado	Amplificado
ENSANGG00000020435	TC49042	Selecionado	Amplificado
ENSANGG00000024973			
ENSANGG00000021043	NABZ660TF	Selecionado	Não foi amplificado
ENSANGG00000020452	TC38081	Selecionado	Amplificado
ENSANGG00000008480	Não houve sequência similar		

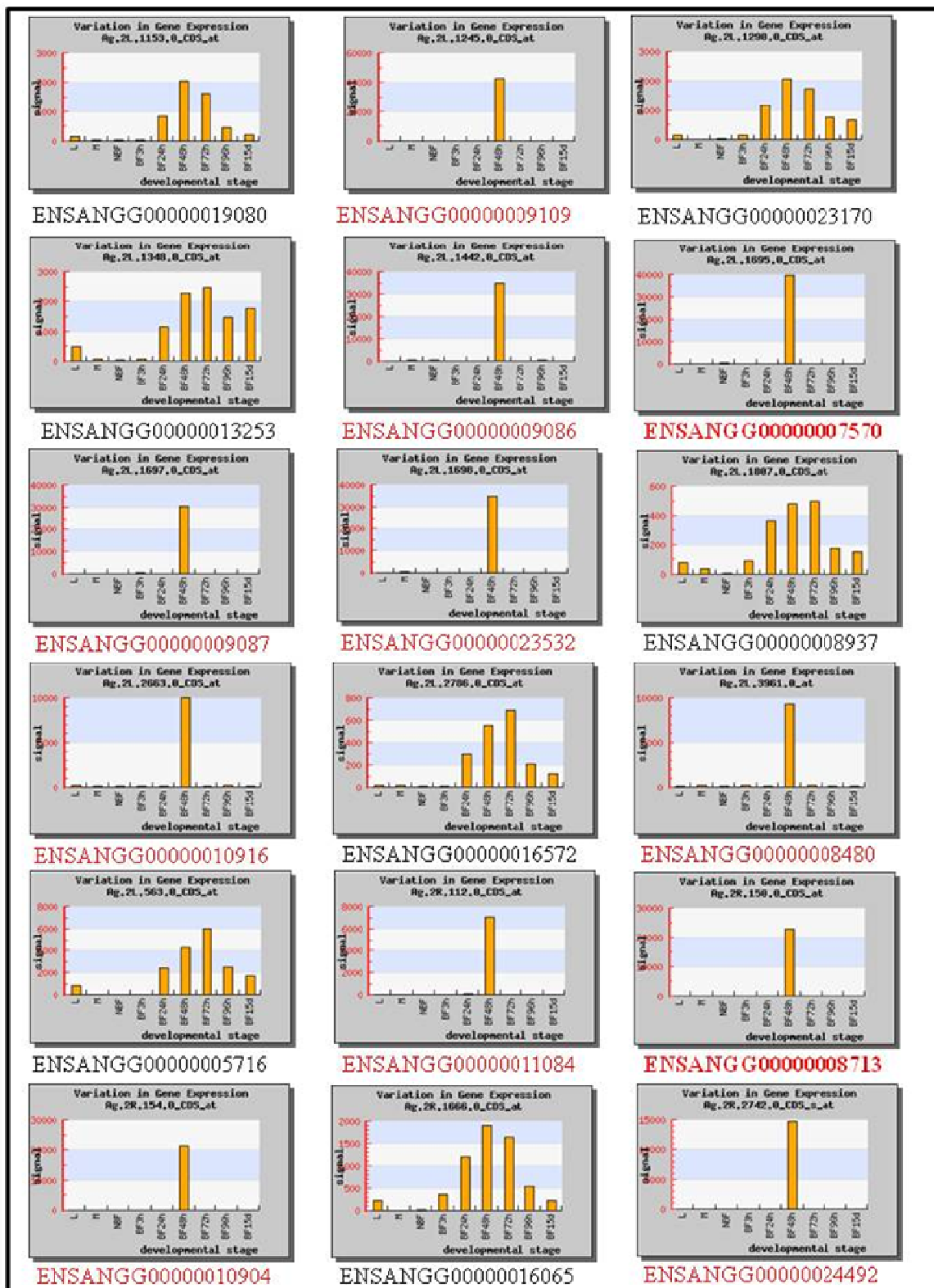


Figura 11 (cont.) - Representação gráfica dos perfis de expressão de 33 genes de *Anopheles gambiae* identificados no banco angaGEDUCI.

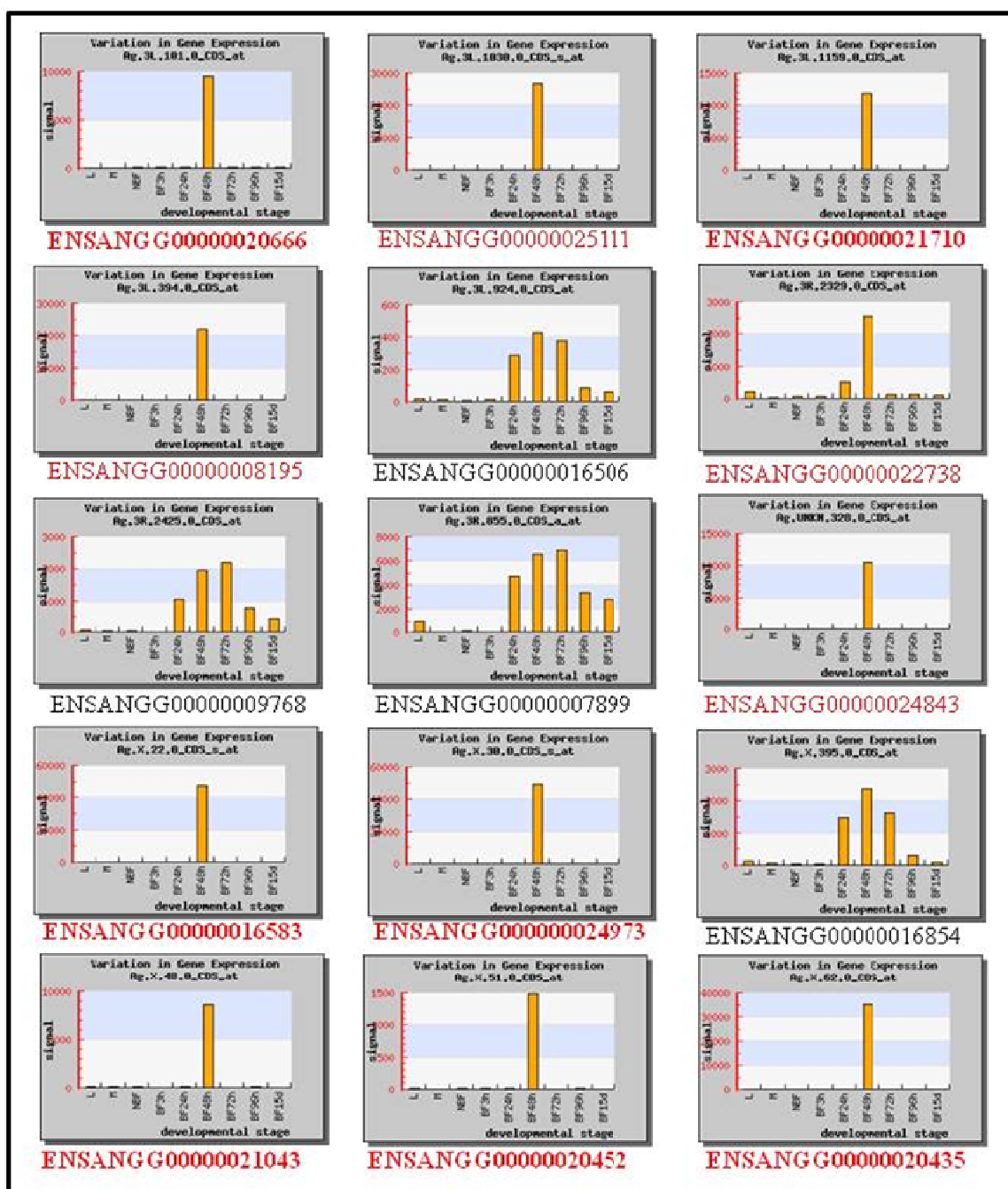


Figura 11 - Representação gráfica dos perfis de expressão de 33 genes de *Anopheles gambiae* identificados no banco angAGEDUCI. Os gráficos mostram altos níveis de expressão e acúmulo 48 horas após o repasto. Os perfis com códigos em vermelho (22) são genes que mostram acúmulo de transcrição restrito 48 horas após o repasto. Os códigos vermelhos em negrito indicam os 9 genes que apresentaram similaridade com *ESTs* de *Aedes aegypti* depositados no banco da TIGR *gene indices*.

Através desta análise, foram identificadas 9 etiquetas de sequências expressas (*ESTs*) de *Aedes aegypti* com similaridade às sequências selecionadas de *Anopheles gambiae* (Tabela 5), porém 3 *ESTs* foram excluídos das análises futuras de caracterização. O *EST* TC37037 foi descartado por corresponder a um gene anteriormente caracterizado (LIN et al., 1993) e os *ESTs* TC44745 e NABZ660TF foram eliminados por não renderem sinais de amplificação nas análises gênicas pela PCR.

Os 6 candidatos selecionados de *Aedes aegypti*, os quais apresentaram valores de identidade com as sequências de *Anopheles gambiae* variando de 31 a 73%, não possuíam uma anotação predita no banco da TIGR *gene indices* (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultado da análise por blastn dos transcritos selecionados de *Anopheles gambiae* do banco angaGEDUCI contra os *ESTs* de *Aedes aegypti* depositados no banco da TIGR *gene indices*.

<i>Anopheles gambiae</i> Código dos genes no banco angaGEDUCI	Análise por blastn contra o banco da TIGR de <i>Aedes aegypti</i>			<i>Aedes aegypti</i> Código dos <i>ESTs</i> no banco da TIGR (Melhor Match)	<i>Aedes aegypti</i> Tentativa de anotação funcional no banco da TIGR
	Identidade	e-value	Score		
ENSANGG00000020452	56%	4,20E-07	325	TC38081	-
ENSANGG00000020435	58%	1,10E-11	407	TC49042	-
ENSANGG00000020666	56%	1,50E-04	269	NACN796TO	-
ENSANGG00000016583	56%	3,30E-05	285	TC48021	-
ENSANGG00000008713	73%	9,90E-04	244	TC36931	-
ENSANGG00000007570	31%	2,30E-06	303	TC47124	-

4.1.2 Atualização das anotações no banco VectorBase

Com a finalização do sequenciamento do genoma de *Aedes aegypti* (NENE et al., 2007), implementação e integração do banco de dados de vetores invertebrados de patógenos humanos - VectorBase (<http://www.VectorBase.org>) com os bancos de sequências anteriormente existentes - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e TIGR *gene indices* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi>), uma quantidade enorme de novas anotações *in silico* de genes, *ESTs*, *contigs* e *supercontigs* de sequências de *Aedes aegypti* foram geradas e depositadas. Assim, as sequências de *ESTs* dos 6 transcritos tardios candidatos foram utilizadas para análises atualizadas de blastn no banco de dados VectorBase, (Tabela 7). Foram identificados 6 transcritos com alta identidade

(95-99%) às 6 *ESTs*, e os códigos dos respectivos genes assim como anotações preditas foram obtidos. Os 6 genes estão anotados como proteínas conservadas hipotéticas, sendo que 5 deles possuem domínio conservado de proteínas ligadoras de odor (OBP) (Tabela 7). Os códigos dos genes no banco VectorBase foram adotados para substituírem os códigos da TIGR *gene indices*. Desta forma, a anotação foi atualizada e os genes foram denominados neste trabalho em conformidade com os códigos fornecidos pelo VectorBase.

Tabela 7 - Sumário das análises de atualização no banco VectorBase dos candidatos de *ESTs* de *Aedes aegypti* selecionados no banco da TIGR *gene indices*

<i>Aedes aegypti</i> Código dos <i>ESTs</i> selecionados no banco da TIGR Versão 4.0- 2004	Análise por blastn contra o banco Vectorbase de <i>Aedes aegypti</i> Identidade	e-value	Score	<i>Aedes aegypti</i> Código dos genes no banco Vectorbase (Melhor Match)	Descrição no banco Vectorbase	Presença de Domínio Conservado
TC38081 (TC65321 na versão 5.0)	97.4%	0.0	657	AAEL010714-RA AaegOBP45	proteína conservada hipotética	Proteína ligadora de odor
TC49042 (TC53087 na versão 5.0)	99.8%	0.0	1040	AAEL000377-RA	proteína conservada hipotética	Proteína ligadora de odor
NACN796TO (DV380825 na versão 5.0)	95.7%	0.0	705	AAEL000846-RA	proteína conservada hipotética	Proteína ligadora de odor
TC48021 (TC53247 na versão 5.0)	98.1%	0.0	845	AAEL003525-RA	proteína conservada hipotética	Semelhante à Exostosina (Exostosin-like) Proteína ligadora de odor
TC36931 (TC53046 na versão 5.0)	99.8%	0.0	968	AAEL009599-RA AaegOBP41	proteína conservada hipotética	Proteína ligadora de odor
TC47124 (TC56586 na versão 5.0)	99.3%	0.0	756	AAEL011238-RA	proteína conservada hipotética	Região rica em cisteína Insulina/IGF/relaxina EGF Região semelhante à EGF

A anotação predita no banco VectorBase indica que os 6 genes candidatos selecionados estão localizados em *supercontigs* diferentes (AAEL010714-supercontig 1.500, AAEL000377-supercontig 1.6, AAEL000846-supercontig 1.17, AAEL003525-supercontig 1.89, AAEL009599-supercontig 1.411 e AAEL011238-supercontig 1.559). Somente um exon é predito para os genes AAEL000377 e AAEL009599 e o tamanho predito dos transcritos e dos produtos traduzidos são 1075 pb e 315 resíduos, e 976 pb e 297 resíduos, respectivamente. Para os genes AAEL010714 e AAEL000846, dois exons estão preditos com 783 pb e 260 resíduos, e 849 pb e 246 para os tamanhos dos produtos de transcrição e tradução, respectivamente. Predições diferentes são descritas no banco VectorBase para os genes AAEL003525 e AAEL011238 – ambos com 3 exons e tamanhos de 1152 pb e 370 resíduos, e 776 pb e 249 resíduos, respectivamente.

Dois dos candidatos gênicos, AAEL009599 e AAEL010714, foram anotados por análise de bioinformática como genes codificadores de proteínas ligadoras de odor (OBP) atípicas e as possíveis proteínas codificadas receberam a nomenclatura de AaegOBP41 e AaegOBP45 respectivamente (ZHOU et al., 2008). Além disso, as anotações do VectorBase para os genes AAEL000377, AAEL000846 e AAEL003525 indicam que eles também codificam proteínas que possuem domínios conservados característicos de OBPs, embora estes genes não tenham sido identificados como OBPs de *Aedes aegypti* em Zhou et al. (2008). Além de um domínio de OBP, o gene AAEL003525 também possui um domínio semelhante à exostosina (*exostosin-like domain*). Proteínas que possuem este domínio em humanos e camundongos geralmente estão envolvidas em funções de crescimento ósseo, mas a presença de genes com domínios homólogos em invertebrados indica que outras funções devem existir para proteínas com este domínio. Já o gene AAEL011238 codifica uma proteína predita com região rica em cisteína com domínios de insulina/IGF/relaxina e *EGF-like*.

4.1.3 Amplificação genômica de fragmentos dos genes candidatos

Após finalização da seleção *in silico* dos candidatos tardios de *Aedes aegypti*, foram realizados experimentos para tentativa de confirmação da presença destes genes no genoma do mosquito, uma vez que as *ESTs* identificadas no banco poderiam ser artefatos de anotação. Para isso, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando DNA genômico de *Aedes aegypti* como molde. Como resultado, dos 8 pares de iniciadores específicos testados (Tabela 1), 6 renderam fragmentos amplificados com especificidade (Figura 12, Tabela 7).

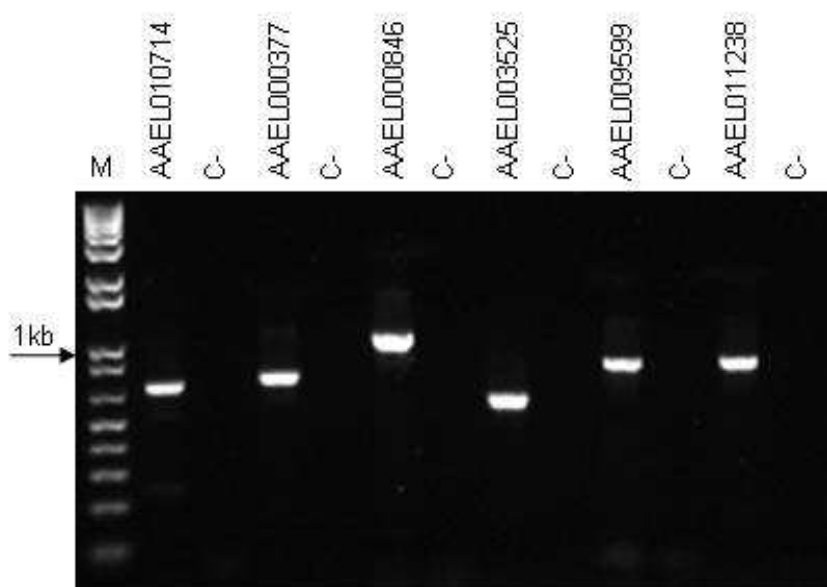


Figura 12 - Amplificação genômica de fragmentos dos 6 genes candidatos de *Aedes aegypti*. Iniciadores foram desenhados usando as sequências de *ESTs* obtidas no banco da *TIGR gene indices*. A amplificação foi padronizada inicialmente usando DNA genômico de *Aedes aegypti* como molde. Os fragmentos amplificados dos genes AAEL000846 e AAEL011238 foram maiores que o esperado, sugerindo regiões intrônicas nos fragmentos amplificados. C-: controle negativo (reações sem DNA genômico de *Aedes aegypti*). Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

Os produtos amplificados também evidenciaram que apenas dois fragmentos possuem tamanhos observados maiores que os tamanhos esperados. Para o gene AAEL000846, o esperado seria um fragmento de 912 pb, e o tamanho observado foi maior que 1000 pb. O mesmo foi observado para o gene AAEL011238, no qual o fragmento esperado era de 708 pb e o observado foi maior que 800 pb. Esses resultados confirmaram a presença de introns nos fragmentos genômicos amplificados dos genes AAEL000846 e AAEL011238, já que os iniciadores foram desenhados utilizando sequências de *ESTs* como molde.

Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados e confirmados por análises de similaridade (blastn) com as sequências dos *ESTs* obtidas inicialmente no banco da TIGR *gene indices*.

4.2 Caracterização dos perfis transcricionais dos genes selecionados

As análises de acúmulo de transcritos pela técnica de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR semi-quantitativo) foram realizadas para investigar sexo, estágio e tecido-especificidade dos 6 genes candidatos selecionados sob a hipótese inicial que os genes de *Aedes aegypti* a serem testados deveriam ter um perfil de expressão semelhante aos transcritos com similaridade em *Anopheles gambiae* (acúmulo de transcrição elevado e restrito 48 horas após o repasto sanguíneo das fêmeas).

4.2.1 Obtenção dos perfis temporais

A análise temporal realizada em duplicatas biológicas e triplicatas experimentais mostrou que os 6 genes analisados possuem acúmulo de transcrição tardio no ciclo gonotrófico, 48 a 72 horas após o repasto (Figura 13). Porém, 3 genes também apresentaram transcrição em estágios imaturos de larvas, pupas fêmeas e machos, com transcrição recorrente durante os estágios de desenvolvimento e então foram descartados das análises adicionais (AAEL011238, AAEL009599, AAEL003525).

Três candidatos gênicos, AAEL010714, AAEL000377 e AAEL000846, são transcritos exclusivamente em fêmeas e o acúmulo de transcritos dos genes AAEL010714 e AAEL000846 não é evidente até 24 horas após o repasto. O gene AAEL010714 possui forte acúmulo de transcritos 48 horas após o repasto, sendo um perfil similar ao ortólogo putativo de *Anopheles gambiae*. Já o gene AAEL000377 apresenta um perfil similar ao gene AAEL010714, com elevada transcrição 48 horas após a alimentação sanguínea de fêmeas adulta, mas mostra baixo acúmulo de transcrição em pupas fêmeas apenas (único estágio imaturo detectado). Entretanto, o gene AAEL000846 apresenta um forte acúmulo (pico 72 horas) mais tardio durante o ciclo gonotrófico.



Figura 13 - Perfil temporal de transcrição pela técnica de RT-PCR dos genes selecionados de *Aedes aegypti*. Os 6 genes foram analisados em intervalos ao longo dos estágios de desenvolvimento do mosquito e em períodos após o repasto sanguíneo. O RNA total foi extraído de larvas de 4^o estágio (L4), pupas brancas (PB), pupas macho (PM), pupas fêmeas (PF), machos recém emergidos (MR), fêmeas recém emergidas (FR), fêmeas alimentadas com sacarose 10% (S), e fêmeas 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo em camundongos. Os níveis de RNAm do gene Actina 1 foram usados como controle endógeno. Os produtos de RT-PCR foram aplicados em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo.

Assim, os genes AAEL010714 e AAEL000377 apresentam acúmulo de transcritos com perfil consistente com os parâmetros iniciais de buscas (transcritos mostrando altos níveis de acúmulo 48 horas após o repasto) e, portanto, foram selecionados para as análises seguintes. Embora o gene AAEL000846 tenha mostrado acúmulo 48 horas após o repasto, com pico de transcrição em 72 horas, ele também foi selecionado para as próximas análises devido sua transcrição tardia e com restrição sexual (fêmea-específica).

4.2.2 Obtenção dos perfis teciduais

Os 3 genes tardios AAEL010714, AAEL000377 e AAEL000846, que apresentaram acúmulo de transcrição restrita em fêmeas foram selecionados para análises comparativas de níveis de transcrição tecidual, novamente através da técnica de RT-PCR semiquantitativa.

Para esta análise, pares de ovários, corpo gorduroso e intestino médio foram dissecados de fêmeas 48 horas após o repasto sanguíneo, o RNA total dos tecidos foi extraído e os cDNAs sintetizados serviram de molde para as reações de PCR.

Os níveis de RNA mensageiro do gene Actina 1 foram usados inicialmente como controle endógeno, porém os resultados do acúmulo de transcritos deste gene em amostras de intestinos dissecados de fêmeas 48 horas após o repasto inviabilizaram seu uso nestes experimentos, uma vez que a intensidade da respectiva banda era muito baixa em comparação aos outros tecidos. Desta forma, o RNA ribossômico 18S foi padronizado e utilizado como um novo controle endógeno.

Os resultados obtidos em triplicatas biológicas indicam que não ocorre acúmulo de transcritos dos 3 genes no intestino médio 48 horas após o repasto, porém um baixo nível de transcrição é detectado no corpo gorduroso para os genes AAEL010714 e AAEL000377 (Figura 14). Interessantemente, os 3 genes selecionados apresentam um forte acúmulo de transcritos em ovários de fêmeas vitelogênicas de *Aedes aegypti* 48 horas após o repasto sanguíneo (Figura 14).



Figura 14 - Perfil espacial de transcrição pela técnica de RT-PCR dos genes tardios selecionados de *Aedes aegypti*. Os 3 genes tardios foram analisados a partir de tecidos dissecados de fêmeas 48 horas após o repasto sanguíneo em camundongos. Intestino médio (IM), Ovários (OV) e Corpo gorduroso (CG). As mesmas amostras de RNA foram também analisadas para o RNA ribossômico 18S como controle de integridade. Os produtos de RT-PCR foram aplicados em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo.

4.3 Análises quantitativas de acúmulo de transcritos em fêmeas vitelogênicas

Os resultados semiquantitativos em relação ao acúmulo de transcritos dos genes candidatos permitiram a seleção de 3 genes tardios (AAEL010714, AAEL000377 e AAEL000846) que mostram perfis de transcrição pontuais com ativação em ovários de *Aedes aegypti*. Porém, uma caracterização quantitativa do acúmulo de transcritos ao longo do processo de vitelogênese fornece uma informação precisa da dinâmica de ativação e força de transcrição destes genes nas fêmeas. Portanto, a técnica quantitativa de RT-PCR em tempo real foi empregada para avaliar os níveis de transcrição, utilizando método absoluto de quantificação.

4.3.1 Clonagem e obtenção de DNA de plasmídeos para elaboração de curvas-padrão

Para construção de curvas-padrão necessárias à quantificação absoluta do acúmulo de transcritos dos genes tardios, o DNA de plasmídeos contendo fragmentos dos transcritos de cada gene com tamanhos aproximados de 150 pb foram produzidos. Para tanto, moldes de cDNA sintetizados a partir de RNA total de fêmeas 48 horas após o repasto foram utilizados nas reações de PCR com 1 par de iniciadores específicos para cada um dos genes tardios, descritos na Tabela 1. Os fragmentos foram amplificados (Figura 15 A) e foram ligados aos braços do vetor de clonagem pCR[®] 2.1 (Invitrogen).

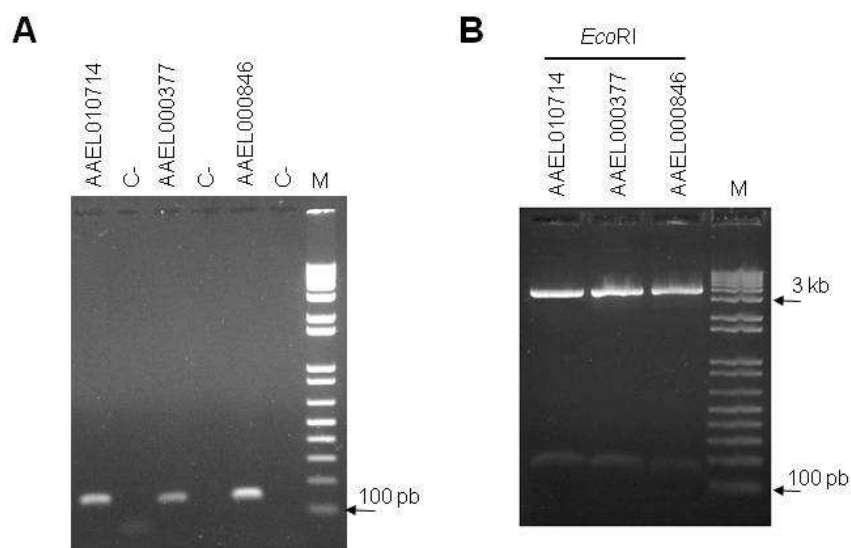


Figura 15 - Amplificações e clonagens dos fragmentos de aproximadamente 150 pb para geração das curvas-padrão gene específicas. **A.** Produtos de amplificação por RT-PCR, usando como molde cDNA de fêmeas vitelogênicas 48 horas após o repasto sanguíneo e iniciadores específicos para cada gene. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,2%) corado com brometo de etídeo. C-: controle negativo (reações sem cDNA molde). M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen). **B.** Plasmídeos contendo insertos de fragmentos dos genes tardios de aproximadamente 150 pb. O DNA de plasmídeos foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* para liberação dos insertos. Os produtos de amplificação e digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,2%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

O DNA foi inserido em bactérias DH10B e o DNA dos plasmídeos purificados foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* para visualização dos clones positivos. Na Figura 15 B podem ser evidenciadas 2 bandas, sendo as maiores (~3.9 kb) correspondentes ao vetor pCR[®] 2.1 sem inserto, e as menores correspondentes aos insertos liberados (~150 pb), respectivos aos fragmentos de cDNA de cada transcrito amplificado por RT-PCR. Os 3 clones obtidos foram sequenciados e confirmados por similaridade com as sequências depositadas nos bancos da TIGR *gene indices* e VectorBase. Então, o DNA dos plasmídeos foi linearizado por digestão com a enzima de restrição *XbaI* e foi utilizado nos experimentos de RT-PCR em tempo real.

Os valores das concentrações de cada DNA de plasmídeo linearizado contendo o inserto foram utilizados no cálculo do número de cópias através da fórmula descrita em Material e Métodos (item 3.8.1) e para cada gene estudado, uma curva-padrão de quantificação foi produzida através de diluições seriadas do DNA de plasmídeos, como no exemplo da Figura 16 A. As reações com iniciadores específicos, contendo plasmídeos linearizados nas diferentes diluições ou cDNA das amostras como molde, foram submetidas simultaneamente aos ciclos de amplificação para a análise quantitativa e o número de cópias do cDNA de cada amostra foi estimado a partir das curvas-padrão de cada gene (Figura 16 B), geradas pelo programa Mastercycler ep realplex 1.5 (Eppendorf).

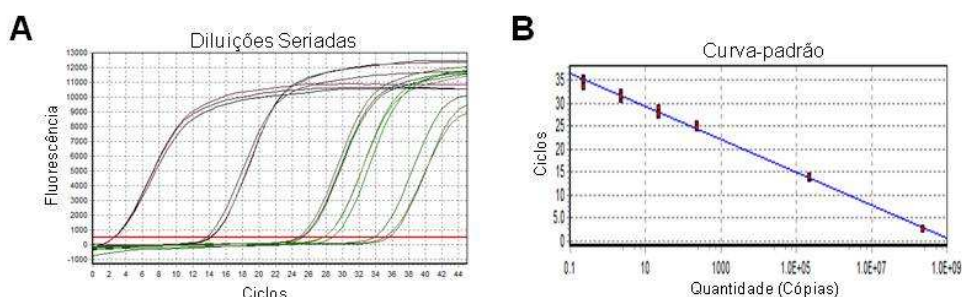


Figura 16 - Exemplo de quantificação do número de cópias para cada gene estudado através da técnica de RT-PCR em tempo real. **A.** O gráfico mostra medições em triplicata de 5 diluições seriadas contendo entre 2.2×10^8 e 2,2 cópias de plasmídeo que possui o fragmento do gene a ser quantificado. **B.** O gráfico apresenta curva-padrão construída a partir de medições em triplicata das diluições seriadas de DNA de plasmídeo, sendo produzida pelos valores automaticamente detectados de fluorescência em relação ao número de ciclos de amplificação.

4.3.2 Perfis quantitativos de transcrição dos genes tardios

Os experimentos para quantificação dos níveis de transcrição por RT-PCR em tempo real foram inicialmente realizados para os 3 genes tardios (AAEL010714, AAEL000377 e AAEL000846) sob estudo. Porém, um fragmento amplificado específico (*amplicon*) para as amostras de cDNA do gene AAEL000846 não foi obtido, evidenciado pelas curvas de dissociação (*melting curve*) geradas nos experimentos. Diferentemente de uma curva ideal apresentando pico único (Figura 17 A), as amostras deste gene sempre mostraram mais de um pico nos gráficos analisados (Figura 17 B), comprometendo as análises de transcrição e, portanto, uma quantificação precisa não foi elaborada para o gene AAEL000846. Os outros dois genes analisados apresentaram curvas de dissociação com pico único, indicando especificidade dos *amplicons* gerados.

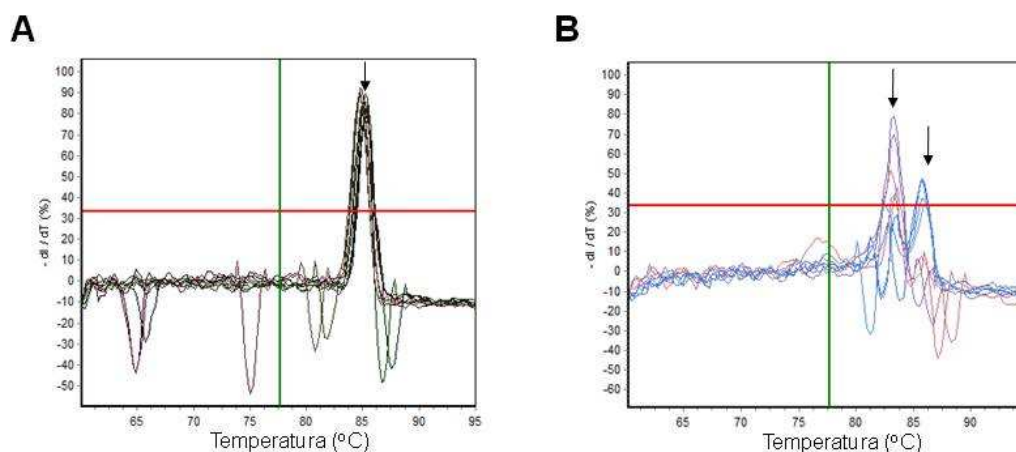


Figura 17 - Exemplos de curvas de dissociação obtidas nos experimentos de quantificação dos genes analisados em aparelho Mastercycler[®] ep Realplex (Eppendorf). **A.** O gráfico mostra curvas de dissociação de amostras de cDNA do gene AAEL010714 amplificadas nos experimentos de RT-PCR em tempo real. A seta indica o único pico formado, mostrando especificidade dos fragmentos amplificados. **B.** O gráfico mostra curvas de dissociação de amostras de cDNA do gene AAEL000846 amplificadas nos experimentos de RT-PCR em tempo real. As setas indicam picos formados, mostrando inespecificidade dos fragmentos amplificados para este gene.

O método de quantificação absoluta foi escolhido inicialmente para a análise dos genes AAEL010714 e AAEL000377. Com este método, foram obtidos os números de cópias dos transcritos alvo por μg de RNA. Mas, devido ao perfil pontual de aumento de acúmulo de transcrição dos dois genes estudados, a variação no número de cópias mostrou-se extremamente elevada entre os 3 lotes biológicos analisados, o que gerou desvios-padrão superiores às médias dos 3 lotes nos diversos pontos analisados para os dois transcritos. Buscando solucionar este problema caso específico, foram utilizados os números de cópias de acúmulo de transcritos do gene Actina 1 nos 5 pontos definidos para confirmação da integridade das amostras e normalização do número de cópias dos transcritos estudados, sendo uma estratégia abordada em outros trabalhos de fisiologia molecular de *Aedes aegypti* já publicados (CHEN et al., 2004; ZHU; CHEN; RAIKHEL, 2007).

O resultado das normalizações para os dois transcritos nas Figuras 18 A e 18 B forneceu um refinamento dos dados de quantificação. Desta forma a análise absoluta inicialmente proposta foi utilizada, porém os resultados dos gráficos foram plotados mediante a uma análise relativa do acúmulo de transcritos nos intervalos observados. Conseqüentemente, foram obtidas as quantificações precisas dos níveis de transcrição dos genes AAEL010714 e AAEL000377 ao longo de intervalos após o repasto sanguíneo, utilizando-se de moldes de cDNA sintetizados a partir de RNA total extraído de fêmeas 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após o repasto sanguíneo.

Os dados da Figura 18 A mostram que o gene AAEL000377 possui aproximadamente 20 vezes menos acúmulo de transcritos em relação aos transcritos do gene Actina-1 no ponto 48 horas após o repasto sanguíneo. Embora baixo em relação à Actina-1 neste intervalo, o acúmulo de transcritos do gene AAEL000377 é aproximadamente 50 vezes mais alto no ponto 48 horas após o repasto em relação aos outros pontos analisados. Nos outros 5 intervalos (36, 60, 72, 84 e 96 horas) o acúmulo de transcritos do gene AAEL000377 é em média 1300 vezes menor em relação ao acúmulo de transcritos de Actina-1 nos seus respectivos pontos.

Já para o gene AAEL010714, o perfil na Figura 18 B revelou quantitativamente que o acúmulo de transcritos tem pico 48 horas após o repasto, e neste intervalo, o nível de transcrição é aproximadamente 20 vezes maior em relação aos outros pontos

analisados. Além disso, o gene possui aproximadamente 13 vezes mais cópias de transcritos que o gene de Actina 1 no intervalo 48 horas após o repasto. Com esse resultado, pode-se ressaltar que o aumento de transcrição no ponto 48 horas é altamente expressivo. Em relação aos outros 5 pontos analisados (36, 60, 72, 84 e 96 horas após o repasto), o acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 é em média 11 vezes menor que o acúmulo de transcritos de Actina- 1 nos seus respectivos pontos.

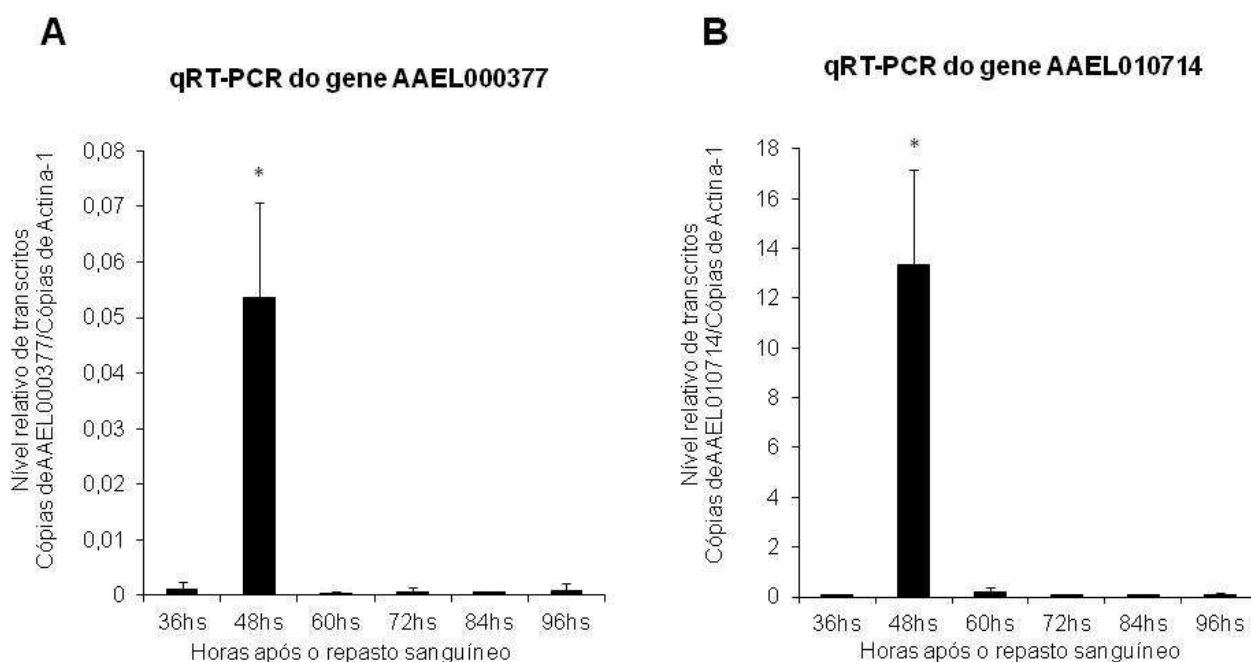


Figura 18 - Quantificação do acúmulo de transcritos dos genes AAEL000377 e AAEL000714 por RT-PCR em tempo real em fêmeas vitelogênicas de *Aedes aegypti*. **A.** Quantificação dos transcritos do gene AAEL000377. **B.** Quantificação dos transcritos do gene AAEL010714. O número de cópias de RNAm foi determinado por comparação com concentrações conhecidas de DNA de plasmídeo contendo o fragmento do transcrito de interesse e a normalização foi realizada contra o número de cópias do gene de Actina-1. O RNA total foi extraído de fêmeas 36, 48, 60, 72, 84, 96 horas após o repasto sanguíneo em 3 experimentos independentes, exceto 84 horas após o repasto (2 independentes), e cada intervalo amostral foi medido 3 vezes. Os dados representam valores médios e as barras de erros indicam o desvio-padrão. A análise estatística foi realizada através do teste *one-way* ANOVA *: $p < 0,001$.

Os experimentos utilizando RT-PCR em tempo real indicaram que os genes AAEL000377 e AAEL010714 (Figura 18 A e 18 B, respectivamente) possuem uma indução brusca no aumento de transcrição depois de 36 horas após o repasto sanguíneo, atingindo níveis de acúmulo de transcrição elevados e significativos ($p < 0,001$) 48 horas após o repasto.

O gene AAEL000377 apresenta níveis muito mais baixos de acúmulo de transcrição em relação ao gene AAEL010714. Porém, este gene apresenta uma indução extremamente elevada 48 horas após o repasto (em torno de 100 vezes) em relação aos outros pontos analisados.

Entretanto, em todos os intervalos quantificados, o acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 é muito maior em relação aos pontos respectivos analisados para a transcrição do gene AAEL000377. Além disso, o alto nível de transcrição do gene AAEL010714 48 horas após o repasto foi um resultado estimulante para o aprofundamento dos estudos deste gene.

4.4 Hibridização *in situ* dos transcritos do gene AAEL010714 em ovários

A evidência de um elevado acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 nos ovários (tecido previamente caracterizado como local de transcrição majoritária) forneceu informação quantitativa relevante para tentativa de detecção *in situ* do RNA mensageiro (RNAm) neste tecido. Assim, a técnica de hibridização *in situ* foi empregada.

Para produção de sondas de detecção, foi utilizado o vetor pCR[®] 2.1 contendo o inserto clonado de um fragmento parcial de DNA complementar (cDNA) do transcrito AAEL010714, de tamanho de 687 pb (Figura 19). Este clone foi previamente gerado através da amplificação de cDNA sintetizado a partir de amostra de RNA total de fêmeas 48 horas após o repasto sanguíneo, usando o par de iniciadores para RT-PCR (Tabela 1).

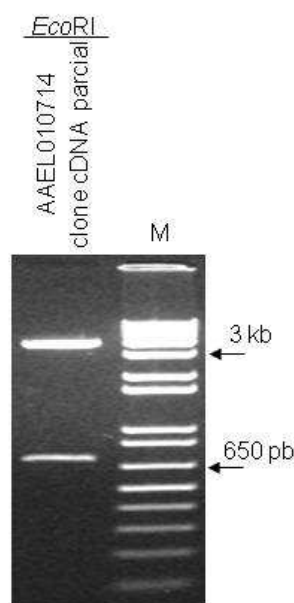


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão do clone parcial do transcrito AAEL010714. O DNA do plasmídeo pCR[®] 2.1 foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* para liberação do inserto. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

Basicamente, este fragmento de cDNA parcial foi subclonado em vetor pCR[®]II-TOPO[®] para transcrição *in vitro* do inserto em orientações apostas com o uso dos sítios de SP6 e T7 presentes no vetor e consequente produção de sondas de RNA senso e anti-senso não-radioativas usando marcação com digoxigenina de acordo com protocolo descrito em Calvo et al. (2005) e Juhn e James (2006).

Os ovários inteiros foram dissecados de fêmeas vitelogênicas 48 horas após o repasto sanguíneo e foram imediatamente fixados e preparados de acordo com Juhn e James (2006). Então, as sondas senso e anti-senso foram hibridizadas *in situ* nos ovários preparados.

Para facilitar a interpretação do experimento a Figura 20 mostra um esquema simplificado de um par de ovários de mosquito. Os ovários são compostos por vários

ovariolos, nos quais os folículos ovarianos (unidades funcionais da oogênese) que contém os oócitos se desenvolvem durante a produção dos ovos (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

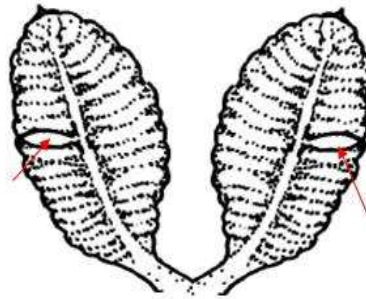


Figura 20 - Esquema simplificado de um par de ovários de mosquito. Os ovariolos que formam os ovários estão representados e dois folículos ovarianos estão destacados e indicados com as setas vermelhas.

FONTE: Modificado de Consoli e Oliveira, 1994.

Com esta informação, o resultado da hibridização das sondas anti-senso revelou um sinal espacialmente localizado em ovários dissecados 48 horas após o repasto (Figura 21 A e C). Nesta figura é possível observar um folículo ovariano primário com forte marcação nas células foliculares. De maneira surpreendente, este resultado indica que o RNA mensageiro de AAEL010714 está polarizadamente localizado dentro das células foliculares epiteliais posicionadas ao longo do eixo dorso-ventral do oócito em desenvolvimento. A mesma marcação foi detectada em todos os folículos ovarianos em desenvolvimento presentes no ovário hibridizado com sondas anti-senso (resultado não mostrado). Um padrão de marcação similar não foi detectado em ovários hibridizados com sondas senso, utilizadas como controle negativo do experimento (Figura 21 B e D).

Interessantemente, esta é a primeira descrição em que um transcrito codificante para uma proteína ligadora de odor atípica de *Aedes aegypti* está localizado nas células foliculares epiteliais dos folículos ovarianos em desenvolvimento.

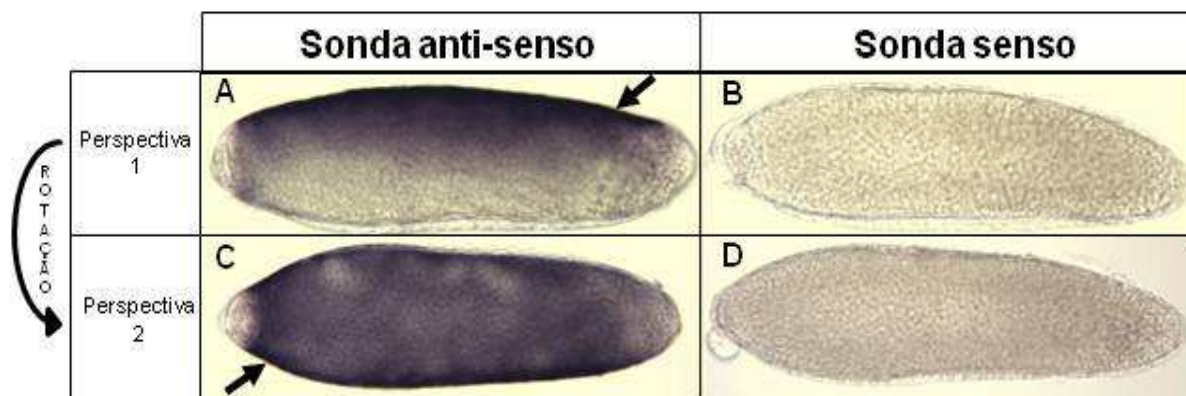


Figura 21 - Hibridização *in situ* de sondas de RNA senso e anti-senso de AAEL010714 em folículos ovarianos de *Aedes aegypti*. Fêmeas vitelogênicas tiveram seus ovários dissecados 48 horas após o repasto e os tecidos foram hibridizados com sondas de RNA marcadas com digoxigenina. **A** e **C**. Hibridização *in situ* com sonda anti-senso. **B** e **D**. Hibridização *in situ* com sonda senso. O folículo primário está orientado com o pólo anterior para a esquerda e duas perspectivas rotacionais estão mostradas em relação ao eixo antero-posterior dos oócitos – **A**; **B** e **C**; **D**. Uma marcação forte e polarizada é observada nas células foliculares que envolvem o oócito em desenvolvimento (setas pretas).

4.5 Análise de acúmulo dos transcritos do gene AAEL010714 mediante infecção por *Plasmodium gallinaceum*

A localização dos RNA mensageiros transcritos pelo gene AAEL010714 nas células foliculares levou-nos a formular uma hipótese de que a expressão deste gene poderia estar reduzida em mosquitos *Aedes aegypti* infectados com *Plasmodium gallinaceum*, uma vez que a infecção de organismos do gênero *Plasmodium* em mosquitos do gênero *Anopheles* causa apoptose em células foliculares epiteliais e consequente diminuição da fecundidade das fêmeas (AHMED e HURD, 2006; HOPWOOD et al., 2001; HURD; GRANT; ARAMBAGE, 2006). Além disso, trabalho da década de 70 (HACKER et al., 1971) mostrou que a infecção por *Plasmodium gallinaceum* causa redução do número de ovos produzidos pelas fêmeas vitelogênicas. Esta mesma conclusão foi obtida em trabalhos recentes (ARAUJO et al., 2010; GRAY e BRADLEY, 2005).

Para testar esta hipótese, grupos de fêmeas sadias e infectadas com *Plasmodium gallinaceum* foram utilizados nestes experimentos realizados em triplicata

biológica, sendo que as fêmeas vitelogênicas sadias e infectadas 48 horas após o repasto sanguíneo foram utilizadas para extração de RNA total e síntese de cDNA. As amostras de cada grupo foram submetidas à análise quantitativa de transcrição pela técnica de RT-PCR em tempo real

De acordo com o gráfico mostrado na Figura 22, os resultados de quantificação obtidos não indicaram uma diferença significativa ($p > 0.6$) entre os níveis de transcrição do gene AAEL010714 entre o grupo controle e infectado.

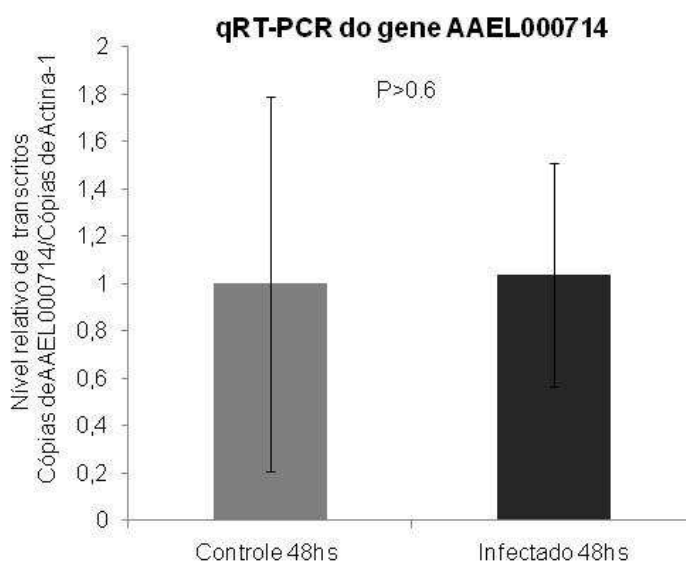


Figura 22 - Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 mediante a infecção por *Plasmodium gallinaceum*. Fêmeas vitelogênicas de *Aedes aegypti* 48 horas após o repasto sanguíneo realizado em pintainhos sadios e infectados com *Plasmodium gallinaceum* tiveram o RNA extraído e o cDNA foi sintetizado. O número de cópias de RNA mensageiro foi determinado por comparação com concentrações conhecidas de DNA de plasmídeo padrão e normalizado contra o número de cópias de transcritos do gene Actina 1. O RNA total foi extraído de 3 experimentos independentes, e cada intervalo amostral foi medido em triplicata. O dado representa valores médios e as barras de erro indicam o desvio padrão. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos controle e infectado ($P > 0.6$). A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

4.6 Análise de acúmulo dos transcritos do gene AAEL010714 mediante cópula

Experimentos para identificação de uma possível modificação dos níveis de transcrição do gene AAEL010714 pelo ato de cópula também foram conduzidos. Para isso, um grupo controle composto de fêmeas livres de machos desde a emergência da fase adulta e um grupo experimental, formado por fêmeas mantidas com machos em mesma proporção foram estudados. As fêmeas de ambos os grupos receberam repasto sanguíneo em camundongos e 48 horas após repasto, o RNA total das fêmeas vitelogênicas de cada grupo foi extraído, o cDNA sintetizado e as quantificações pela técnica de RT-PCR em tempo real foram realizadas em triplicata biológica.

A Figura 23 apresenta os resultados da quantificação realizada em triplicatas biológicas dos níveis de transcrição do gene AAEL000714 entre fêmeas vitelogênicas virgens e copuladas, coletadas 48 horas após o repasto sanguíneo.

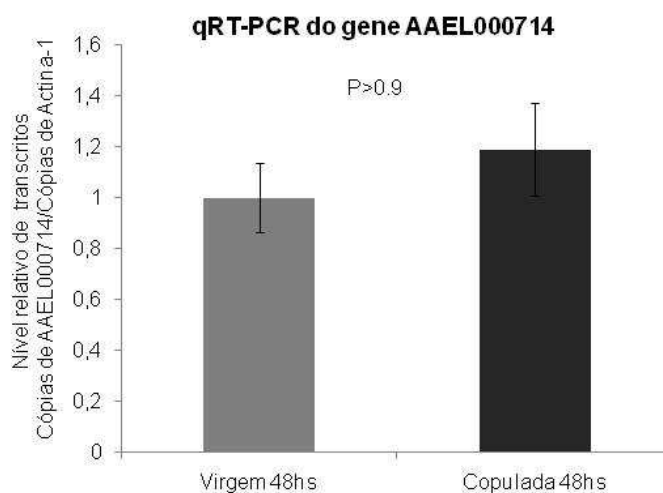


Figura 23 - Quantificação do acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 em fêmeas virgens e copuladas de *Aedes aegypti*. Fêmeas virgens e copuladas 48 horas após o repasto sanguíneo tiveram o RNA total extraído para síntese de cDNA. O número de cópias de RNAm foi determinado por comparação com concentrações conhecidas de DNA de plasmídeo padrão e normalizado contra o número de cópias de transcritos do gene Actina 1. O RNA total foi extraído de 3 experimentos independentes, e cada intervalo amostral foi medido em triplicata. O dado representa valores médios e as barras de erro indicam o desvio padrão. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($P > 0.9$). A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

De acordo com a análise, uma diferença significativa que possa indicar uma regulação dos níveis de acúmulo deste transcrito através de processos desencadeados pela cópula não foi constatada.

4.7 Expressão de proteína recombinante codificada pelo gene AAEL010714

Com o objetivo de confirmar se o transcrito do gene AAEL010714 é realmente traduzido e gera uma proteína detectável em extratos de ovários, inicialmente foram realizados experimentos para obtenção da proteína recombinante e consequente produção de anti-soro policlonal contra esta proteína.

Para isso, o fragmento de cDNA parcial de AAEL010714 previamente clonado em vetor pCR[®] 2.1 foi subclonado em vetor de expressão pGEX-4T-3 de acordo com Material e Métodos (item 3.17.3.1) e com esquema da Figura 24 A. A Figura 24 B mostra o resultado da digestão do DNA referente ao vetor pCR[®] 2.1 com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I e liberação do inserto do cDNA parcial de AAEL010714 com sítios *Bam*HI e *Not*I nas extremidades. A figura também demonstra a linearização do vetor de expressão pGEX-4T-3 com as mesmas enzimas de restrição. O resultado da subclonagem direcionada do fragmento de cDNA no vetor de expressão está mostrado na Figura 24 C. Pode-se observar que a digestão com as enzimas *Bam*HI e *Not*I libera o inserto correspondente ao fragmento parcial de cDNA de AAEL010714. A construção final foi sequenciada e a fase aberta de leitura foi confirmada por tradução teórica da sequência obtida.

Ao ser induzido, este vetor de expressão com o fragmento subclonado gera uma proteína recombinante fusionada à GST de massa molecular total estimada de 54.5 kDa, sendo 26 kDa correspondente à GST e 28.5 kDa à proteína traduzida pelo cDNA parcial de AAEL010714.

A construção finalizada foi transformada em bactérias da cepa BL21 e a proteína recombinante fusionada à GST foi expressa e purificada de acordo com Material e Métodos (item 3.17.3.2). Como controle negativo, o vetor também foi transformado em bactérias da cepa DH10B. A Figura 25 A mostra os resultados da eletroforese em gel SDS-PAGE dos extratos purificados das bactérias após indução da expressão. O

resultado da detecção da proteína recombinante pela técnica de *Western blot*, com o uso de soro murino anti- α -GST está mostrado na Figura 25 B. A proteína GST purificada forneceu um controle positivo para estes experimentos.

Uma banda com massa molecular de aproximadamente 55 kDa pode ser observada no extrato purificado das bactérias da cepa BL21 (Figura 25 A), sendo próxima a massa estimada para a proteína recombinante de 54.5 kDa (esquema da Figura 24 A), indicando assim que a banda refere-se à proteína recombinante fusionada. Uma banda com tamanho correspondente não foi observada em extrato purificado da cepa DH10B (Figura 25 A).

O experimento de *Western blot* (Figura 25 B) com o uso de soro anti- α -GST possibilitou a detecção de uma banda imunorreativa correspondente à proteína recombinante visualizada no gel SDS-PAGE, confirmando que a proteína recombinante foi expressa em bactérias da cepa BL21 e posteriormente purificada. Uma banda imunorreativa equivalente não foi observada para a cepa DH10B (controle negativo) e a detecção de banda imunorreativa correspondente à GST (controle positivo) foi detectada (Figura 25 B).

Embora a proteína recombinante tenha sido obtida e purificada através do uso do sistema de expressão de proteína fusionada a GST, a tentativa de obtenção de anti-soro a partir da inoculação da proteína recombinante purificada em camundongos BALB/C (Material e Métodos, item 3.17.3.3) não resultou em anti-soro policlonal que reconhecesse a proteína recombinante (resultado não mostrado), inviabilizando neste momento, tentativas de detecção da proteína expressa AAEL010714 em extratos de ovários das fêmeas vitelogênicas de *Aedes aegypti*. Então, outra abordagem foi realizada (item 4.9).

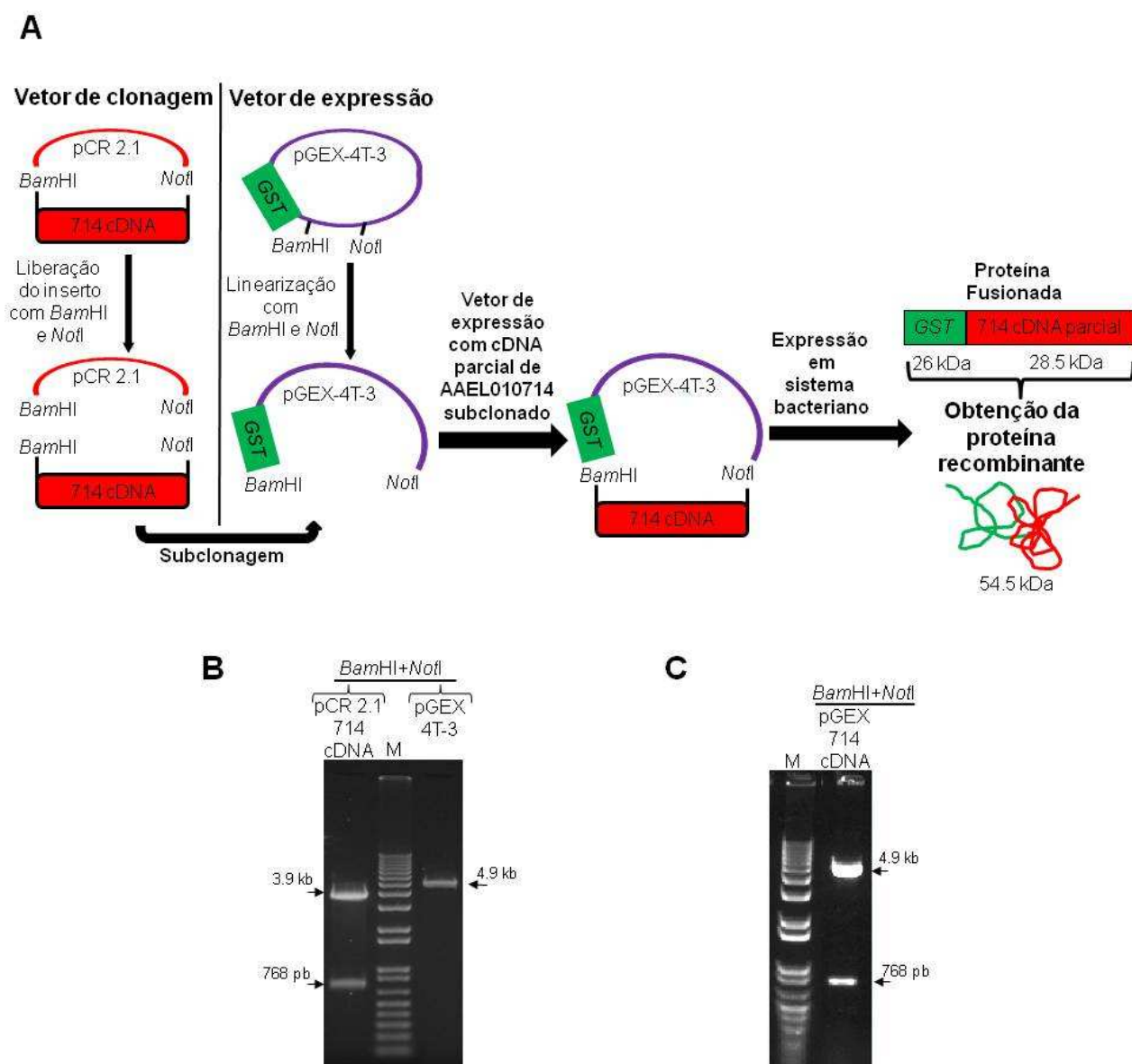


Figura 24 - Esquema da estratégia de subclonagem do fragmento de cDNA parcial do transcrito AAEL010714 para obtenção do vetor de expressão, e géis de agarose mostrando os resultados das etapas de subclonagem. **A.** Etapas de digestão do DNA do vetor pCR[®] 2.1 para liberação do inserto referente ao fragmento de cDNA parcial, linearização do vetor de expressão pGEX-4T-3, subclonagem do fragmento de cDNA no vetor de expressão, e esquema da etapa de obtenção da proteína fusionada, indicando a massa molecular esperada para a proteína recombinante. **B.** O DNA do vetor pCR[®] 2.1 foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I para a liberação do inserto de 768 pb, o qual foi excisado, purificado e ligado em vetor de expressão. O DNA do plasmídeo pGEX 4T-3 foi digerido previamente à ligação do fragmento de cDNA com as mesmas enzimas para a linearização, gerando fragmento de 4,9 kb. **C.** O DNA do plasmídeo pGEX-4T-3 contendo o fragmento de cDNA de AAEL010714 foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I, gerando um fragmento de 4,9 kb (vetor) e outro de 768 pb (inserto), confirmando a clonagem. O produto das digestões de DNA de plasmídeos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

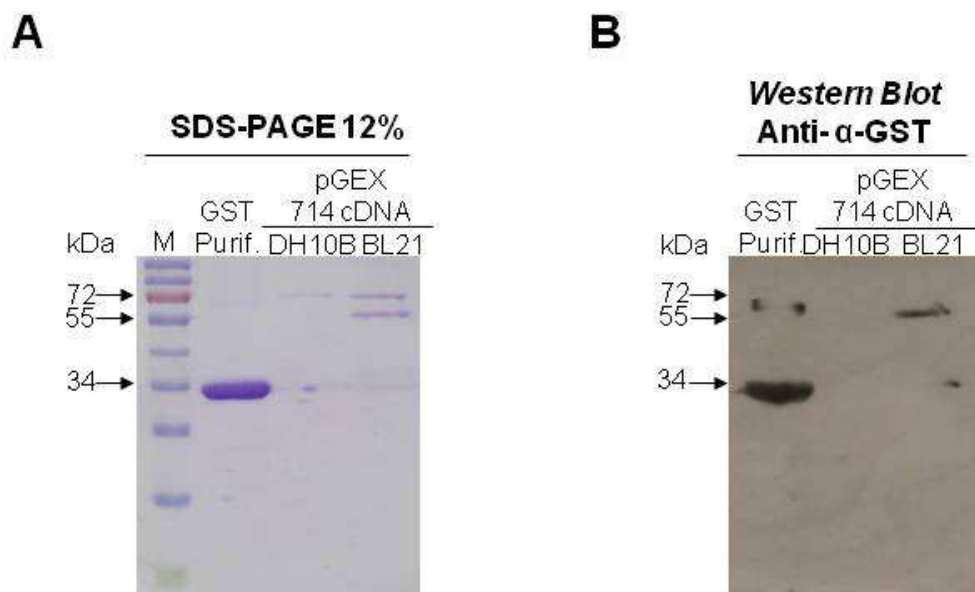


Figura 25 - Expressão da proteína recombinante AAEL010714 fusionada à GST. **A.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% dos produtos protéicos purificados após processo de expressão em bactérias. A proteína GST purificada (GST purif.) foi utilizada como controle positivo (banda de aproximadamente 30 kDa). As bactérias da cepa DH10B e BL21 foram transformadas com plasmídeo pGEX 4T-3 contendo o inserto de cDNA parcial de AAEL010714. A banda de aproximadamente 55 kDa, visualizada no extrato purificado de bactérias BL21 corresponde à proteína recombinante. O controle negativo com extrato purificado de bactérias da cepa DH10B não apresentou uma banda em torno de 55 kDa. **B.** As proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a membrana foi submetida à técnica de *Western blot*, utilizando soro anti-αGST para detecção. Uma banda imunorreativa em torno de 55 kDa foi detectada (BL21), confirmando a expressão e purificação da proteína fusionada. O controle positivo (GST purif.) apresentou uma banda imunorreativa de tamanho correspondente a proteína GST e não foi detectada banda imunorreativa no controle negativo (DH10B). M: marcador de massa molecular Page Ruler™ Prestained Protein ladder (Fermentas).

4.8 Caracterização da sequência promotora putativa e do transcrito completo (full-length) do gene AAEL010714

4.8.1 Obtenção da sequência a montante do gene AAEL010714

Os altos níveis de transcrição do gene sob estudo levaram à busca e isolamento da possível região regulatória do gene. Para isso, a sequência do supercontig 1500

depositada no VectorBase, a qual o gene AAEL010714 está anotado, foi utilizada como molde para o desenho de iniciadores na região a montante do gene para amplificação de um fragmento de 2,5 kb acima do ATG inicial putativo. Os iniciadores com sítios de restrição *Bam*HI foram utilizados (Tabela 4). A região de 2,5 kb foi amplificada a partir de molde de DNA genômico (Figura 26 A) e o fragmento purificado foi ligado em vetor pCR[®] 2.1 (Invitrogen). O clone obtido (Figura 26 B) foi sequenciado e a sequência completa foi analisada através de alinhamento com o supercontig 1500 (Figura 27). O alinhamento da sequência nucleotídica revelou 99% de identidade com a sequência a montante do gene AAEL010714 no Supercontig 1.500.

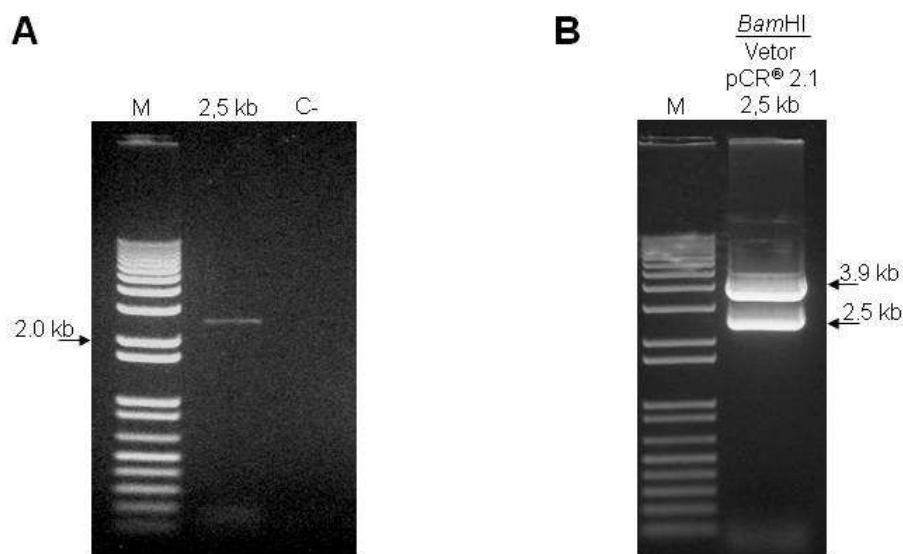


Figura 26 - Amplificação e clonagem da região 2,5 kb a montante do ATG inicial putativo do gene AAEL010714. **A.** O produto de amplificação por PCR foi gerado usando molde de DNA genômico de *Aedes aegypti* e iniciadores com sítios *Bam*HI (Tabela 4) C-: controle negativo (reação sem DNA molde). **B.** O DNA do plasmídeo contendo o inserto de 2,5 kb foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI. O produto de amplificação em **A** e digestão em **B** foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).



Figura 27 - Alinhamento da sequência nucleotídica do promotor putativo do gene AEEL010714. Após sequenciamento do inserto clonado em vetor pCR[®] 2.1, a sequência gerada foi alinhada com a região de 2,5 kb a montante do ATG inicial putativo do gene AEEL010714 pertencente ao supercontig 1.500, depositado no VectorBase. Os pontos na sequência do clone representam nucleotídeos iguais ao da sequência do VectorBase. Os nucleotídeos sublinhados são polimorfismos detectados. A caixa em azul destaca um sítio consensual *tata-box*. As caixas em vermelho indicam sítios putativos de ligação de fatores de transcrição da família *Broad complex* (*BR-C gene family zinc-finger*). A caixa em verde destaca um sítio pentamérico consensual de iniciador de artrópode, *arthropod initiator capsite* – *Inr* (CHERBAS e CHERBAS, 1997). As análises para identificação dos sítios de ligação de fatores de transcrição putativos foram realizadas de acordo com Material e Métodos item 3.17.11.1. As sequências estão identificadas com nomes à esquerda.

Uma análise para identificação de possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição foi realizada e demonstrou a presença de motivos funcionais importantes na regulação da transcrição isto porque, além do sítio putativo de ligação da proteína *TATA binding protein*, foram detectados sítios putativos de ligação para fatores de transcrição da família *Broad-complex*, envolvidos no controle hierárquico de

genes induzidos por ecdisona durante o ciclo reprodutivo do mosquito (PIERCEALL et al., 1999; CHEN et al., 2004). Além disso, um motivo putativo iniciador de artrópodes (*arthropod initiator – Inr*) (CHERBAS e CHERBAS, 1993), foi identificado no promotor putativo do gene AAEL010714.

A sequência de 2,5 kb também é mostrada na Figura 29 A, indicando a posição dos nucleotídeos em relação ao ATG inicial identificado no próximo item (4.8.2)

4.8.2 Obtenção da sequência nucleotídica do transcrito

Devido às características inéditas e interessantes de transcrição do gene AAEL010714, a caracterização da sequência completa do RNA mensageiro foi realizada com o emprego da técnica de amplificação rápida de extremidades de cDNA (*rapid amplification of cDNA ends - RACE*), utilizando como molde RNA total de ovários dissecados de fêmeas vitelogênicas 48 horas após o repasto. As reações de 5'- e 3'-RACE foram executadas e os fragmentos gerados com o uso dos iniciadores GSPR-1 para amplificação da região 5'-UTR do transcrito e GSPF-1 para amplificação da região 3'-UTR estão mostrados na Figura 28 A e B, respectivamente. Nas 2 reações, os fragmentos obtidos apresentaram um tamanho maior em relação aos 624 pb das reações de controle positivo, nas quais foram utilizados os dois iniciadores GSPF-1 e GSPR-1. Este resultado indica a amplificação das extremidades do transcrito. Para a reação 3'-RACE, foram observadas várias bandas, indicando extremidades 3' amplificadas com tamanhos diferentes de caudas poli-A. Os fragmentos de ambas as reações foram clonados e sequenciados de acordo com Material e Métodos (itens 3.16 e 3.17.8). As reações 5'- e 3'- UTR com os iniciadores GSPs-2 e GSPs-3 também resultaram em fragmentos amplificados (resultados não mostrados) que foram clonados e sequenciados, facilitando assim a montagem da sequência consenso.

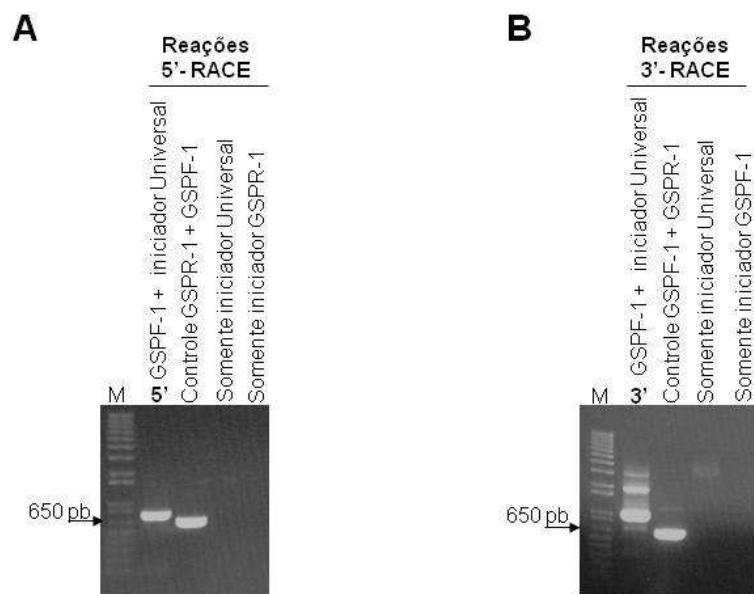


Figura 28 - Reações de 5'- e 3'- RACE para amplificação das extremidades do transcrito AAEL010714. **A.** Reação de 5'-RACE (5'), controle positivo (GSPR-1 + GSPF-1) e 2 reações de controles negativos, uma com iniciador Universal apenas e outra somente com iniciador GSPR-1. **B.** Reação de 3'-RACE (3'), controle positivo (GSPF-1 + GSPR-1) e 2 reações de controles negativos, uma com iniciador Universal apenas e outra somente com iniciador GSPF-1. Os fragmentos foram amplificados a partir de molde de RNA total, extraído de ovários dissecados de fêmeas vitelogênicas 48 horas após o repasto sanguíneo. Todas as reações foram realizadas com o kit SMARTer™ RACE cDNA Amplification (Clontech), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos das reações de RACE foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

Ao final das análises, uma sequência consenso completa (*full-length*) do transcrito AAEL010714 foi obtida e está representada na Figura 29 B juntamente com a sequência putativa do promotor de 2,5 kb, obtida por sequenciamento do clone contendo este fragmento (item 4.8.1). O tamanho total do transcrito é de 1009 pb, com uma fase aberta de leitura (*open reading frame* - ORF) de 852 pb. Um sinal de poliadenilação consenso (AATAAA) foi detectado 34 pares de bases antes do início da cauda poli-A e uma região 5'-UTR de 24 pb foi caracterizada (Figura 29 B).

A

```

GGATCCTGTATTAGCTAACATAGTTTATACCACATGCCATTTTTTCTGTCACTTGTCTTTGCTTCCAACCCCTTTGCTTTGATCATAAAGTGCCCA -2393
TAAATGTATTATCCGTTTCATAGAAATAGTGAATTTAAAGTGAGCTACAATTAATCATATAAATCTTTCGACCCGCTGACTGATTTGAAAGAGTTAAGA -2293
TGGCCCGTGTAAATCGATTGGGCTGAGGACCACTAATTTAAAAGAACGAATGATCCGTGGCTCTTTTTTGCAGAGTTCGGTTCATTGATCAGCACGGAT -2193
CAGACAAAAGTGACTCGGAAAAAGAAGAACGAACCGATTATTTTTCTTATTCTCATTGCTTCCCTGGCTTATTATAATGCTTGACATGTGCTTTGC -2093
TTTGCAGTCAAGCCACTCATGCAGCAAGGTTTCTGTGCTCCGTACTCTCGCTCTCAGTATACACAAACAAATTTGCCCGCTCACTTGCACAC -1993
AGGGCATGACAGAGAGAAATGTATCTACTATGATGACATAGCACATTATGAATTTTTCTTTGGTTCGGTAGGGGAATCAAGCCAGTGTGTACCGTT -1893
TTGATTCAATTAACGGACACCTAAGGCCTCAGCGACGTATAAGCCATCGAAAAATGATATAAAAAATAATCATTCCGATGATTCCTTACGTCATCGAACC -1793
TCTAAAACATCAAACCTTTCCGATGACGGGAGAGATTTGATTCCGCAACATGAATAATTTAAAAATAAAAGAAATGTGTGGACTTTTATGATCTTGT -1693
TCCGGACGCTTCCCTAATTTGACTCATATTTCCGGACCTTCGATTCGAATTCGGACAATAATGAAATCAATGAAAAGAAAAGTTTAAATCCCTAATTT -1593
AAATCGTCAAACACTAAAAGAGACGACTAAGACAGTTGGGCATATAAATTTGTCTATCTGTCATGGAAGAAATGTTATAAAAAATGCGAAATGA -1493
GAACTTTGAACTGCAAAAATTTGAAACATTTCTGTGTCCGGAGTTTGAAGCTGTCCGTAATAATGAAATCAAATCGGTAATCGTGATTTTTGGAGAAGA -1393
ATGTACGAAAATGAGAGAGCGAAGATACGAAAGGTACGACGTATGTGCACAAACGGGAGTGAACCGTCTTTTTTGCCTCGCTCGTTCGCTTGGT -1293
TCAGTTCGCTCTTCTGAAACCGTCAAAAAGATTCCGTTCACTAAAATGAGTGAATTCGGATTCGGATTCGTTCTTAATTTCTTACAGAAAACGTAATTTCT -1193
GGTGTCTGGCTATCTCAGTCTTAATCTGCGAACGTTTCAATTTATTTTCCCGACGTTTCGGCCATTTGTTGGCCCTTTTTCAAGCCTAACAGAAAAC -1093
GCGGTGGTTTTTACATAACCCCTGGCCAGTTTTTGAAATTAAGGTGCGAAGGATTTGAAACAAAAGCCTGGGTAGAATTCTATAACATCTTTGACAT -993
AATCTAAATAAGAATTAGAGAGGATTTTCAACGAAATTCCTGAATTAATATTTGACATAGCTTTGAAACACGCGAAGCTCAAAAAGCGATACGACAGCTG -893
CCCAGGCCAGCATCAAATCATAGGAAATCTTAGTTGGCCAGGACGAGAAGCTCAGAACCGACTATTGGAAGTTTCCAGCCGCCACCGTTAGCTGT -793
TGGGTGAACGATTAATAATGTTGATTTATTCAGTTTTAGTATTGTTTCCGCTTAAAGTATGGAACAAACATTTGATTCAAAATGCCGAACATGTTTAA -693
TTCTGTCTCATATTCGGAACACCTTGATTCAAAATCGAAACACACGATAAATTCGTAATTCAAATGAAATAATTCGCAAAAAAATTAATCAAGCTTGT -593
CTTCTGGTCTGAAACTAGAGAATCATCACTGTTCCCAACAGTATAAATTTATTTGGAGACGTTAAAATTTGAAATGCAATGACTGCCATTTCTTTGAGTCT -493
GTTCCGAAATTTGAGACAAAACGGTACGATGATATGCGTTATCGCTAGGATGATCCCAATCTGCGCCATCTGGCTGACGTAGGTAATGCTACTAGTTGA -393
GAGATCATGTTAGACATGATGATAGATGCAACAACTCGAAGACCTACCGTCACTACTAATGTTTTCGGTTTAGACGGCAACAACACCGGAGAAGTG -293
AACTTCTACCTTCAACATGAAGCTGATATTAATAAATAAATGATTAATAGGCTTTGAGCCTTAGAAATTTATAGTACCCATAACGTTTCTTGTAAATAT -193
CTTGTCTCGATTGTCTATACAAAGTCAAGCAGTCCGCATTTCAGTCAAGCAATACATAAACACGCTCGCATTCGATCGAATTCATCTTAAACAAA -183
TCACACAGTGCCATTGGCCTACTGCTCTCGTTCAAAAACATCCGCCAAC(TATAA)TGCTTGGCAATTCTCTGTATAGATTCAGTTGCTACCGCCACCC -16
TTTCATCGGATCC

```

B

```

AGTGTGCTCCAGACATACATCATGGAATTA AAAACGTTTCACTTTTACTGCCGTGTCTGCACTTTGACAAGTTACACCGAAGCACTCGATCACG +100
S C F Q T Y I I H E L K T F H F L L P L L C T L L T S Y T E A L D H 25
CAGCCATTCTGAAAAGTCCCAACGAGTTGCAGCTGGAGTGTCCAAATATCTCCCGTCAATCGACGTATCGCAAAACGTAGACTGTTACGATCGGTGAT +200
A A I L K S P N E L Q L E C S K Y L P S I D V S Q N Y D C Y D R C I 59
CGGTTTGGTGGCCCGCTTTCGGAATGACTCTATCGGTAGACCTGCGCAACGATGCTCBATACTACCACCGGATACGCGCAAGCAAGATCAGATCACT +300
G L Y V G R F W N D S I G R P A Q T I A R Y Y Q P D T G S Q D H I T 92
CGAACCGATCAGTGTGTCGGA AAAAGTTTTAACCGTGCCTAGAAACGCTTACTGTCAGCGGCAAGCTCCGGTTTTCAGTGTCTATCGGATCAACTCG +400
R T D Q C L C E K V L T Y P R N A Y C Q R A S S G L Q C Y L D N Y 125
GACAGCTGCTGACCGGACTCCGAGTTTCGTTCCAGTGAATACGTCGCGCAAACTCTCTGGGATTGTCACAAATGCTGCGAGATACAGAGA +500
G Q L L T G T P Q F V P Y T E I R A A Q I F W D C A Q H L Q I S R D 159
TAGGCTGACCCAGATTTTCAAGGATGGGTACAACAAAACGTCGAAAGCCGTTGCCTTATCCGATGCTTTTTGGTGGTGGTGGATGATACAGCGACCGT +600
R L T Q I F K D G Y N K T S E G R C L I R C F L Y R A G L Y S D R 192
CAGGACCGAATAATCGGACGCTTTGCGGTACAGTGTGAGGGGTATACTGCTGAGTACGAGCAAGCGGTGGTCAAGCTGTATGACAGGTGAAAGAAAGAA +700
Q G P N I G R F A V Q C E G Y T A E Y E Q A V V S C Y D R L K K E 225
CGCTTGACAGCTGTTTATGGCCACCCGAACGATGGACGAATGATCCAGGGCAATCAGTTTGTCTAGTGAATTTGATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG +800
S L D S C S L A T R T M D E C I Q G N Q F S S S D I D G L Y T F V G 259
GGT TACTTTATTTAAGGAAAGACATTTGGAAGGAAATTTACTATCCACTGTCTACATATTATTTTATCATAAATCCCTTTTTTTGTCAACACAAAA +900
V T L F N L G K T L E G I Y Y P L Y V T L L F L S * 293
TATAAGATGTTCCATTCTTTGAGTCAATTTGCGCACACAAATAAACCGTCAAGATGCTTTGGTTACACAAATCATATAAAAAA AAAAAAAAAA +1000
AAAAAAAAA

```

Figura 29 - Sequência nucleotídica e composição predita de aminoácidos do gene AEEL010714 de *Aedes aegypti*. **A.** Região promotora predita. Setas destacam as sequências do par de iniciadores usadas para amplificar 2.5kb com linhas tracejadas mostrando os sítios de restrição de *Bam*HI. O *TATA box* predito está identificado por caixa retangular. A sequência de nucleotídeos pentamérica pontilhada mostra um sítio consenso em artrópodes (*arthropod initiator capsite*). A base sublinhada em negrito é o primeiro nucleotídeo transcrito (+1). Números dos nucleotídeos (posição na sequência) estão apresentados na direita. **B.** Sequência completa (*full-length*) do transcrito AEEL010714 e tradução teórica. O primeiro nucleotídeo transcrito (+1) está sublinhado em negrito, o ATG inicial está identificado por caixa retangular e o códon de terminação está representado por asterisco. Regiões não traduzidas (5'- e 3'-UTRs) estão sublinhadas. O sinal predito de poliadenilação e a cauda poli-A estão duplamente sublinhados. O peptídeo sinal predito está tracejado e o possível sítio de clivagem da proteína está indicado por uma cabeça de seta. O motivo de aminoácidos com linha dupla tracejada foi sintetizado e usado para gerar anticorpo policlonal anti-AeegOBP45. Número de nucleotídeos e aminoácidos (posição na sequência) estão apresentados na direita.

Interessantemente, estes resultados diferem da predição do gene AEEL010714 disponível no banco VectorBase, na qual 2 exons de 762 pb e 21 pb, e 1 intron de 222 pb foram automaticamente anotados. O transcrito *full-length* caracterizado experimentalmente neste estudo alinha continuamente com o primeiro exon e o intron predito pelo VectorBase, mas não com o segundo exon (Figura 30), revelando que o intron anotado não é processado *in vivo* no RNA mensageiro maduro.

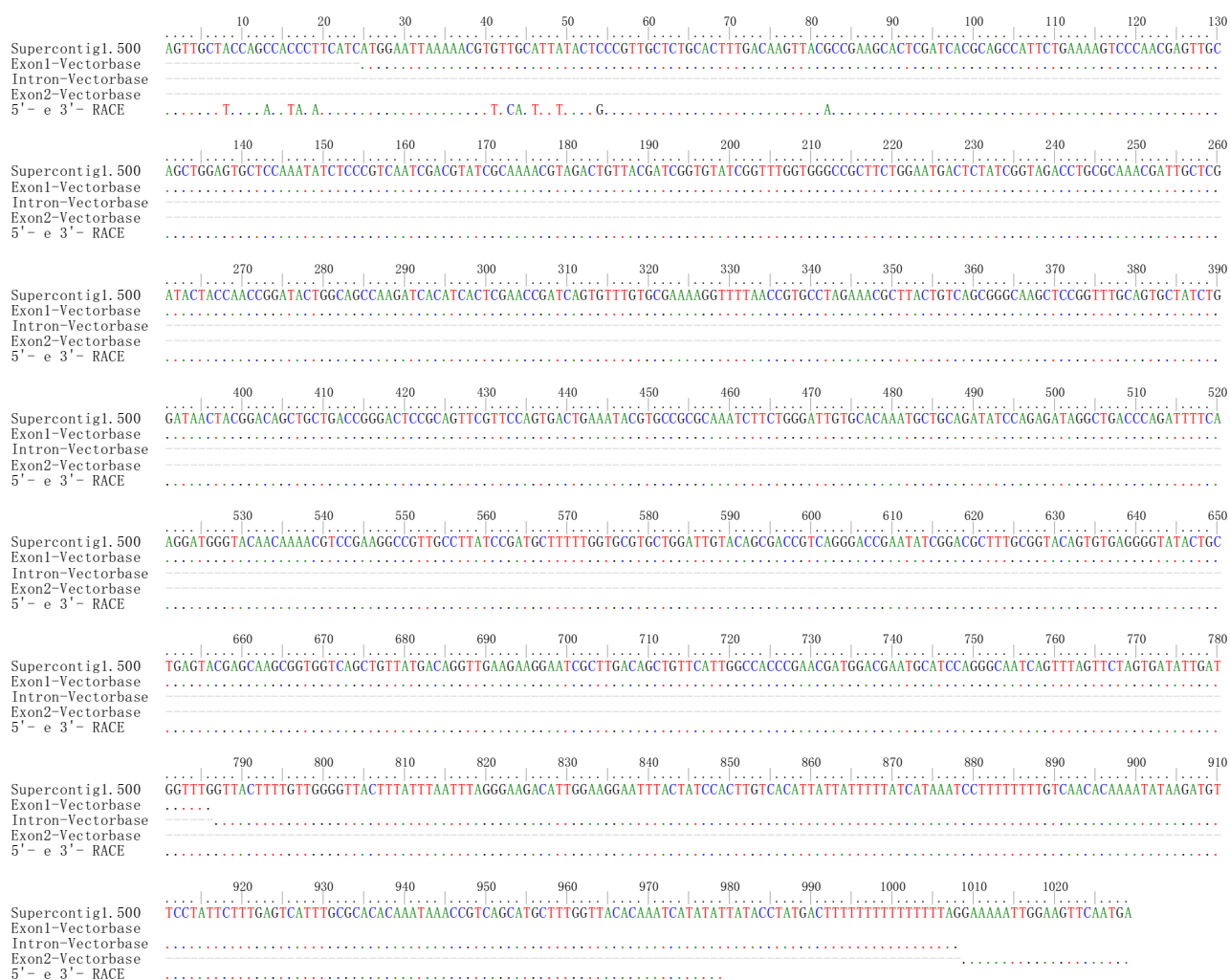


Figura 30 - Alinhamento das sequências do gene AEEL010714. A sequência nucleotídica parcial do Supercontig 1.500 foi alinhada aos exons e intron do gene AEEL010714 preditos pelo VectorBase e à sequência de nucleotídeos completa (full-length) do transcrito AEEL010714, obtida nos experimentos de 5'- e 3'- RACE. Linhas pontilhadas indicam espaços (*gaps*) e os pontos indicam nucleotídeos idênticos aos da sequência do Supercontig. Números acima das sequências mostram a posição dos nucleotídeos no alinhamento. As sequências estão identificadas com nomes à esquerda.

Com base neste resultado, propõem-se que o gene AAEL010714 transcreve apenas 1 exon, sem intron flanqueando a região codificadora.

Uma busca por sequências similares utilizando o algoritmo blastn contra o banco de transcritos do VectorBase mostra que a sequência obtida tem uma maior identidade (*best-match*) com o transcrito AAEL010714-RA (RA- código para transcrito) do gene de mesmo código, produzindo um *e-value* = 0.0, um *score* de 1457 e 99% de identidade. A segunda sequência com alto índice de identidade é a do transcrito anotado AAEL010718-RA, produzindo um *e-value* = 0.0, um *score* de 1120 e 97% de identidade. Segundo anotação do banco VectorBase, o gene AAEL010718 é parálogo do gene AAEL010714.

A ORF obtida pelos experimentos de RACE codifica para uma proteína predita composta por 283 aminoácidos, com massa molecular de 31.9 kDa e com ponto isoelétrico de 5.25. Um peptídeo sinal formado pelos 22 primeiros aminoácidos foi detectado na tradução teórica, sugerindo que a proteína é secretada e um peptídeo de 29.4 kDa é predito após clivagem do peptídeo sinal. Esta massa molecular predita para a proteína AAEL010714 madura está entre 25 a 35 kDa, intervalo de massas moleculares encontrado na maioria das proteínas ligadoras de odor (OBPs) atípicas de *Aedes aegypti* anotadas *in silico* por Zhou et al. (2008).

4.8.3 Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas preditas codificadas pelo gene AAEL010714 e das proteínas AAEL01718 parálogas

Após obtenção experimental da sequência nucleotídica completa do transcrito AAEL010714, foram realizadas análises de similaridade, sendo que a sequência de aminoácidos inferida pela tradução teórica da ORF detectada (Figura 29 B) foi utilizada para busca de peptídeos similares no banco de proteínas do VectorBase, através do uso do algoritmo blastp. A análise mostrou que a proteína com maior identidade (*best-match*) é confirmadamente a codificada pelo gene AAEL010714, anotada como AAEL010714-PA (PA- código para proteína). A análise resultou num *e-value* = 1^{-147} , um

score de 1327, e uma identidade de 98.03%. Porém AAEL010718-PA, outra proteína anotada no VectorBase, codificada pelo gene parálogo de código AAEL010718, apresentou um e-value = 1^{-121} , um score de 1110 e uma identidade de 95.83%.

Em trabalho de bioinformática publicado por Zhou et al. (2008), no qual baseado em identificação de motivos conservados, foram detectadas e anotadas todas as proteínas ligadoras de odor (OBPs) putativas presentes no genoma de *Aedes aegypti*, as proteínas codificadas pelos genes AAEL010714 e AAEL010718 foram classificadas como OBPs atípicas e foram anotadas como AaegOBP45 e AaegOBP44, respectivamente. A classificação de “atípica” foi baseada na posição de seis cisteínas conservadas (indicadas na Figura 31). Zhou et al. (2008) também anotaram outra OBP atípica que foi classificada como AaegOBP44B, através de re-análise de sequências depositadas no VectorBase (detalhes no trabalho), sendo traduzida teoricamente do gene AAEL010718N. Esta proteína putativa possui uma cauda C-terminal maior em relação à proteína AAEL010718-PA.

Usando a sequência de aminoácidos das proteínas putativas maduras AAEL010714-PA (AaegOBP45), AAEL010718-PA (AaegOBP44), AAEL010718N (AaegOBP44B) e a sequência de aminoácidos proveniente da tradução teórica da ORF do transcrito completo AAEL010714 (obtida no experimento de RACE), foi realizado um alinhamento conforme Material e Métodos item 3.17.10.

O alinhamento mostrou que a ORF de AAEL010714 obtida experimentalmente possui a mesma composição de aminoácidos em relação à proteína AAEL010714-PA até a região C-terminal, mas foi detectada uma cauda C-terminal mais longa na ORF traduzida de AAEL010714 em comparação com a AAEL010714 anotada no VectorBase, com 23 aminoácidos adicionais até o códon de terminação (*stop codon*) (Figura 31). Além disso, apenas 6 aminoácidos não são conservados entre as 2 proteínas maduras até a posição 239 (Figura 31).

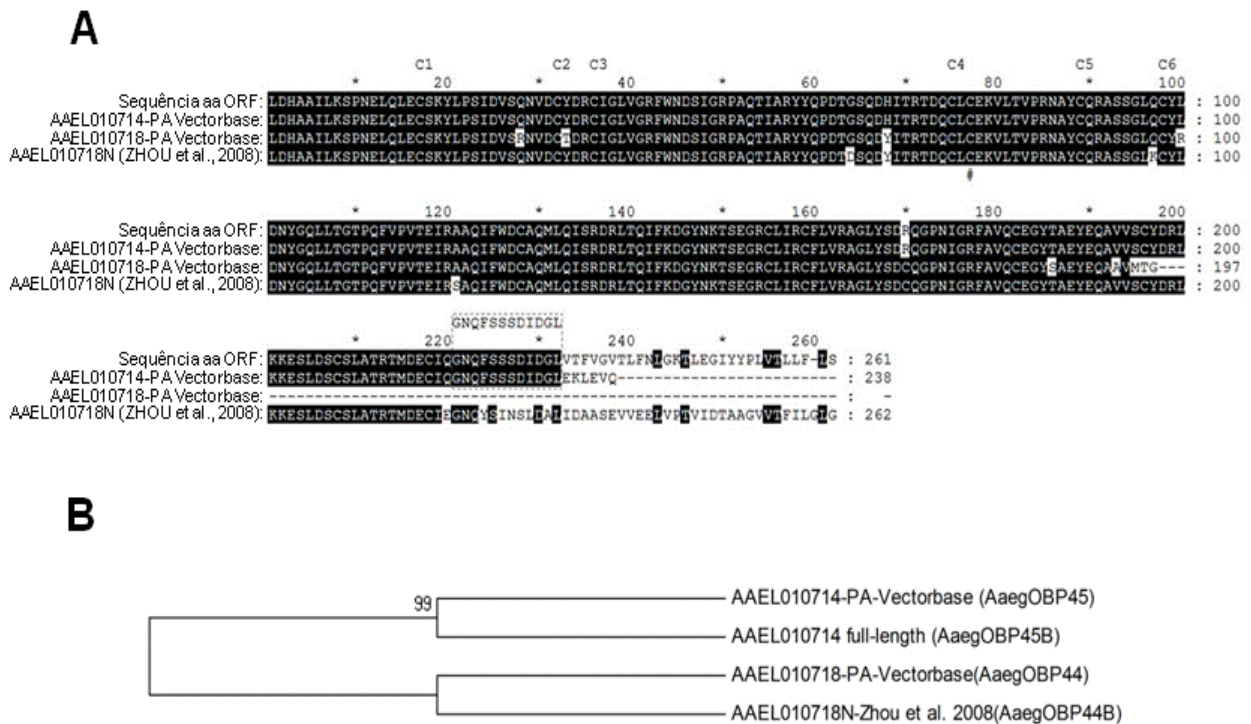


Figura 31 - Alinhamento e árvore por método neighbor-joining de 4 polipeptídeos maduros preditos de OBPs atípicas de *Aedes aegypti*. **A.** A tradução da sequência nucleotídica do cDNA completo de AAEL010714 (obtida experimentalmente pelo método de RACE) está indicada por sequência aa ORF. Sequências de aminoácidos de AAEL010714-PA e AAEL010718-PA foram obtidas no banco VectorBase e foram anotadas anteriormente como AaegOBP45 e AaegOBP44 respectivamente (ZHOU et al., 2008). AAEL010718N é uma sequência traduzida de um transcrito predito completo com um 3'-terminal mais longo que AaegOBP44, anotada como AaegOBP44B (mais detalhes em ZHOU et al., 2008). Os números em cima do alinhamento indicam a posição dos aminoácidos no alinhamento completo. Os números na direita do alinhamento mostram a posição dos resíduos de aminoácidos em cada sequência. Os resíduos não conservados entre as sequências estão destacados. As posições de 6 cisteínas conservadas (C1-C6) que se ajustam no motivo descrito em Zhou et al., 2008 e conferem uma classificação OBP atípica estão indicadas acima do alinhamento. Traços indicam espaços (*gaps*) nas sequências. A caixa retangular tracejada destaca a sequência do dodecapeptídeo usada para produzir o peptídeo sintético e o anticorpo policlonal anti-AaegOBP45. **B.** A árvore neighbor-joining não enraizada mostra as relações entre as 4 OBPs atípicas preditas e foi elaborada com o programa MEGA4. Suporte de Bootstrap (com um corte de 50%) foi inferido de 1000 replicatas e o valor está mostrado nos nós dos ramos.

A análise filogenética da Figura 31 B mostrou que a ORF de AAEL010714 traduzida do experimento de RACE é mais relacionada à proteína AAEL010714-PA (AaegOBP45) em relação às proteínas AAEL010718-PA (AaegOBP44) e AAEL010718N (AaegOBP44B). Estes resultados nos levaram a nomear a proteína putativa obtida pela tradução teórica da ORF identificada experimentalmente de

AaegOBP45B, uma vez que a sequência do transcrito codificante para AaegOBP45 não foi confirmada em nossos experimentos. Provavelmente, o único produto protéico presente *in vivo* nos ovários, codificado pelo gene AAEL010714, seja a proteína AaegOBP45B.

4.9 Identificação da proteína AaegOBP45B em extratos protéicos de ovários de *Aedes aegypti*

Com o objetivo de confirmar se o transcrito caracterizado é realmente traduzido e gera uma proteína detectável em extratos de proteína total de ovários, a obtenção de anti-soro policlonal contra a proteína predita pela ORF identificada foi novamente abordada, uma vez que a proteína recombinante foi expressa, mas o anti-soro não foi obtido (Resultados, item 4.7). Além disso, por causa da alta conservação entre as 4 proteínas parálogas preditas (Resultados, item 4.8.3), a busca por um epítopo específico foi um pré-requisito para produção de anti-soro contra a OBP45B. O alinhamento da Figura 31 A proporcionou a identificação de um dodecapeptídeo (GNQFSSSDIDGL) que confere um potencial epítopo, que não é compartilhado entre as proteínas preditas AaegOBP44 e AaegOBP44B. Esta sequência de aminoácidos foi usada para síntese comercial do dodecapeptídeo. O anti-soro contra o epítopo AaegOBP45B-GNQFSSSDIDGL também foi produzido comercialmente.

Foram determinados intervalos para obtenção de extratos de proteína total de ovários baseados no perfil temporal de transcrição obtido anteriormente (item 4.2.1). Foram usados extratos de ovários dissecados 48 e 72 horas após o repasto e também 24 horas, sendo este último o controle negativo (já que o transcrito não é detectado neste intervalo) e experimentos de *Western blot* foram realizados.

A massa molecular predita para a proteína AaegOBP45B é de 31,9 kDa, mas após a clivagem do peptídeo sinal a predição é de 29,4 kDa. Além disso, há 2 sítios potenciais de N-glicosilação (aminoácidos Asn⁴⁴ e Asn¹⁴⁷, Figura 31) e estas modificações pós-traducionais preditas podem aumentar a massa molecular esperada para a proteína madura.

Os resultados de *Western blot* na Figura 32 mostraram a detecção de bandas imunorreativas com uma massa molecular próxima à predita teoricamente (35 kDa a 40 kDa aproximadamente) somente em amostras de ovários 48 e 72 horas após o repasto. Além disso, nenhum sinal similar foi detectado no extrato protéico da amostra 24 horas após o repasto, sendo consistente com os resultados do perfil transcricional do gene sob estudo. O único sinal detectado na amostra 24 horas foi também visualizado no controle negativo do experimento, no qual os extratos foram incubados com soro pré-imune, sugerindo inespecificidade por reação cruzada. Assim, este resultado suporta evidências iniciais que a OBP45B seja traduzida e esteja presente nos ovários 48 horas após o repasto.

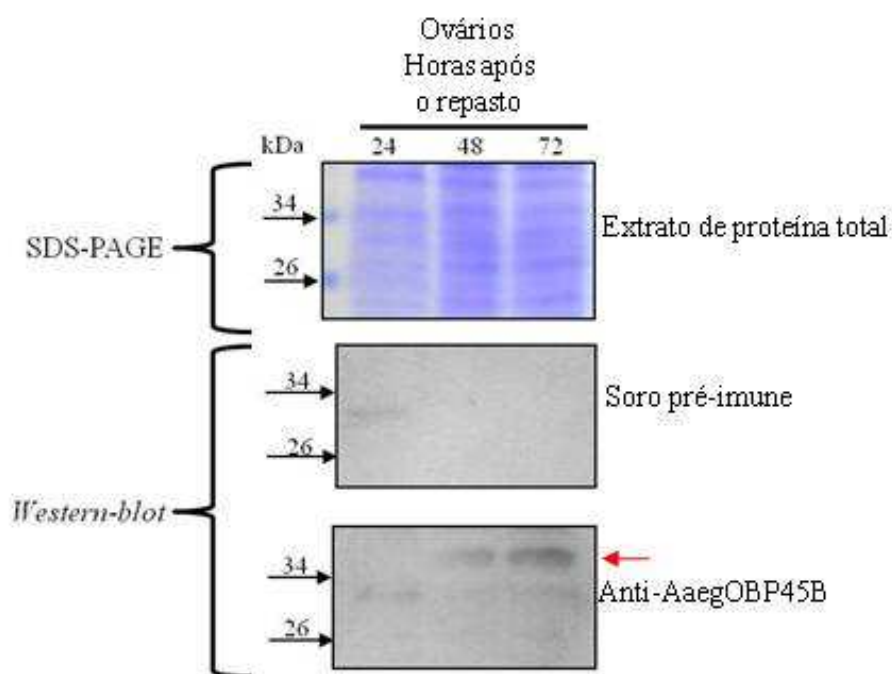


Figura 32 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% de extratos de proteína total de ovários e *Western blot* para detecção da proteína AaegOBP45B. As amostras de extratos de proteína foram obtidas de ovários dissecados de fêmeas vitelogênicas 24, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo e 50 µg do extrato total de proteínas de cada amostra foram aplicados no gel SDS-PAGE. Após eletroforese em duplicata, as proteínas de um dos géis foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a mesma foi submetida à técnica de *Western-blot*, utilizando anticorpo policlonal contra AaegOBP45B, ou soro pré-imune como controle negativo. A seta vermelha indica a região com as bandas imunorreativas detectadas nas amostras 48 e 72 horas após o repasto. O marcador de massa molecular Page Ruler™ prestained protein ladder (Fermentas) foi usado no experimento.

4.10 Tentativa de silenciamento do gene AAEL010714 para identificação da possível função da proteína AegOBP45B

Embora a proteína AegOBP45B tenha sido identificada em extratos de proteína total de ovários 48 e 72 horas após o repasto, uma possível função desempenhada neste órgão não está clara. Porém, uma hipótese para função desta proteína é o seu envolvimento com a composição da casca do ovo de *Aedes aegypti*. Portanto, a técnica de interferência por RNA (*RNA interference-RNAi*) (FIRE et al., 1998) foi empregada, visando o silenciamento do gene AAEL010714 na tentativa de obtenção de informação funcional através de um possível fenótipo adverso após tratamento.

Os RNAs dupla-fita (dsRNA) foram sintetizados de acordo com Material e Métodos (item 3.17.13.1) e a Figura 33 mostra o resultado da síntese do dsRNA de AAEL010714 e também do dsRNA controle DsRED (gene exógeno).

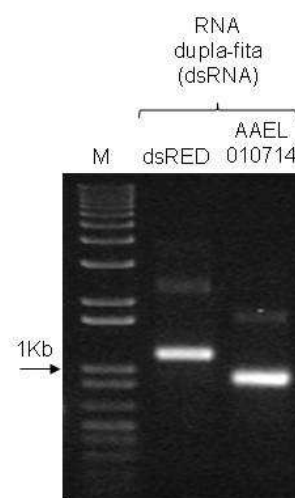


Figura 33 - Eletroforese dos produtos de dsRNA de AAEL010714 e DsRED gerados por transcrição *in vitro*. Os produtos sintetizados a partir de moldes de DNA de plasmídeos contendo o cDNA parcial de AAEL010714 e DsRED (Material e Métodos item 3.17.13.1) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

Fêmeas foram injetadas com o dsRNA para AAEL010714 ou dsRNA para o controle DsRED, e um grupo controle de injúria (causada pela injeção intratorácica) foi inoculado com água apenas. Após injeção, as fêmeas dos três grupos tiveram um período de recuperação de 24 horas seguido de disponibilização de repasto sanguíneo. Os ovários das fêmeas vitelogênicas 48 horas após o repasto foram dissecados e os níveis de acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 foram medidos nos 3 grupos.

Inicialmente experimentos de padronização da técnica foram realizados, com injeções de 0,2 µg de dsRNA, como descrito em trabalhos já publicados (BOISSON et al., 2006; OSTA et al., 2004) porém nenhum deles silenciaram genes em ovários. Nestes experimentos preliminares de padronização não foram observadas reduções nos níveis de transcrição do gene AAEL010714 (resultados não mostrados).

Em publicação recente, Arik et al. (2009) silenciaram genes em ovários de *Aedes aegypti* injetando 2 µg de dsRNA. Então, a concentração injetada em um novo ensaio foi aumentada para 2 µg. Embora apenas um experimento tenha sido realizado com esta quantidade, a Figura 34 mostra que não há uma diferença marcante dos níveis de transcrição do gene AAEL010714 entre os grupos.

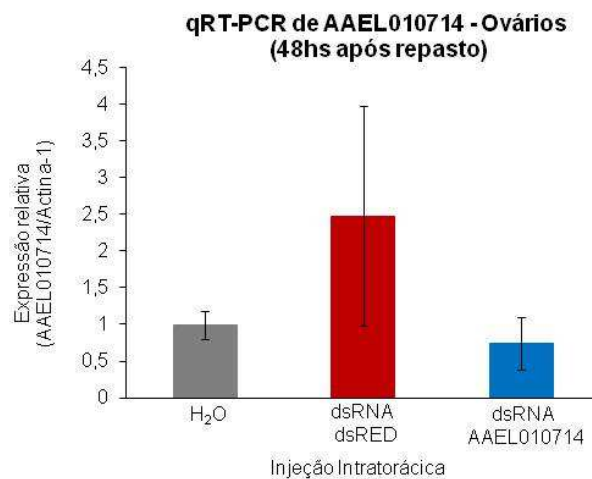


Figura 34 - Quantidade relativa de transcritos de AAEL010714 em fêmeas injetadas com 2 µg de dsRNA de AAEL010714, controle DsRED ou apenas água. A injeção de dsRNA foi realizada intratoracicamente em fêmeas com 5 dias após emersão, previamente copuladas. Após tempo de recuperação de 24 horas, as fêmeas foram alimentadas com sangue. O RNA total foi extraído de pools de 5 pares de ovários 48 horas após o repasto, e o cDNA sintetizado foi utilizado na quantificação. Em cada grupo, o acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 foi medido em triplicata.

Mesmo assim, fêmeas injetadas de cada grupo foram avaliadas individualmente para parâmetros de fecundidade e fertilidade como descrito em Material e Métodos (item 3.17.13.3). Isto porque a análise de expressão foi realizada em pool de 5 pares de ovários e poderia mascarar resultados individuais de diminuição dos níveis de transcrição.

A análise de fecundidade, através da contagem do número de ovos ovipostos por fêmea injetada não mostrou uma diferença significativa entre o grupo injetado com dsRNA de AAEL010714 e os grupos controle (Figura 35)

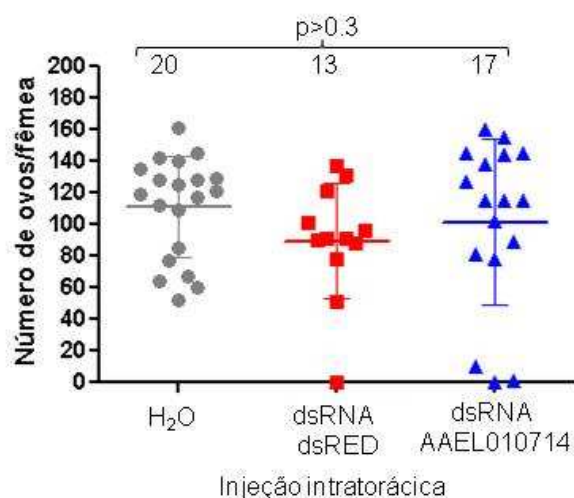


Figura 35 - Comparação de número de ovos ovipostos por fêmea injetada com 2 µg de dsRNA de AAEL010714, controle DsRED ou apenas água. Fêmeas 24 horas após injeção realizaram o repasto sanguíneo e 72 horas após a alimentação, foram colocadas individualmente em recipiente adequado para oviposição. Os ovos foram coletados para contagem após 3 dias. O número de fêmeas analisadas por grupo está indicado acima do gráfico. Não houve diferença significativa entre os 3 grupos ($p > 0.3$). A análise estatística foi realizada através do teste *one-way* ANOVA.

As análises de parâmetros de fertilidade também não indicaram uma diferença significativa entre os grupos, tanto para número total de larvas F1 eclodidas por fêmea

(Figura 36 A), quanto para a taxa de fertilidade (número de larvas eclodidas em relação ao número de ovos ovipostos por fêmea de cada grupo (Figura 36 B).

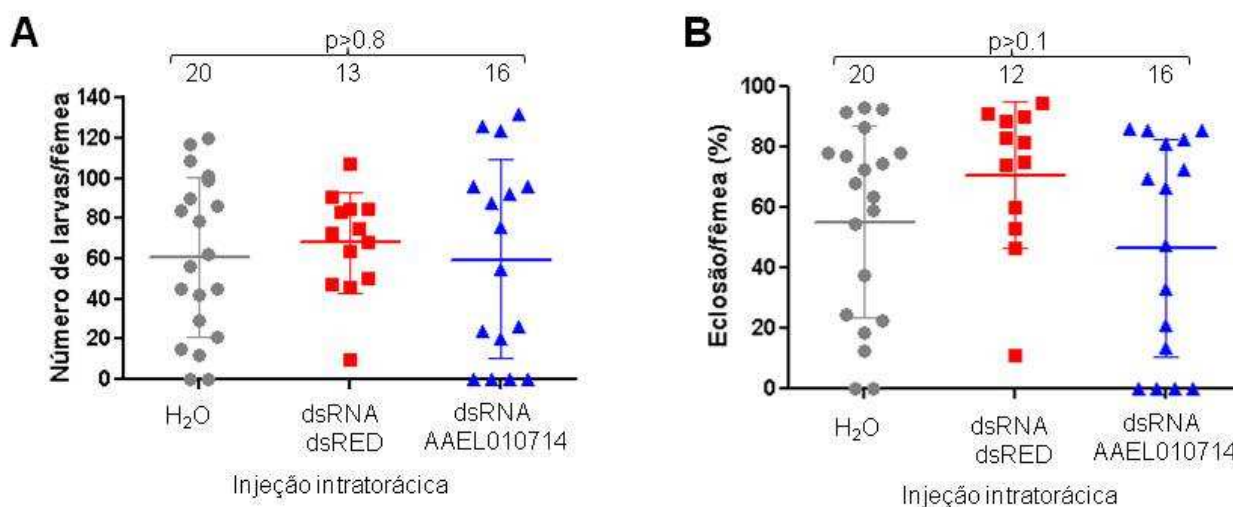


Figura 36 - Comparação de parâmetros de fertilidade entre fêmeas injetadas com 2 µg de dsRNA de AAEL010714, controle DsRED ou apenas água. **A.** Para cada grupo experimental, todos os ovos ovipostos por cada fêmea foram colocados em recipiente individual para eclosão das larvas. O número de larvas foi obtido 5 dias após eclosão. Não houve diferença significativa entre os 3 grupos ($p > 0.8$). **B.** A taxa de fertilidade foi obtida através do número de larvas eclodidas por fêmea de cada grupo em relação ao número de ovos ovipostos por indivíduo. Não houve diferença significativa entre os 3 grupos ($p > 0.1$). O número de fêmeas analisadas por grupo está indicado acima do gráfico. A análise estatística foi realizada através do teste *one-way* ANOVA.

Conseqüentemente, os resultados deste experimento impossibilitam uma inferência funcional para o gene AAEL010714. Embora haja a perspectiva de um refinamento da padronização da técnica e realização de replicatas experimentais, os altos níveis de transcrição deste gene e a localização tecidual no qual ocorre a transcrição constituem dificuldades para o silenciamento efetivo.

4.11 Teste do promotor putativo do gene AAEL010714 em linhagens transgênicas de *Aedes aegypti*

Com o objetivo de avaliar se a região a montante do gene AAEL010714 realmente possui função regulatória e se todos os elementos importantes para manutenção do perfil endógeno de transcrição com sexo e estágio-especificidade estão presentes nesta porção, foi elaborado um gene quimérico para teste *in vivo* do possível promotor através da obtenção de linhagens transgênicas de *Aedes aegypti*. Para isso, a ORF codificadora da proteína marcadora DsRED, que produz fluorescência vermelha, foi utilizada como gene repórter sob direção do fragmento de 1 kb a montante do gene AAEL010714. Uma construção com um fragmento de 2,5 kb a montante também foi idealizada inicialmente, porém a construção final não foi obtida para teste.

Para teste do promotor, o gene quimérico [Promotor1kb-DsRED] foi inserido no DNA do vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP], plasmídeo que contém as sequências invertidas do transposon *Mariner* (reconhecidas por transposase específica), e o gene marcador que expressa a proteína fluorescente verde (GFP) sob direção do promotor de olho 3xP3, para identificação da linhagem transformada.

O esquema da Figura 37 representa a hipótese a ser testada, uma vez que as linhagens transgênicas contendo em seu genoma o gene quimérico para teste do promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714 fossem geradas. Caso o promotor de 1 kb dirigisse a transcrição de DsRED da mesma maneira que no gene endógeno, o esperado seria observar a expressão de DSRED nos ovários 48 horas após o repasto sanguíneo das fêmeas transgênicas, o que resultaria em ovários com fluorescência vermelha.

Para teste desta hipótese, primeiramente foram executadas as etapas de construção do vetor de transformação e os resultados estão mostrados nos próximos itens, assim como os resultados dos experimentos de microinjeção.

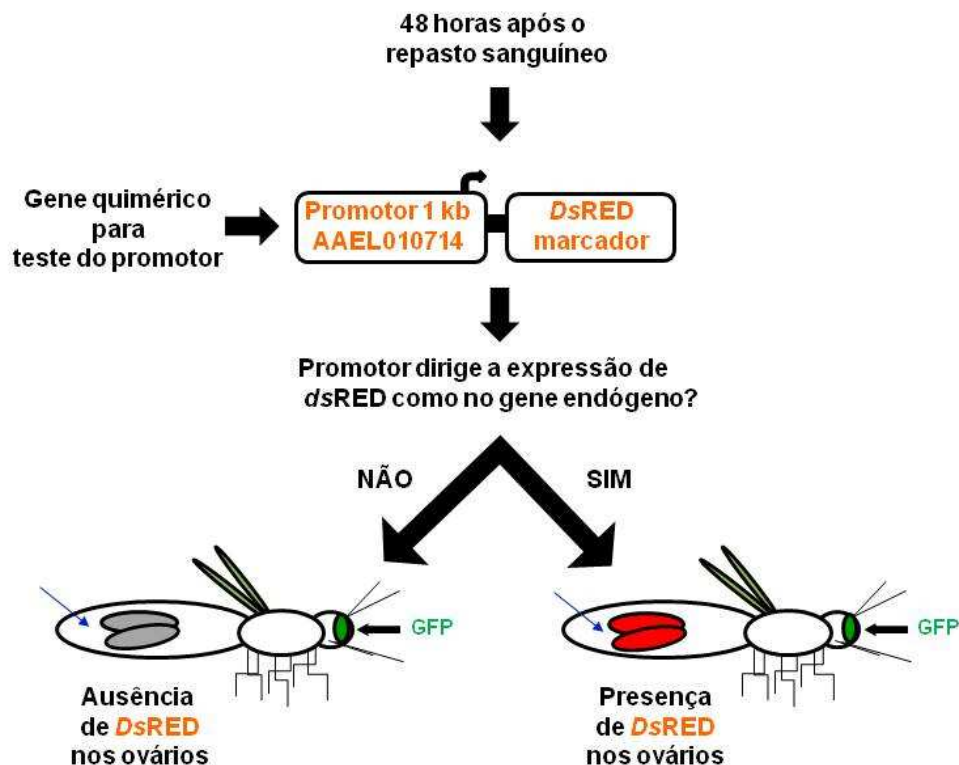


Figura 37 - Esquema para o teste da hipótese de funcionamento do possível promotor de 1 kb do gene AAEL010714 em linhagens transgênicas de *Aedes aegypti*. As setas azuis indicam os pares de ovários. O olho verde, fenótipo causado pela proteína GFP, indica a inserção do gene repórter juntamente com o gene quimérico [Promotor1kb-DsRED] no genoma do mosquito. Ovários com fenótipo vermelho simbolizam a expressão da proteína marcadora DsRED.

4.11.1 Clonagem do gene marcador DsRED no vetor de transformação pMos[3xP3-EGFP]

O esquema da Figura 38 resume as etapas de amplificação, clonagem e subclonagem para construção do vetor de transformação pMos[3xP3-EGFP-DsRED] para teste de promotor. Para isso, o gene repórter DsRED contendo a região 3'-UTR do vírus SV40 foi amplificado do DNA do plasmídeo pAn-Vg-DsRED, utilizando os iniciadores com sítios de restrição para a enzima de restrição *Ascl* (Tabela 4). O resultado da amplificação do fragmento de 942 pb está mostrado na Figura 39 A. O

fragmento amplificado foi purificado e clonado no DNA do vetor pCR[®] 2.1 (Figura 39 B) e o clone obtido foi sequenciado para confirmação de integridade.

Para subclonagem do fragmento do gene DsRED no DNA do vetor de transformação, o clone pCR[®] 2.1-DsRED foi digerido com a enzima *Ascl* (Figura 39 B), gerando um fragmento de ~3.9 kb referente ao vetor e um fragmento de 942 pb. O fragmento menor foi purificado e ligado no DNA do vetor *pMos*[3xP3-EGFP] previamente linearizado e desfosforilado com a enzima *Ascl*. O resultado da subclonagem está mostrado na Figura 39 C. A digestão do vetor *pMos*[3xP3-EGFP-DsRED] com *Ascl* gerou um fragmento de ~6 kb do vetor e outro fragmento de 942 pb do inserto DsRED. Após sequenciamento e confirmação da construção, o vetor *pMos*[3xP3-EGFP-DsRED] gerado foi utilizado para a inserção do promotor de 1 kb do gene AAEL010714.

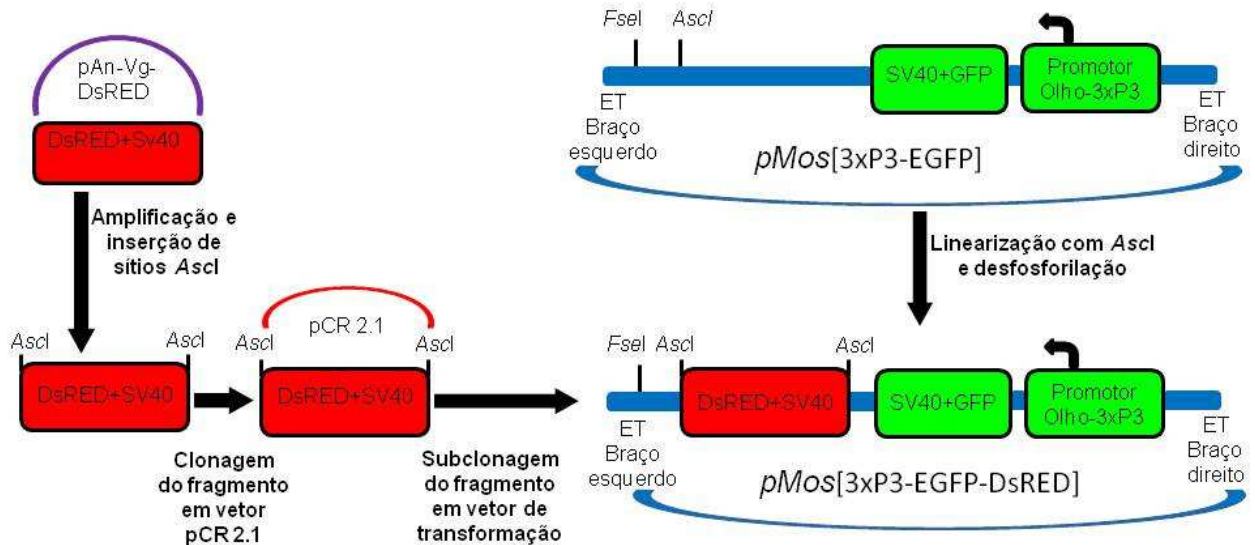


Figura 38 - Esquema das etapas de clonagem e subclonagem para construção do vetor de transformação para teste de promotor *pMos*[3xP3-EGFP-DsRED]. A construção foi obtida através da inserção do gene DsRED contendo a região 3'-UTR do vírus SV40.ET, seqüências invertidas do elemento de transposição *Mariner*.

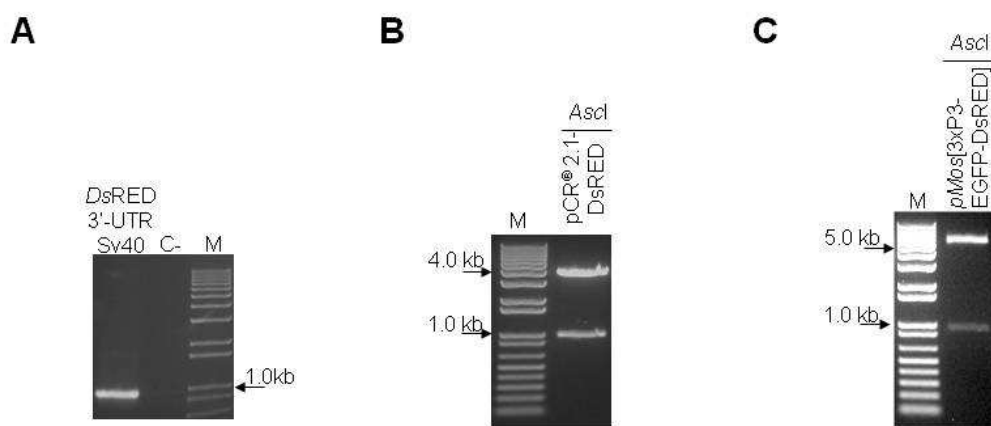


Figura 39 - Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do gene marcador DsRED contendo a região 3'-UTR do vírus SV40 e dos produtos de digestão de DNA dos plasmídeos pCR[®] 2.1-DsRED e *pMos*[3xP3-EGFP-DsRED], gerados nas etapas de clonagem e subclonagem do gene marcador. **A.** O produto de amplificação por PCR de 942 pb foi gerado usando o DNA do plasmídeo *pAn-Vg-DsRED* como molde, e iniciadores com sítios *Ascl* (Tabela 4). C-: controle negativo (reação sem molde de DNA de plasmídeo). **B.** O DNA do plasmídeo pCR[®] 2.1-DsRED, gerado pela clonagem do gene marcador foi digerido com a enzima de restrição *Ascl* para a liberação do inserto de 942 pb, o qual foi excisado, purificado e ligado no vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP]. **C.** O DNA do plasmídeo *pMos*[3xP3-EGFP-DsRED], gerado pela subclonagem do gene marcador foi digerido com a enzima de restrição *Ascl* para liberação do inserto de 942 pb, para conferência da subclonagem. O produto de amplificação em **A** e digestões em **B** e **C** foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

4.11.2 Clonagem do promotor putativo de 1 kb do gene *AAEL010714* no vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP-DsRED]

O esquema da Figura 40 resume as etapas de amplificação, clonagem e subclonagem do promotor de 1 kb do gene *AAEL010714* para construção do vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1 kb-DsRED] para teste do promotor putativo. O fragmento de 1 kb a montante do gene *AAEL010714* foi amplificado a partir de molde de DNA genômico de *Aedes aegypti*, utilizando os iniciadores com sítios de restrição para a enzima de restrição *FseI* (Tabela 4).

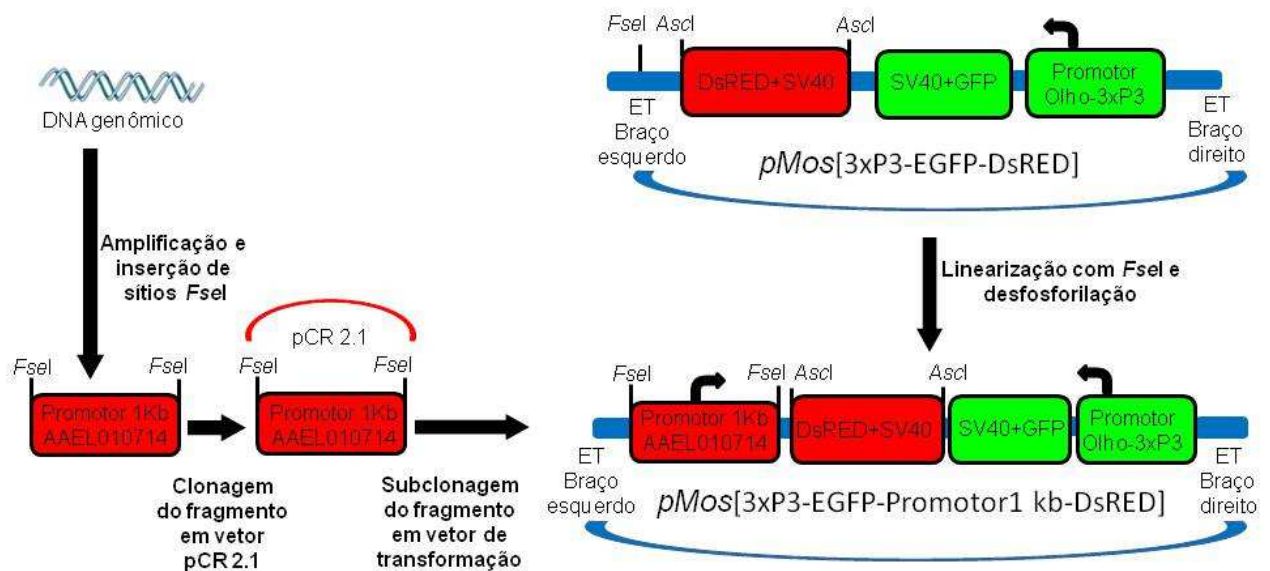


Figura 40 - Esquema das etapas de amplificação, clonagem e subclonagem para inserção do promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714 no vetor *pMos[3xP3-EGFP-DsRED]*, gerando o vetor de transformação *pMos[3xP3-EGFP- promotor1kb-DsRED]*. ET, sequências invertidas do elemento de transposição *Mariner*.

O resultado da amplificação está mostrado na Figura 41 A, onde um fragmento de 1022 pb é evidenciado. O fragmento amplificado foi purificado e clonado no DNA do vetor pCR[®] 2.1 e o resultado da clonagem está mostrado na (Figura 41 B). A digestão do vetor pCR[®] 2.1 –promotor 1 kb com a enzima de restrição *Fsel* gerou um fragmento de ~3.9 kb do vetor e outro fragmento de 1022 pb do promotor do gene AAEL010714. O clone obtido foi sequenciado para confirmação de integridade.

Para subclonagem, o fragmento de 1022 pb liberado pela digestão com *Fsel* do vetor pCR[®] 2.1 –promotor 1 kb (Figura 41 B), foi purificado e ligado no DNA do vetor *pMos[3xP3-EGFP-DsRED]*, previamente linearizado e desfosforilado com a enzima *Fsel*. O resultado da subclonagem está mostrado na Figura 41 C, onde o DNA do novo clone *pMos[3xP3-EGFP- promotor1kb-DsRED]* foi digerido com as enzimas *SacII*, *Ascl* e *Fsel*.

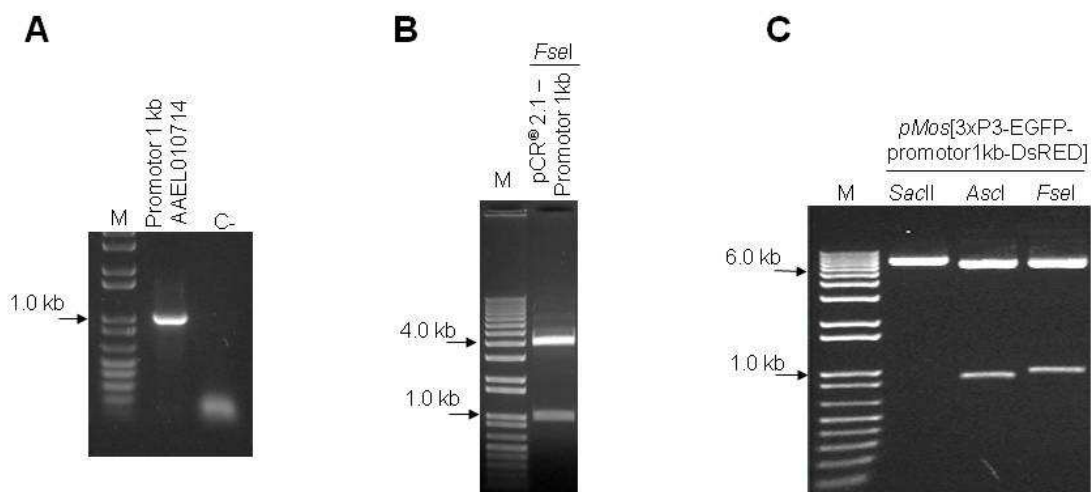


Figura 41 - Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714 e dos produtos de digestão do DNA dos plasmídeos pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb e *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED], gerados nas etapas de clonagem e subclonagem do promotor putativo. **A.** O produto de amplificação por PCR foi gerado usando DNA genômico como molde e iniciadores com sítios *FseI* (Tabela 4). C-: controle negativo (reação sem molde de DNA genômico). **B.** O DNA do plasmídeo pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb, gerado pela clonagem do fragmento de 1 kb do promotor putativo do gene AAEL010714 foi digerido com a enzima de restrição *FseI* para a liberação do inserto de ~1 kb, o qual foi excisado, purificado e ligado no vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP-DsRED]. **C** Para conferência da subclonagem, o DNA do plasmídeo *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED], gerado pela subclonagem do promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714, foi digerido com as enzimas de restrição *SacII*, *AsclI* e *FseI* para linearização do vetor, liberação do gene marcador DsRED e do promotor 1 kb, respectivamente. O produto de amplificação em **A** e digestões em **B** e **C** foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

A linearização do DNA de plasmídeo ocorre com digestão de *SacII* (devido à sítio único existente no iniciador-*F* usado na amplificação do promotor), e a banda única esperada de ~7.5 kb foi observada. A digestão com *AsclI* resulta em duas bandas, sendo que a menor de 942 pb confirma a inserção do gene marcador e a maior é referente ao vetor contendo o promotor de 1 kb, tendo tamanho aproximado de ~6,5 kb. Por último, duas bandas são observadas na digestão com *FseI*. A banda menor de 1022 pb confirma a subclonagem do promotor do gene AAEL010714 no DNA do vetor *pMos*[3xP3-EGFP-DsRED], gerando a construção final *pMos*[3xP3-EGFP-

promotor1kb-DsRED], e a banda maior de ~6,5 kb é resultante do vetor. Após sequenciamento e confirmação da construção, o vetor *pMos[3xP3-EGFP-promotor1kb-DsRED]* gerado foi utilizado para os experimentos de microinjeção e tentativa de obtenção da linhagem transgênica de *Aedes aegypti*.

4.11.3 Experimentos de microinjeção de ovos embrionados de *Aedes aegypti* com o vetor de transformação *pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]*

Com objetivo de caracterizar o promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714, os ovos embrionados foram injetados com solução de injeção contendo o DNA dos plasmídeos de transformação doador (*donor*) *pMos[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED]* e auxiliar (*helper*) *pKhsp82MOS*, que possui a ORF codificadora da transposase, de acordo com Material e Métodos (item 3.17.12). Ao todo, 4 experimentos de microinjeção foram realizados e os resultados estão demonstrados na Tabela 8. No total foram microinjetados 2667 ovos e 30,41% deles originaram larvas (G0) eclodidas. Em todos os experimentos, as famílias foram montadas através de cruzamentos de mosquitos adultos injetados com mosquitos selvagens de acordo com Material e Métodos (item 3.17.12), e as larvas originadas destes cruzamentos foram analisadas para presença de GFP nos olhos. Somando todos os experimentos, mais de 800.000 larvas F1 foram analisadas individualmente, porém nenhuma delas apresentou positividade para GFP nos olhos. Consequentemente, nenhuma linhagem transgênica foi gerada e a caracterização funcional do promotor, através do teste de hipótese da Figura 37, não foi obtida.

Tabela 8 - Resultado dos experimentos de microinjeção em ovos embrionados de *Aedes aegypti*.

Experimento	Construção microinjetada	Nº de ovos embrionados microinjetados	Nº de larvas GO obtidas (% de eclosão)	Nº aproximado de larvas F1 analisadas (busca de GFP nos olhos)	Larvas positivas (F1)
1	<i>pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]</i>	1043	242 (23,20)	216.960	0
2	<i>pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]</i>	892	292 (32,73)	348.000	0
3	<i>pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]</i>	308	140 (45,45)	170.400	0
4	<i>pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]</i>	424	86 (20,28)	153.600	0
Total	<i>pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]</i>	2667	760 (28%)	888.960	0

4.11.4 Detecção de eventos de recombinação no vetor de transformação *pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]*

O DNA do plasmídeo de transformação *pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]* inserido em bactérias da cepa DH10B, foi submetido à passagens sucessivas em meio de cultura líquido de bactérias, para replicação e purificação em larga escala, e obtenção de elevada concentração para microinjeção dos embriões.

Após a purificação em larga escala, o DNA do plasmídeo recuperado era submetido à análise por digestão através de enzimas de restrição, para conferência do padrão em mapa de restrição. O esquema da Figura 42 A mostra o plasmídeo *pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]* e os sítios de restrição por enzima presentes em sua sequência. Já a Figura 42 B apresenta o mapa de restrição do DNA do plasmídeo de transformação com padrão correto de digestão, conforme os tamanhos esperados de fragmentos para cada endonuclease de restrição utilizada. O padrão esperado (Figura 42 A) e observado (Figura 42 B) para o mapa de restrição do DNA do plasmídeo íntegro é o mesmo. Basicamente, a enzima de restrição *SacII* resulta na

linearização do DNA do plasmídeo, as enzimas *Ascl* e *Fsel* geram um fragmento de 942 pb e um de 1022 pb respectivamente, além do fragmento maior de ~6.5 kb referente ao vetor, a enzima *NotI* gera um fragmento maior de ~7 kb e um fragmento menor de 515 pb, e a enzima *HindIII* gera 5 fragmentos.

Porém, em algumas purificações em larga escala, a análise através de mapa de restrição não conferia com o padrão correto que é observado na Figura 42 B. Visando identificar o motivo da mudança de padrão do mapa de restrição, a solução de DNA de plasmídeo purificado com padrão incorreto, foi utilizada para retransformação em bactérias da cepa SURE (deficiente em genes de rearranjo de DNA). Três transformações foram realizadas com 100 ng e 1 ng e 1 pg (placas 100ng, 1 ng e 1 pg) de DNA de plasmídeo com padrão incorreto. Após plaqueamento e incubação, apenas a placa 1 pg não apresentou colônias. A placa 1 ng rendeu 30 colônias que tiveram o DNA de plasmídeos purificado. Os resultados dos mapas de restrição do DNA dos plasmídeos purificados mostraram que duas versões do vetor *pMos*[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED] (correta e incorreta) foram purificadas de colônias isoladas. O mapa de restrição da versão incorreta do vetor, denominada *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED] recombinante está mostrado na (Figura 42 C), na qual as digestões com as enzimas *Ascl*, *NotI* e *HindIII* apresentam um padrão de bandas diferente da Figura 42 B).

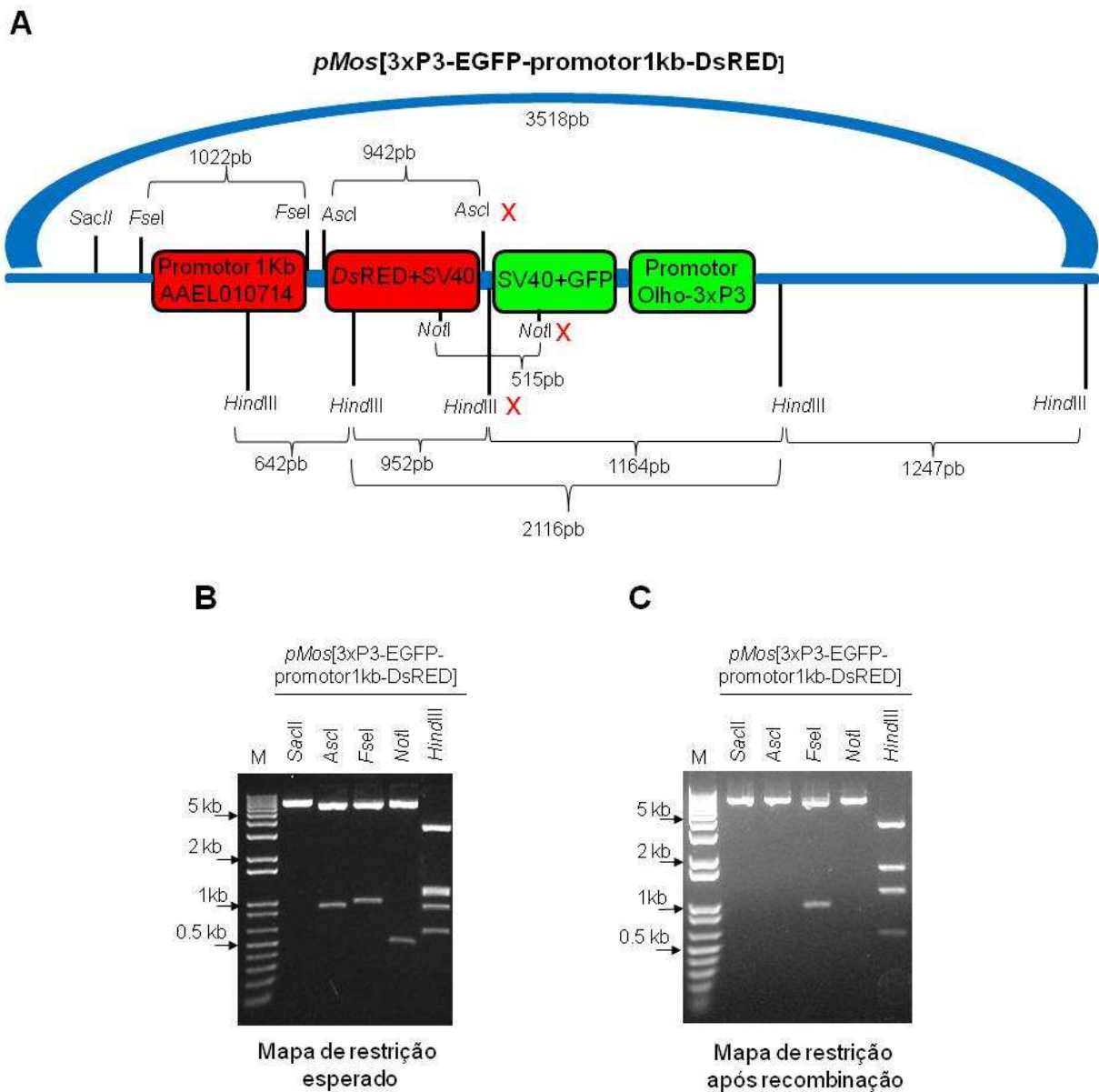


Figura 42 - Representação esquemática do vetor de transformação *pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb - DsRED]* e eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão do DNA de plasmídeo *pMos[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED]* antes e após recombinação, para obtenção de mapa de restrição. **A**. O esquema mostra os sítios de restrição, os tamanhos esperados dos fragmentos gerados pelas digestões para obtenção de mapa de restrição e sítios de restrição ausentes após eventos de recombinação. **B**. O DNA do plasmídeo *pMos[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED]* foi digerido com as enzimas de restrição *SacII*, *Ascl* e *FseI*, *NotI* e *HindIII*. **C**. O DNA do plasmídeo *pMos[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED]* recombinante foi digerido com as enzimas de restrição *SacII*, *Ascl* e *FseI*, *NotI* e *HindIII*. Um padrão diferente de bandas é observado entre os géis em **B** e **C**. O produto de amplificação em **A** e digestões em **B** e **C** foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

A comparação dos mapas de restrição das formas íntegra e recombinante do DNA de plasmídeo e os tamanhos obtidos dos fragmentos na (Figura 42 C) após digestão com as enzimas *Ascl*, *NotI* e *HindIII*, auxiliaram na identificação dos sítios de restrição que são perdidos durante a recombinação, pela excisão de um fragmento. Os sítios de restrição removidos estão marcados ao lado com um X vermelho (Figura 42 A). A deleção do sítio *Ascl* resulta na linearização do DNA do plasmídeo e não liberação de um fragmento de 942 pb, a deleção de um sítio de *NotI* gera também apenas linearização, não havendo liberação de um inserto de 515 pb e a deleção do sítio indicado de *HindIII* resulta em 4 bandas, sendo uma delas de ~2.1 kb (Figura 42 C).

O evento de recombinação ocorre na região do plasmídeo em que os genes marcadores estão clonados em orientação cauda 3'-UTR cauda 3-UTR (cauda-cauda), e as duas sequências de terminação dos dois genes marcadores (3'-UTR do vírus SV40) estão em orientação invertida (constituindo uma repetição invertida de sequências homólogas), o que facilita a ocorrência de recombinação.

Embora a versão correta do vetor *pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]* tenha sido isolada e o motivo de diferentes padrões em mapas de restrição ter sido detectado, este mesmo evento de recombinação pode ocorrer nos embriões microinjetados. Desta forma, a perda da região 3'-UTR dos genes marcadores poderia acarretar em uma falha de produção das proteínas marcadoras de forma adequada, impossibilitando a detecção das larvas transformantes.

4.11.5 Construção de um novo vetor de transformação *pMos[3xP3-EGFP-Promotor1kb-DsRED]* para microinjeção de ovos embrionados de *Aedes aegypti*

Para evitar a recombinação das regiões 3'-UTR dos genes marcadores, um novo vetor de transformação para teste do promotor de AAEL010714 foi construído e o esquema da Figura 43 resume as etapas de amplificação, clonagem e subclonagem. No esquema, os genes marcadores DsRED e GFP estão orientados em posição cauda-cabeça (cauda 3'-UTR do gene GFP voltada ao início (cabeça) do promotor 1 kb do gene AAEL010714).

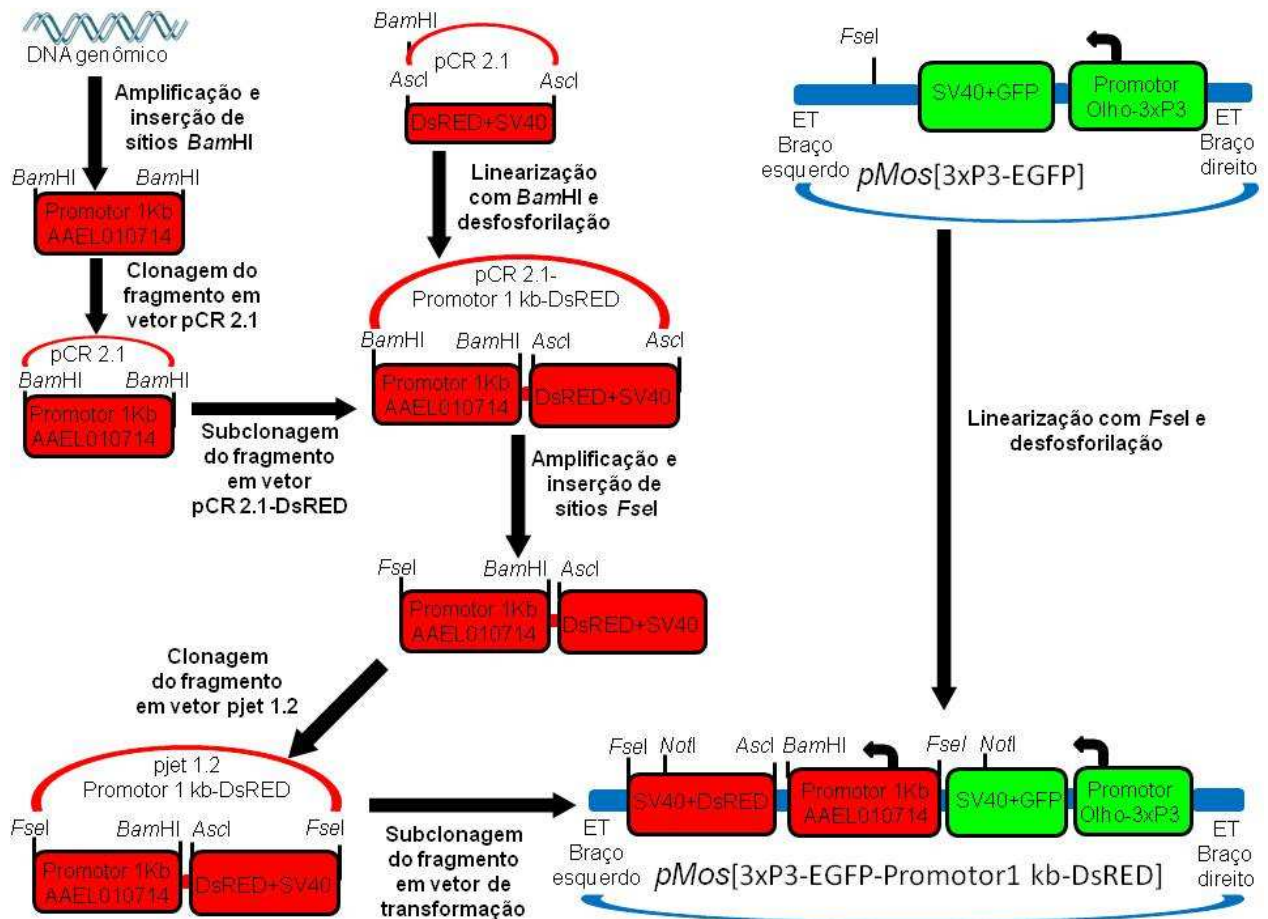


Figura 43 - Esquema das etapas de amplificação, clonagem e subclonagem para inserção do gene quimérico [promotor 1kb AAEL010714-DsRED] no DNA do vetor *pMos*[3xP3-EGFP], gerando o vetor de transformação *pMos*[3xP3-EGFP- promotor1kb-DsRED] em nova orientação cabeça-cauda.

Para obtenção da nova construção, o fragmento de 1 kb a montante do gene AAEL010714 foi amplificado a partir de molde de DNA genômico de *Aedes aegypti*, utilizando os iniciadores com sítios de restrição para a enzima de restrição *Bam*HI (Tabela 4). O resultado da amplificação está mostrado na Figura 44 A, onde um

fragmento de 1012 pb é evidenciado. O fragmento amplificado foi purificado e clonado no DNA do vetor pCR[®] 2.1 e o resultado da clonagem está mostrado na (Figura 44 B). A digestão do DNA do vetor pCR[®] 2.1 –promotor 1 kb com a enzima de restrição *Bam*HI gerou um fragmento de ~3.9 kb do vetor e outro fragmento de 1012 pb do promotor do gene AAEL010714. O clone obtido foi sequenciado para confirmação de integridade.

Para subclonagem, o fragmento de 1012 pb liberado pela digestão com *Bam*HI do DNA do vetor pCR[®] 2.1 –promotor 1 kb (Figura 44 B), foi purificado e ligado no DNA do vetor pCR[®] 2.1-DsRED previamente linearizado e desfosforilado com a enzima *Bam*HI. O resultado da subclonagem (Figura 44 B), mostra o DNA do novo clone pCR[®] 2.1-promotor 1k-DsRED digerido com a enzima *Bam*HI, gerando 1 banda menor de 1012 pb do promotor e outra de ~5 kb referente ao DNA do plasmídeo. O clone obtido foi sequenciado para confirmação de integridade e orientação do promotor.

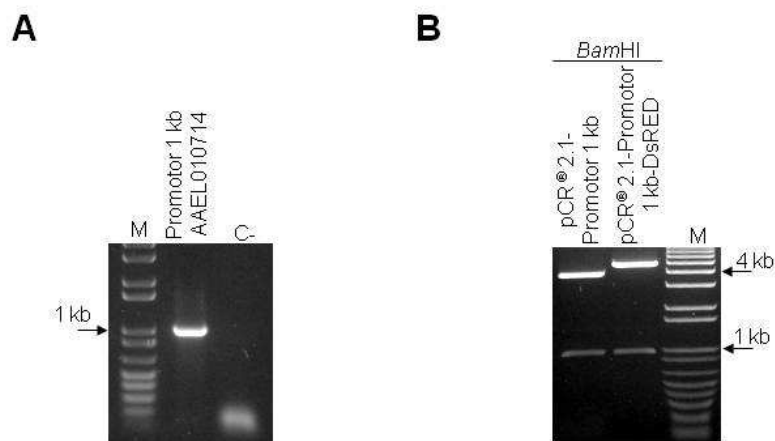


Figura 44 - Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do promotor putativo de 1 kb do gene AAEL010714 e dos produtos de digestão do DNA dos plasmídeos pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb e pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb-DsRED. **A.** O produto de amplificação por PCR foi gerado usando DNA genômico como molde e iniciadores com sítios *Bam*HI (Tabela 4). C-: controle negativo (reação sem molde de DNA genômico). **B.** O DNA do plasmídeo pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb, gerado pela clonagem do fragmento de 1 kb do promotor putativo do gene AAEL010714 foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI para a liberação do inserto de ~1 kb. O fragmento foi excisado, purificado e ligado no vetor de pCR[®] 2.1-DsRED. O DNA do plasmídeo pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb-DsRED foi digerido com *Bam*HI para conferência da subclonagem. O produto de amplificação em **A** e digestões em **B** foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

Então o gene [Promotor 1kb- DsRED] com tamanho de 1992 pb foi amplificado com iniciadores contendo sítio *FseI* (Tabela 4) a partir do molde de plasmídeo pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb-DsRED e o fragmento amplificado foi purificado e clonado no DNA do vetor pjet 1.2 (Figura 45 A). O DNA do clone gerado, pjet 1.2-Promotor 1 kb-DsRED, foi digerido com *FseI*, e duas bandas foram evidenciadas sendo uma de 1992 pb referente ao gene [Promotor 1kb- DsRED] e outra do vetor pjet 1.2 (~3 kb) (Figura 45 A), e em seguida foi sequenciado para confirmação. O fragmento com o gene [Promotor 1kb- DsRED] de 1992 pb liberado pela digestão com *FseI* do vetor pjet 1.2-Promotor 1 kb-DsRED (Figura 45 A), foi purificado e ligado no DNA do vetor *pMos*[3xP3-EGFP] previamente linearizado e desfosforilado com a enzima *FseI*.

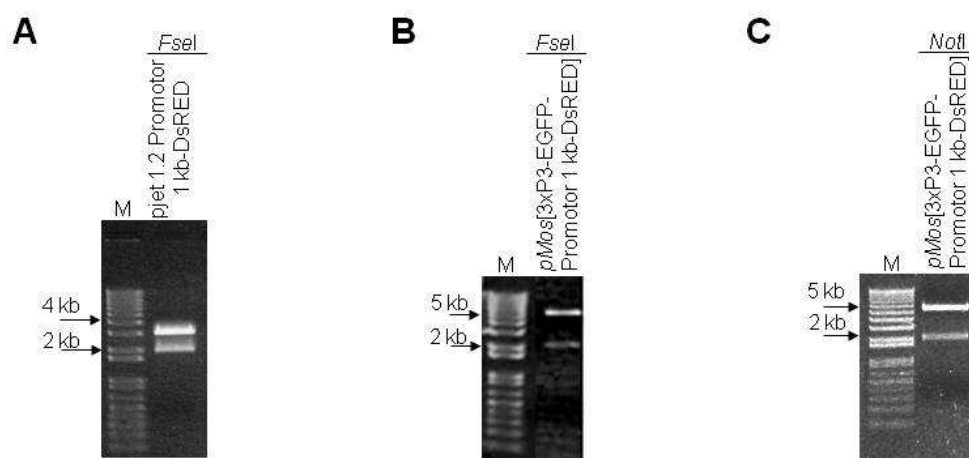


Figura 45 - Eletroforese em gel pjet 1.2-Promotor 1 kb-DsRED e *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED] com nova orientação, gerados nas etapas de clonagem e subclonagem. **A**. Após amplificação do gene [Promotor 1kb- DsRED] de ~2 kb com iniciadores contendo sítio *FseI* (Tabela 4) a partir do molde de DNA de plasmídeo pCR[®] 2.1-Promotor 1 kb-DsRED, o fragmento amplificado foi purificado e clonado em vetor pjet 1.2. O clone gerado, pjet 1.2-Promotor 1 kb-DsRED, foi digerido com *FseI* para conferência da subclonagem. **B** Para conferência da subclonagem, o DNA do plasmídeo *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED], gerado pela subclonagem do gene [Promotor 1kb- DsRED] foi digerido com a enzima de restrição e *FseI* para conferência da subclonagem. **C**. O DNA do plasmídeo *pMos*[3xP3-EGFP-promotor 1kb-DsRED] foi digerido com a enzima *NotI*, e o inserto liberado de aproximadamente 2 kb indica a nova orientação (cabeça-cauda) do gene. Os produtos das digestões em **A**, **B** e **C** foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo. M: Marcador molecular de pares de bases 1kb plus (Invitrogen).

O resultado da subclonagem está mostrado na Figura 45 B, onde o DNA do novo clone *pMos[3xP3-EGFP- promotor1kb-DsRED]* foi digerido com a enzimas *FseI*, o que resulta em duas bandas, sendo que a menor de ~2 kb confirma a inserção do gene [Promotor 1kb- DsRED] e a maior é referente ao vetor com tamanho aproximado de ~6 kb (Figura 45 B)

Para conferência da orientação, o DNA do plasmídeo *pMos[3xP3-EGFP- promotor1kb-DsRED]* foi digerido com a enzima *NotI* (esquema Figura 44 e Figura 45 C). O fragmento visualizado de ~2 kb confirma a orientação correta da inserção do gene [Promotor 1kb- DsRED] em relação ao gene GFP. O DNA do plasmídeo de transformação foi sequenciado para confirmação da integridade e o novo plasmídeo *pMos[3xP3-EGFP- promotor1kb-DsRED]* com orientação cauda-cabeça foi gerado. Este vetor está à disposição do nosso grupo de pesquisa para o teste do promotor, após obtenção da linhagem transgênica.

5 DISCUSSÃO

Aprofundar o conhecimento em nível molecular acerca da biologia básica de mosquitos vetores é fundamental para elucidação dos principais processos fisiológicos envolvidos no ciclo de vida destes organismos e também é ponto indispensável para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de controle (MEGY et al., 2009; WATERHOUSE; WYDER; ZDOBNOV, 2008). Recentemente, este desafio tornou-se mais acessível com a disponibilidade de informação genômica, tecnologia de transgênese e técnicas de genética reversa as quais foram aprimoradas e são aplicadas em *Aedes aegypti* e outros mosquitos da família Culicidae (CHEN; MATHUR; JAMES, 2008). Por outro lado, para realmente contribuir na caracterização da função de genes e para auxiliar na descrição dos processos moleculares que ocorrem nos mosquitos, estes novos dados e técnicas disponíveis precisam ser explorados em uma abordagem evolutiva, de forma sistemática, empírica, interdisciplinar e comparativa.

Neste aspecto, o conhecimento da biologia básica de *Aedes aegypti*, vetor principal dos sorotipos do vírus dengue e do vírus da febre amarela, tem provado estes progressos pós-genômicos e tecnológicos, uma vez que novas abordagens moleculares estão sendo demonstradas em publicações recentes envolvendo esta espécie, amplamente utilizada como organismo modelo. Por exemplo, Isoe, Zamora e Miesfeld (2008), usando o algoritmo blastn para buscas em banco de dados e estratégias de bioinformática, detectaram 18 novos genes de *Aedes aegypti* que codificam para carboxipeptidases em adição a genes de enzimas digestivas identificados anteriormente por técnicas moleculares convencionais. Neste mesmo sentido, Zhou et al. (2008) elaboraram um algoritmo caseiro para buscas de motivos em banco de dados (*in house MotifSearch algorithm*) para identificar genes que codificam para proteínas ligadoras de odor (*odorant binding proteins, OBPs*) putativas no genoma de *Aedes aegypti*. Esta análise forneceu 66 genes potencialmente codificantes para proteínas ligadoras de odor, mas os autores sugerem estudos futuros que foquem a identificação dos produtos gênicos e funções das proteínas expressas por estes genes putativos, sendo o refinamento da caracterização um passo imprescindível para obtenção de informação fisiológica relevante à compreensão da biologia molecular da quimiorrecepção de mosquitos.

O campo da fisiologia reprodutiva de *Aedes aegypti* também tem sido explorado através da aplicação de abordagens de bioinformática comparativa e buscas em bancos de dados contendo informação genômica deste mosquito e de outras espécies de insetos dípteros evolutivamente relacionadas. Em trabalhos visando o desenvolvimento de *gene drive mechanisms* (JAMES, 2005) para rápida fixação de alelos em populações, Juhn e James (2006) identificaram o gene *oskar* de *Aedes aegypti*, baseados em padrões de expressão de genes envolvidos na embriogênese de *Drosophila melanogaster*. A estratégia de busca em bancos de dados de expressão utilizada neste estudo mostra a grande utilidade de pré-seleções *in silico* iniciais para identificação de genes ortólogos entre espécies de insetos que possuem seus respectivos genomas sequenciados e banco de dados de perfis de expressão de genes disponível para ser explorado com o uso de ferramentas de busca como filtros específicos.

Neste contexto, o presente estudo utilizou análises *in silico* preliminares e comparativas para identificação de genes envolvidos na fisiologia reprodutiva de *Aedes aegypti*. Para isso, uma varredura *in silico* de genes de *Anopheles gambiae* com expressão restrita 48 horas após o repasto foi conduzida através do banco de perfis de expressão gênica (angaGEDUCI; <http://www.angaged.bio.uci.edu>) (DISSANAYAKE et al., 2006). Usando as sequências de genes tardios de *Anopheles gambiae*, e através de buscas por similaridade em *ESTs* disponíveis de *Aedes aegypti*, 6 genes candidatos foram identificados. A obtenção dos perfis de transcrição destes genes de *Aedes aegypti* mostrou que a estratégia comparativa inicial foi eficiente, uma vez que os transcritos respectivos apresentam um forte acúmulo de transcrição em fêmeas 48 horas após o repasto. Além disso, a caracterização tecidual de 3 genes que são transcritos em ovários das fêmeas pós-vitelogênicas de maneira regulada pela ingestão de sangue, sugere uma função reprodutiva dos produtos gênicos no período de expressão determinado.

Assim, o presente trabalho foi o primeiro a caracterizar o perfil de transcrição dos 6 genes de forma semiquantitativa por RT-PCR, muito embora no projeto genoma de *Aedes aegypti*, Nene et al. (2007), usando 3 diferentes plataformas de perfis de transcritos mostrou evidências transcricionais para 5 dos 6 genes vitelogênicos tardios

(AAEL000377, AAEL000846, AAEL003525, AAEL009599 e AAEL011238). Estes transcritos foram detectados em pelo menos 1 das 3 plataformas de bioinformática analisadas. Entretanto, evidência transcricional somente foi identificada para o gene AAEL000377 nas 3 plataformas e o gene AAEL010714 não foi identificado em nenhuma das 3 plataformas usadas para confirmar experimentalmente os modelos de predição de genes codificantes para proteínas (NENE et al., 2007). Estes dados reforçam os baixos níveis de transcrição mostrados em nossos perfis de temporais obtidos para estes genes em alguns estágios de desenvolvimento do mosquito, com nenhum nível detectável de expressão em alguns pontos amostrais e com transcrição forte e restrita entre 48 e 72 horas após o repasto.

No final do ano de 2010, Dissanayake et al. (2010) publicaram a análise das mudanças globais de transcrição dos genes de *Aedes aegypti* em fêmeas antes e após o repasto sanguíneo e disponibilizaram um banco público para consulta dos dados obtidos pelos ensaios de microarranjo. A busca pelos 6 genes candidatos estudados no presente estudo foi então efetuada no banco de dados de perfis de expressão de *Aedes aegypti*. Embora o banco não tenha dados para estágios imaturos de desenvolvimento do mosquito (larvas e pupas), os quais nós detectamos baixos níveis de transcrição para alguns genes, os perfis de transcrição disponibilizados no banco são consistentes com os resultados obtidos em nossos experimentos de RT-PCR, sendo que os genes são transcritos tardiamente no ciclo gonotrófico e apresentam acúmulo de transcrição restrito 48 horas após o repasto (resultados não mostrados). Obviamente, as técnicas e métodos de análise são diferentes nos dois estudos, porém a coincidência dos perfis obtidos confirma nossos resultados e suporta de forma robusta a caracterização dos genes como tardios, ativados fortemente na fase de término do período vitelogênico de *Aedes aegypti*.

Os genes AAEL009599 e AAEL010714 foram recentemente preditos como codificadores para proteínas ligadoras de odor (OBPs) atípicas através de análises de biocomputação e os genes foram anotados respectivamente como AegOBP41 e AegOBP45 (ZHOU et al., 2008). Embora nosso objetivo inicial não fosse identificar este grupo de genes, a estratégia de busca definida inicialmente na seleção *in silico* levou à identificação destes dois representantes desta família multigênica.

Proteínas ligadoras de odor (*odorant-binding proteins* - OBPs), primeiramente descritas em Vogt e Riddiford (1981), formam uma família multigênica presente em uma gama enorme de espécies de insetos (PELOSI; CALVELLO; BAN, 2005; PELOSI et al., 2006) e evidências experimentais mostraram que estas proteínas estão envolvidas em quimiorrecepção (XU et al., 2005; MATSUO et al., 2007), mas outros trabalhos sugerem funções adicionais (PELOSI; CALVELLO; BAN, 2005; PELOSI et al., 2006; LI et al., 2008; ARMBRUSTER et al., 2009; PELLETIER e LEAL, 2009). Muitos subgrupos distintos de OBPs têm sido identificados em Diptera (VOGT, 2002; HEKMAT-SCAFE et al., 2002; XU et al., 2003; ZHOU et al., 2004; LI et al., 2005; ZHOU et al., 2008; ARMBRUSTER et al., 2009) e genes que codificam para OBPs clássicas e OBPs Plus-C foram anotados em *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Mais recentemente, OBPs clássicas também foram anotadas em *Culex quinquefasciatus* (PELLETIER e LEAL, 2009). Entretanto, genes codificantes para OBPs atípicas estão ausentes no genoma de *Drosophila melanogaster* e muitos estudos sugerem fortemente que este grupo atípico seja único em espécies de mosquitos (XU et al., 2003; LI et al., 2005; ZHOU et al., 2008; ARMBRUSTER et al., 2009). Relações filogenéticas de OBPs atípicas de dípteros (*Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*) já anotadas mostraram que AAEL009599 (AegOBP41) é uma única proteína predita em um ramo monofilético e AAEL010714 (AegOBP45) é uma proteína predita que compõe um grupo monofilético de 6 outras OBPs atípicas de *Aedes aegypti*, formando um clado de expansão gênica (ZHOU et al., 2008).

Zhou et al. (2008) anotaram 15 OBPs atípicas no genoma de *Aedes aegypti*, mas os autores não caracterizaram os perfis de transcrição destes genes. Portanto, o presente trabalho é o primeiro a descrever os perfis transcricionais de 2 proteínas ligadoras de odor atípicas putativas de *Aedes aegypti* (AegOBPs) e também a fornecer a primeira localização *in situ* de um transcrito codificante para uma OBP atípica.

Na família Culicidae, apenas dois trabalhos caracterizaram a expressão de OBPs atípicas. Em *Anopheles gambiae*, Xu et al. (2003) mostraram que muitas destas OBPs atípicas são transcritas em órgãos de quimiorrecepção em adultos e também em estágios aquáticos imaturos, e uma função quimiosensitiva aquática ou não durante estágios de desenvolvimento pré-adultos foi proposta para estas proteínas. O segundo

trabalho foi feito em *Aedes albopictus* e Armbruster et al. (2009) demonstraram que duas OBPs atípicas são expressas em estágios pré-adulto e na hemolinfa de adultos, e uma terceira OBP atípica é expressa exclusivamente nas antenas e pernas. Além de funções quimiorreceptoras, o transporte de ligantes hidrofóbicos na hemolinfa é sugerido para as OBPs atípicas de *Aedes albopictus*.

Os experimentos de hibridização *in situ* revelaram a interessante localização polarizada do RNAm de AAEL010714 em determinadas células foliculares epiteliais que revestem os folículos ovarianos dissecados 48 horas após o repasto. Embora as células foliculares desempenhem diversas funções secretórias ao longo do processo de maturação dos ovos, estas células são responsáveis pela produção e secreção das proteínas formadoras da casca dos ovos (córion) ao final do ciclo gonotrófico (CLEMENTS, 1992; CHAPMAN, 1998).

Em *Aedes aegypti*, os 3 principais genes que codificam para as proteínas formadoras de córion, (15a-1, 15a-2 e 15a-3) já foram caracterizados e apresentam picos de transcrição entre 30 a 45 horas após o repasto sanguíneo (EDWARDS; SEVERSON; HAGEDORN, 1998). Os respectivos transcritos destes genes também foram localizados nas células foliculares e possuem uma distribuição não uniforme no epitélio folicular (EDWARDS; SEVERSON; HAGEDORN, 1998). Ademais, as proteínas majoritárias do córion de *Aedes aegypti*, codificadas pelos genes 15a-1, 15a-2 e 15a-3 também foram identificadas e os autores sugeriram que as 3 proteínas constituem 70% do total das proteínas formadoras do endochorion (LI e LI, 2006), a camada mais interna da casca dos ovos (VALLE et al., 1999). Porém, a composição total do córion de *Aedes aegypti* ainda não foi elucidada e as proteínas minoritárias permanecem desconhecidas. Consequentemente, o resultado da hibridização *in situ* do RNA de AAEL010714 sugere um envolvimento da proteína codificada em mecanismos responsáveis pela maturação do oócito, como por exemplo, formação da casca do ovo.

Algumas células foliculares também produzem ligantes importantes para a determinação do eixo dorso-ventral dos embriões de insetos (CHAPMAN, 1998). No entanto, a sequência de aminoácidos da proteína traduzida teoricamente a partir do RNAm completo de AAEL010714 não apresenta nenhuma similaridade com proteínas envolvidas na embriogênese de *Drosophila melanogaster* já descritas. Além disso,

buscas em banco de perfis de localização *in situ* de transcritos de *Drosophila melanogaster*, não revelaram transcritos que mostrem um perfil similar de distribuição nas células foliculares epiteliais (resultados não mostrados).

Com a sequência de aminoácidos da proteína AAEL010714 traduzida teoricamente foram realizadas análises de similaridade utilizando o algoritmo blastp contra o banco de proteínas de *Drosophila melanogaster*. Nesta análise, apenas uma proteína foi identificada, anotada como OBP99a, porém com baixa identidade (24,2%) à proteína AAEL010714 de *Aedes aegypti*. A OBP99a de *Drosophila melanogaster* é transcrita em órgãos sensoriais de larvas e adultos (GALINDO e SMITH, 2001), ao contrário do gene AAEL010714, que é altamente expresso em ovários 48 horas após o repasto.

Diferentemente do gene da OBP99a de *Drosophila melanogaster*, que sofre alterações de acúmulo de transcrição após a cópula das fêmeas (DALTON et al., 2010; MCGRAW; CLARK; WOLFNER, 2008), nossos resultados indicam que não há variação dos níveis de transcrição do gene AAEL010714 mediante à cópula em relação à fêmeas não copuladas. Em busca de variações de expressão gênica após a cópula de *Anopheles gambiae*, Rogers et al. (2008) não identificaram genes transcritos em ovários de fêmeas que sofrem alguma variação em relação à fêmeas não copuladas, embora em outros tecidos esta resposta de transcrição mediante a fertilização tenha sido caracterizada.

O acúmulo de transcritos do gene AAEL010714 também não variou entre mosquitos *Aedes aegypti* sadios ou infectados por *Plasmodium gallinaceum*, e embora a literatura já tenha mostrado que as células foliculares ovarianas sofrem apoptose nas fêmeas do gênero *Anopheles* mediante infecção por *Plasmodium* (AHMED e HURD, 2006; HOPWOOD et al., 2001; HURD; GRANT; ARAMBAGE, 2006), fato que corroboraria com a hipótese de diminuição ou alteração de transcrição do gene AAEL010714, o mesmo processo de morte celular programada ainda não foi demonstrado em *Aedes aegypti*, sendo que um projeto está em andamento em nosso laboratório para esclarecer esta lacuna.

Os experimentos de RACE resultaram na obtenção da sequência completa do cDNA de AAEL010714 e a tradução teórica da ORF identificada resulta em uma

proteína com um C-terminal mais longo em relação à proteína AAEL010714-PA (*atypical* AegOBP45) (ZHOU et al., 2008) anotada no VectorBase. Este resultado nos levou a nomear AegOBP45B atípica para a sequência de proteína originada pela tradução da ORF completa. A comparação por alinhamento do cDNA completo da proteína AegOBP45B com o supercontig 1500 genômico depositado no VectorBase (nonde o gene AAEL010714 está anotado) mostrou que o intron anotado no banco não é processado *in vivo*. Embora algoritmos de predição gênica forneçam informações extremamente úteis para anotação dos genes presentes em genomas sequenciados, a confirmação experimental destas predições é fundamental para a confirmação funcional dos transcritos e produtos codificados.

Nós demonstramos evidências que a proteína atípica AegOBP45B está sendo sintetizada nos ovários. Recentemente, Amenia et al. (2010) identificaram que 7 proteínas ligadoras de odor de *Anopheles gambiae* estão associadas com a casca do ovo (córion), e 4 delas possuem expressão restrita 48 horas após o repasto sanguíneo desta espécie. Embora a validação da função da proteína atípica AegOBP45B seja essencial, uma hipótese é que haja um envolvimento desta proteína na composição do córion de *Aedes aegypti*. Até onde sabemos, o presente estudo relata a primeira caracterização molecular dos produtos de expressão de um gene que codifica para uma OBP atípica de *Aedes aegypti*.

6 CONCLUSÕES

A estratégia comparativa de busca *in silico*, delineada no início do projeto forneceu um método eficiente para identificação de genes expressos tardiamente no ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti*. Seis genes foram identificados e exibem elevada transcrição 48 horas após o repasto sanguíneo. Três genes são ativados especificamente em fêmeas, com altos níveis de transcrição em ovários 48 horas após o repasto. Este trabalho também reportou a primeira caracterização molecular de uma proteína ligadora de odor (OBP) atípica de *Aedes aegypti*, através da obtenção da sequência completa do transcrito, da descrição do perfil de transcrição e da localização do RNAm. Além disso, foi demonstrada forte evidência da expressão desta proteína nos ovários durante a fase de término do período vitelogênico de *Aedes aegypti*. Embora estudos ainda sejam necessários para confirmação, o presente trabalho sugere que esta OBP atípica possa ter alguma função na formação da casca dos ovos (córion) de *Aedes aegypti*. Por fim, estes resultados fornecem uma grande contribuição para a compreensão molecular dos mecanismos reprodutivos básicos desta espécie, sobretudo durante o processo de vitelogênese, fundamental para a manutenção do ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

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, n. 1, p. 1-10, 2002.

AHMED, A. M.; HURD, H. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 2, p. 308-315, 2006.

ALPHEY, L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 10, p. 1243-1247, 2002.

ALPHEY, L.; ANDREASEN, M. Dominant lethality and insect population control. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 121, n. 2, 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 Zoonotic Dis.**, v. 10, n. 3, p. 295-311, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVARENGA, P. H. **Estudo dos mecanismos de ligação de heme à matriz peritrófica de *Aedes aegypti***. 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

AMENYA, D. A.; CHOW, W.; LI, J.; YAN, G.; GERSHON, P. D.; JAMES, A. A.; MARINOTTI, O. Proteomics reveals novel components of the *Anopheles gambiae* eggshell. **J. Insect. Physiol.**, v. 56, n. 10, p. 1414-1419, 2010.

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, n. 2, p. 265-273, 2011.

¹ De acordo com:

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

ARENSBURGER, P.; MEGY, K.; WATERHOUSE, R. M.; ABRUDAN, J.; AMEDEO, P.; ANTELO, B.; BARTHOLOMAY, L.; BIDWELL, S.; CALER, E.; CAMARA, F.; CAMPBELL, C. L.; CAMPBELL, K. S.; CASOLA, C.; CASTRO, M. T.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHAPMAN, S. B.; CHRISTLEY, S.; COSTAS, J.; EISENSTADT, E.; FESCHOTTE, C.; FRASER-LIGGETT, C.; GUIGO, R.; HAAS, B.; HAMMOND, M.; HANSSON, B. S.; HEMINGWAY, J.; HILL, S. R.; HOWARTH, C.; IGNELL, R.; KENNEDY, R. C.; KODIRA, C. D.; LOBO, N. F.; MAO, C.; MAYHEW, G.; MICHEL, K.; MORI, A.; LIU, N.; NAVEIRA, H.; NENE, V.; NGUYEN, N.; PEARSON, M. D.; PRITHAM, E. J.; PUIU, D.; QI, Y.; RANSON, H.; RIBEIRO, J. M.; ROBERSTON, H. M.; SEVERSON, D. W.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STRAUSBERG, R. L.; SUN, C.; SUTTON, G.; TU, Z. J.; TUBIO, J. M.; UNGER, M. F.; VANLANDINGHAM, D. L.; VILELLA, A. J.; WHITE, O.; WHITE, J. R.; WONDJI, C. S.; WORTMAN, J.; ZDOBNOV, E. M.; BIRREN, B.; CHRISTENSEN, B. M.; COLLINS, F. H.; CORNEL, A.; DIMOPOULOS, G.; HANNICK, L. I.; HIGGS, S.; LANZARO, G. C.; LAWSON, D.; LEE, N. H.; MUSKAVITCH, M. A.; RAIKHEL, A. S.; ATKINSON, P. W. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. **Science**, v. 330, n. 6000, p. 86-88, 2010.

ARMBRUSTER, P.; WHITE, S.; DZUNDZA, J.; CRAWFORD, J.; ZHAO, X. Identification of genes encoding atypical odorant-binding proteins in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 46, n. 2, p. 271-280, 2009.

ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; SHIAO, S. H.; RAIKHEL, A. S. Identification of two cationic amino acid transporters required for nutritional signaling during mosquito reproduction. **J. Exp. Biol.**, v. 209, pt. 16, p. 3071-3078, 2006.

ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, n. 7, p. 661-675, 2005.

ATTARDO, G. M.; D'AMICO, V. **Key Point Graphics**. 2011. Disponível em: <http://www.keypointgraphics.com/portfolio/pf_blood_meal_activation.jpg>. Acesso em: 10 fev. 2011.

BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 209-229, 2007.

BESANSKY, N. J.; COLLINS, F. H. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. **Parasitol Today**, v. 8, n. 6, p. 186-192, 1992.

BOISSON, B.; JACQUES, J. C.; CHOUMET, V.; MARTIN, E.; XU, J.; VERNICK, K.; BOURGOUIN, C. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. **FEBS Lett.**, v. 580, n. 8, p. 1988-1992, 2006.

BORKENT, A.; GRIMALDI, D. A. The earliest fossil mosquito (Diptera : Culicidae), in mid-Cretaceous Burmese amber. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 5, p. 882-886, 2004.

BRACCO, J. E.; CAPURRO, M. L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SALLUM, M. A. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 573-580, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIEGEL, H. Physiological bases of mosquito ecology. **J. Vec. Eco.**, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2003.

BRYANT, B.; MACDONALD, W.; RAIKHEL, A. S. microRNA miR-275 is indispensable for blood digestion and egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 107, n. 52, p. 22391-2238, 2010.

BRYNE, J. C.; VALEN, E.; TANG, M. H.; MARSTRAND, T.; WINTHER, O.; DA PIEDADE, I.; KROGH, A.; LENHARD, B.; SANDELIN, A. JASPAR, the open access database of transcription factor-binding profiles: new content and tools in the 2008 update. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. D102-D106, 2008.

CALVO, E.; WALTER, M.; ADELMAN, Z. N.; JIMENEZ, A.; ONAL, S.; MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. Nanos (nos) genes of the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.35, n.7, p. 789-798, 2005.

CARAGEA, C.; SINAPOV, J.; SILVESCU, A.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. Glycosylation Site Prediction Using Ensembles of Support Vector Machine Classifiers. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 438, 2007.

CARDOSO, J. C. **Vigilância Entomológica de mosquitos (Diptera, Culicidae) como estratégia de Vigilância Ambiental em Saúde no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2010. 147 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Mosquito life cycle**. 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html>. Acesso em: 25 fev. 2011.

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

CHEN, L.; ZHU, J.; SUN, G.; RAIKHEL, A. S. The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 33, n. 3, p. 743-761, 2004.

CHEN, X. G.; MATHUR, G.; JAMES, A. A. Gene expression studies in mosquitoes. **Adv. Genet.**, v. 64, p. 19-50, 2008.

CHERBAS, L.; CHERBAS, P. The arthropod initiator: the capsite consensus plays an important role in transcription. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.23, n. 1, p. 81-90, 1993.

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

COATES, C. J.; TURNEY, C. L.; FROMMER, M.; O'BROCHTA, D. A.; ATKINSON, P. W. Interplasmid transposition of the mariner transposable element in non-drosophilid insects. **Mol. Gen. Genet.**, v. 253, n. 6, p. 728-733, 1997.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 228 p.

CRUZ, J.; SIEGLAFF, D. H.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; RAIKHEL, A. S. Nuclear receptors in the mosquito *Aedes aegypti*: annotation, hormonal regulation and expression profiling. **FEBS J.**, v. 276, n. 5, p. 1233-1254, 2009.

DA COSTA-DA-SILVA A. L.; CAPURRO, M. L.; BRACCO, J. E. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 539-544. 2005.

DALTON, J. E.; KACHERIA, T. S.; KNOTT, S.R.; LEBO, M.S.; NISHITANI, A.; SANDERS, L. E.; STIRLING, E. J.; WINBUSH, A.; ARBEITMAN, M. N. Dynamic, mating-induced gene expression changes in female head and brain tissues of *Drosophila melanogaster*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 541, 2010.

DISSANAYAKE, S. N.; RIBEIRO, J. M.; WANG, M. H.; DUNN, W. A.; YAN, G.; JAMES, A. A.; MARINOTTI, O. aeGEPUCI: a database of gene expression in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **BMC Res. Notes**, v. 3, p. 248, 2010.

EDWARDS, M. J.; MOSKALYK, L. A.; DONELLY-DOMAN, M.; VLASKOVA, M.; NORIEGA, F. G.; WALKER, V. K.; JACOBS-LORENA, M. Characterization of a carboxypeptidase A gene from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Ins. Mol. Bio.**, v. 9, n. 1, p. 33-38, 2000.

EDWARDS, M.J.; SEVERSON, D. W.; HAGEDORN, H. H. Vitelline envelope genes of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 28, n. 12, p. 915-925, 1998.

ENSERINK, M. Science and society. GM mosquito trial alarms opponents, strains ties in Gates-funded project. **Science**, v. 330, n. 6007, p. 1030-1031, 2010.

FANG, J. Ecology: A world without mosquitoes. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 432-434, 2010.

FEITOSA, F. M.; CALVO, E.; MERINO, E. F.; DURHAM, A. M.; JAMES, A. A.; DE BIANCHI, A. G.; MARINOTTI, O.; CAPURRO, M. L. A transcriptome analysis of the *Aedes aegypti* vitellogenic fat body. **Journal of Insect Science**. v. 6, p. 1-26, 2006.

FERDIG, M. T.; LI, J.; SEVERSON, D. W.; CHRISTENSEN, B. M. Mosquito dopa decarboxylase cDNA characterization and blood-meal-induced ovarian expression. **Insect. Molecular Biology**, v. 5, p. 119-126, 1996.

FERDIG, M. T.; TAFT, A. S.; SMARTT, C. T.; LOWENBERGER, C. A.; LI, J.; ZHANG, J.; CHRISTENSEN, B. M. *Aedes aegypti* dopa decarboxylase: gene structure and regulation. **Insect. Mol. Biol.**, v. 9, n. 3, p. 231-239, 2000.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FOLEY, D. H.; RUEDA, L. M.; WILKERSON, R. C. Insight into global mosquito biogeography from country species records. **J. Med. Entomol.**, v. 44, n. 4, p. 554-567, 2007.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2. 864 p.

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

FRATUS, A. S. B. **Expressão e reconhecimento imune de alelos conservados de antígenos variantes de *Plasmodium falciparum***. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em parasitologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GALINDO, K.; SMITH, D. P. A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. **Genetics**, v. 159, n. 3, p. 1059-1072, 2001.

GRAY, E. M.; BRADLEY, T. J. Malarial infection in *Aedes aegypti*: effects on feeding, fecundity and metabolic rate. **Parasitology**, v. 132, p. 1-8, 2005.

GRIMALDI, D. A.; ENGEL, M. S.; NASCIMBENE, P. C. Fossiliferous Cretaceous amber from Burma (Myanmar): its rediscovery, biotic diversity, and paleontological significance. **Am. Mus. Novitates**, n. 3361, p. 1-71, 2002.

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 319-330, 2004.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res.**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 12, p. S7-S16, 2010. Supplement.

HACKER, C. S. The differential effect of *Plasmodium gallinaceum* on the fecundity of several strains of *Aedes aegypti*. **J. Invert. Pathol.**, v. 18, p. 373-377, 1971.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANSEN, I. A.; ATTARDO, G. M.; PARK, J. H.; PENG, Q.; RAIKHEL, A. S. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 101, n. 29, p. 10626-10631, 2004.

HARBACH, R. E. **Mosquito Taxonomic Inventory**. 2011. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>. Acesso em: 23 fev. 2011.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591-638, 2007.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1988.

HEKMAT-SCAFE, D. S.; SCAFE, C. R.; MCKINNEY, A. J.; TANOUYE, M. A. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. **Genome Res.**, v. 12, n. 9, p. 1357-1369, 2002.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, n. 11, p. 1009-1015, 2000.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HOLT, R. A.; SUBRAMANIAN, G. M.; HALPERN, A.; SUTTON, G. G.; CHARLAB, R.; NUSSKERN, D. R.; WINCKER, P.; CLARK, A. G.; RIBEIRO, J. M.; WIDES, R.; SALZBERG, S. L.; LOFTUS, B.; YANDELL, M.; MAJOROS, W. H.; RUSCH, D. B.; LAI, Z.; KRAFT, C. L.; ABRIL, J. F.; ANTHOUARD, V.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BADEN, H.; DE BERARDINIS, V.; BALDWIN, D.; BENES, V.; BIEDLER, J.; BLASS, C.; BOLANOS, R.; BOSCUS, D.; BARNSTEAD, M.; CAI, S.; CENTER, A.; CHATURVERDI, K.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRYSTAL, M. A.; CLAMP, M.; CRAVCHIK, A.; CURWEN, V.; DANA, A.; DELCHER, A.; DEW, I.; EVANS, C. A.; FLANIGAN, M.; GRUNDSCHOBBER-FREIMOSER, A.; FRIEDLI, L.; GU, Z.; GUAN, P.; GUIGO, R.; HILLENMEYER, M. E.; HLADUN, S. L.; HOGAN, J. R.; HONG, Y. S.; HOOVER, J.; JAILLON, O.; KE, Z.; KODIRA, C.; KOKOZA, E.; KOUTSOS, A.; LETUNIC, I.; LEVITSKY, A.; LIANG, Y.; LIN, J. J.; LOBO, N. F.; LOPEZ, J. R.; MALEK, J. A.; MCINTOSH, T. C.; MEISTER, S.; MILLER, J.; MOBARRY, C.; MONGIN, E.; MURPHY, S. D.; O'BROCHTA, D. A.; PFANNKOCH, C.; QI, R.; REGIER, M. A.; REMINGTON, K.; SHAO, H.; SHARAKHOVA, M. V.; SITTER, C. D.; SHETTY, J.; SMITH, T. J.; STRONG, R.; SUN, J.; THOMASOVA, D.; TON, L. Q.; TOPALIS, P.; TU, Z.; UNGER, M. F.; WALENZ, B.; WANG, A.; WANG, J.; WANG, M.; WANG, X.; WOODFORD, K. J.; WORTMAN, J. R.; WU, M.; YAO, A.; ZDOBNOV, E. M.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHAO, S.; ZHU, S. C.; ZHIMULEV, I.; COLUZZI, M.; DELLA TORRE, A.; ROTH, C. W.; LOUIS, C.; KALUSH, F.; MURAL, R. J.; MYERS, E. W.; ADAMS, M. D.; SMITH, H. O.; BRODER, S.; GARDNER, M. J.; FRASER, C. M.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BREY, P. T.; VENTER, J.C.; WEISSENBACH, J.; KAFATOS, F. C.; COLLINS, F. H.; HOFFMAN, S. L. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 129-149, 2002.

HOPWOOD, J. A.; AHMED, A. M.; POLWART, A.; WILLIAMS, G. T.; HURD, H. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. **J. Exp Biol.**, v. 204, p. 2773-2780, 2001.

HORN, C.; WIMMER, E. A. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, n. 1, p. 64-70, 2003.

HORN, C.; WIMMER, E. A. A versatile vector set for animal transgenesis. **Dev. Genes Evol.**, v. 210, n. 12, p. 630-637, 2000.

HURD, H.; GRANT, K. M.; ARAMBAGE, S. C. Apoptosis-like death as a feature of malaria infection in mosquitoes. **Parasitology**, v. 132, p. S33-47, 2006. Supplement.

IDIGDINOS. **Fossils, minerals and dinosaur toys**. 2011. Disponível em: <<http://www.iddfossils.co.uk>>. Acesso em: 01 mar. 2011.

ISOE, J.; ZAMORA, J.; MIESFELD, R. Molecular analysis of the *Aedes aegypti* carboxipeptidase gene family. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 39, n. 1, p. 68-73, 2008.

IYANIWURA, T. T. Non-target and environmental hazards of pesticides. **Rev. Environ. Health**, v. 9, n. 3, p. 161-176, 1991.

JAMES, A. A. Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 2, p. 64-67, 2005.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 4, 272-279, 2010.

JASINSKIENE, N.; JUHN, J.; JAMES, A. A. Microinjection of *A. aegypti* embryos to obtain transgenic mosquitoes. **J. Vis. Exp.**, n. 5, p. 219, 2007.

JONES, J. C.; MADHUKAR, B. V. Effect of weight on mosquito (*Aedes aegypti* L.) feeding. **Experientia**, v. 30, n. 11, p. 1255, 1974.

JUHN, J.; JAMES, A. A. *Oskar* gene expression in the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, n. 3, p. 363–372, 2006.

MARÇAL JUNIOR, O; SANTOS, A. Infestação por *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e incidência do dengue no espaço urbano: um estudo de caso. **Caminhos de Geografia**, v. 15, n. 13, p. 241-251, 2004.

KLOWDEN, M. J. Endocrine aspects of mosquito reproduction. **Arch. Ins. Bio. Phys.**, v. 35, p. 491-512, 1997.

KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **J. Econ. Entomol.**, v. 48, p. 902-904, 1955.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAWSON, D.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.; BESANSKY, N. J.; BRUGGNER, R. V.; BUTLER, R.; CAMPBELL, K. S.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRISTLEY, S.;

DIALYNAS, E.; EMMERT, D.; HAMMOND, M.; HILL, C. A.; KENNEDY, R. C.; LOBO, N. F.; MACCALLUM, M. R.; MADEY, G.; MEGY, K.; REDMOND, S.; RUSSO, S.; SEVERSON, D. W.; STINSON, E. O.; TOPALIS, P.; ZDOBNOV E. M.; BIRNEY, E.; GELBART, W. M.; KAFATOS, F. C.; LOUIS, C.; COLLINS, F. H. VectorBase: a home for invertebrate vectors of human pathogens. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. D503-D505; 2007.

LAWSON, D.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.; BESANSKY, N. J.; BRUGGNER, R. V.; BUTLER, R.; CAMPBELL, K. S.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRISTLEY, S.; DIALYNAS, E.; HAMMOND, M.; HILL C. A.; KONOPINSKI, N.; LOBO, N. F.; MACCALLUM, R. M.; MADEY, G.; MEGY, K.; MEYER, J.; REDMOND, S.; SEVERSON, D. W.; STINSON, E. O.; TOPALIS, P.; BIRNEY, E.; GELBART, W. M.; KAFATOS, F. C.; LOUIS, C.; COLLINS, F. H. VectorBase: a data resource for invertebrate vector genomics. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. D583-587, 2009.

LEE, Y.; TSAI, J.; SUNKARA, S.; KARAMYCHEVA, S.; PERTEA, G.; SULTANA, R.; ANTONESCU, V.; CHAN, A.; CHEUNG, F.; QUACKENBUSH, J. The TIGR Gene Indices: clustering and assembling EST and known genes and integration with eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. D71-74, 2005.

LI, J. S.; LI, J. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, n. 12, p. 954-964, 2006

LI, S.; PICIMBON, J. F.; JI, S.; KAN, Y.; CHUANLING, Q.; ZHOU, J. J.; PELOSI, P. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 372, n. 3, p. 464-468, 2008.

LI, Z. X.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M.; ZHOU, J. J. Identification and expression of odorant-binding proteins of the malaria-carrying mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.**, v. 58, n. 3, p. 175-189, 2005.

MARSHALL, J. M. The effect of gene drive on containment of transgenic mosquitoes. **J. Theor. Biol.**, v. 258, n. 2, p. 250-265, 2009.

MATSUO, T.; SUGAYA, S.; YASUKAWA, J.; AIGAKI, T.; FUYAMA, Y. Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*. **PLoS Biol.**, v. 5, n. 5, p. e118, 2007.

MCGRAW, L. A.; CLARK, A. G.; WOLFNER, M. F. Post-mating gene expression profiles of female *Drosophila melanogaster* in response to time and to four male accessory gland proteins. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1395-1408, 2008.

MEGY, K.; HAMMOND, M.; LAWSON, D.; BRUGGNER, R.V.; BIRNEY, E.; COLLINS, F.H. Genomic resources for invertebrate vectors of human pathogens, and the role of VectorBase. **Infect. Genet. Evol.**, v. 9, n. 3, p. 308-313, 2009.

MONATH, T. P. Dengue and yellow fever--challenges for the development and use of vaccines. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, n. 22, p. 2222-2225, 2007.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, p. 205-207, 2002.

NENE, V.; WORTMAN, J. R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C.; TU, Z. J.; LOFTUS, B.; XI, Z.; MEGY, K.; GRABHERR, M.; REN, Q.; ZDOBNOV, E. M.; LOBO, N. F.; CAMPBELL, K. S.; BROWN, S. E.; BONALDO, M. F.; ZHU, J.; SINKINS, S. P.; HOGENKAMP, D. G.; AMEDEO, P.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BIDWELL, S.; BIEDLER, J.; BIRNEY, E.; BRUGGNER, R. V.; COSTAS, J.; COY, M. R.; CRABTREE, J.; CRAWFORD, M.; DEBRUYN, B.; DECAPRIO, D.; EIGLMEIER, K.; EISENSTADT, E.; EL-DORRY, H.; GELBART, W. M.; GOMES, S. L.; HAMMOND, M.; HANNICK, L. I.; HOGAN, J. R.; HOLMES, M. H.; JAFFE, D.; JOHNSTON, J. S.; KENNEDY, R. C.; KOO, H.; KRAVITZ, S.; KRIVENTSEVA, E. V.; KULP, D.; LABUTTI, K.; LEE, E.; LI, S.; LOVIN, D. D.; MAO, C.; MAUCELI, E.; MENCK, C. F.; MILLER, J. R.; MONTGOMERY, P.; MORI, A.; NASCIMENTO, A. L.; NAVEIRA, H. F.; NUSBAUM, C.; O'LEARY, S.; ORVIS, J.; PERTEA, M.; QUESNEVILLE, H.; REIDENBACH, K. R.; ROGERS, Y. H.; ROTH, C. W.; SCHNEIDER, J. R.; SCHATZ, M.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STINSON, E. O.; TUBIO, J. M.; VANZEE, J. P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WERNER, D.; WHITE, O.; WYDER, S.; ZENG, Q.; ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; HILL, C. A.; RAIKHEL, A. S.; SOARES, M. B.; KNUDSON, D. L.; LEE, N. H.; GALAGAN, J.; SALZBERG, S. L.; PAULSEN, I. T.; DIMOPOULOS, G.; COLLINS, F. H.; BIRREN, B.; FRASER-LIGGETT, C. M.; SEVERSON, D. W. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.

NORIEGA, F. G.; WELLS, M. A. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. **J. Insect. Physiol.**, v. 45, n. 7, p. 613-620, 1999.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS H. B. JR.; DEERFIELD, D. W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. **EMBNEW. NEWS.**, v. 4, p. 14, 1997.

OSTA, M. A.; CHRISTOPHIDES, G. K.; KAFATOS, F. C. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. **Science**, v. 303, n. 5666, p. 2030-2032, 2004.

PADUAN KDOS, S.; RIBOLLA, P. E. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 45, n. 1, p. 59-67, 2008.

PARIS, M.; TETREAU, G.; LAURENT, F.; LELU, M.; DESPRES, L.; DAVID, J. P. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. **Pest Manag. Sci.**, v. 67, n. 1, p. 122-128, 2011.

PELLETIER, J.; LEAL, W. S. Genome analysis and expression patterns of odorant-binding proteins from the Southern House mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. **PLoS One.** , v. 4, n. 7, p. e6237, 2009.

PELOSI, P.; CALVELLO, M.; BAN, L. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. **Chem. Senses.**, v. 30, p. i291-i292, 2005. Supplement 1.

PELOSI, P.; ZHOU, J. J.; BAN, L. P.; CALVELLO, M. Soluble proteins in insect chemical communication. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 63, n. 14, p. 1658-1676, 2006.

PHUC, H. K.; ANDREASEN, M. H.; BURTON, R. S.; VASS, C.; EPTON, M. J.; PAPE, G.; FU, G.; CONDON, K. C.; SCAIFE, S.; DONNELLY, C. A.; COLEMAN, P. G.; WHITE-COOPER, H.; ALPHEY, L. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC Biol.**, v. 5, p. 11, 2007.

QUACKENBUSH, J.; LIANG, F.; HOLT, I.; PERTEA, G.; UPTON, J. The TIGR gene indices: reconstruction and representation of expressed gene sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 1, p. 141-145, 2000.

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

RAIKHEL, A. S. Vitellogenesis in mosquitoes. **Adv.Dis.Vec. Res.**, v. 9, p. 1-39, 1992.

RAIKHEL, A. S. Monoclonal antibodies as probes for processing of the mosquito yolk protein; a high resolution immunolocalization of secretory and accumulative pathways. **Tissue & Cell.**, v. 19, n. 4, p. 515-529, 1987.

RAIKHEL, A. S.; KOKOZA, V.A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WANG, 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. **Ins. Bioc. Mol. Biol.**, v. 32, n. 10, p. 1275-1286, 2002.

REY, L. **Bases de Parasitologia médica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 379 p.

RIEHLE, M. A.; BROWN, M. R. Insulin receptor expression during development and a reproductive cycle in the ovary of the mosquito *Aedes aegypti*. **Cell. Tissue Res.**, v. 308, n. 3, p. 409-420, 2002.

RODRÍGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; DIAZ, C.; SOCA, L. A. Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con el insecticida organofosforado malation. **Rev. Cub. Med. Trop.**, v. 55, n. 2, p. 105-111, 2003.

ROGERS, D.W.; WHITTEN, M. M.; THAILAYIL, J.; SOICHOT, J.; LEVASHINA, E. A.; CATTERUCCIA, F. Molecular and cellular components of the mating machinery in *Anopheles gambiae* females. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 105, n. 49, p. 19390-19395, 2008.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol.**, v. 132, p. 365-386, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning: **A Laboratory Manual.** 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Res.**, v. 81, n. 1, p. 6-15, 2009.

SANDELIN, A.; ALKEMA, W.; ENGSTRÖM, P.; WASSERMAN, W. W.; LENHARD, B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. D91-94, 2004.

SANDERS, H. R.; EVANS, A. M.; ROSS, L. S.; GILL, S. S. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 33, p. 1105-1122, 2003.

SANJAD, N. Da 'abominável profissão de vampiros': Emílio Goeldi e os mosquitos no Pará (1905)'. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 10, n. 1, p. 85-111, 2003.

SAPPINGTON, T. W.; HELBLING, P.; KOLLER, C. N.; RAIKHEL, A. S. Activation in vitro of vitellogenin uptake by the oocytes of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Phys. Ent.**, v. 23, p. 158-164, 1998.

SCIENCE AAAS. **Science Journals**. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org>>. Acesso em: 15 fev. 2011.

SELIGMAN, S. J.; GOLD, E. A. Live flavivirus vaccines: reasons for caution. **Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2073-2075, 2004.

SINKINS, S. P.; GOULD, F. Gene drive systems for insect disease vectors. **Nat. Rev. Genet.**, v. 7, n. 6, p. 427-435, 2006.

SMARTT, C. T.; CHILES, J.; LOWENBERGER, C.; CHRISTENSEN, B. M. Biochemical analysis of a blood meal-induced *Aedes aegypti* glutamine synthetase gene. **Insect Biochem Mol. Biol.**, v. 28, n. 12, p. 935-945, 1998.

SMITH, D. L.; DUSHOFF, J.; MCKENZIE, F. E. The risk of a mosquito-borne infection in a heterogeneous environment. **PloS Biol.**, v. 2, n. 11, p. 1957-1964, 2004.

SPERANÇA, M. A.; CAPURRO, M. L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era--a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 102, n. 4, p. 425-433, 2007.

STRODE, C.; WONDJI, C. S.; DAVID, J. P.; HAWKES, N. J.; LUMJUAN, N.; NELSON, D. R.; DRANE, D. R.; KARUNARATNE, S. H.; HEMINGWAY, J.; BLACK, W. C. 4TH.; RANSON, H. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, n. 1, p. 113-123, 2008.

SUN, G.; ZHU, J.; RAIKHEL, A. S. The early gene E74B isoform is a transcriptional activator of the ecdysteroid regulatory hierarchy in mosquito vitellogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 218, n. 1-2, p. 95-105, 2004.

SUN, G.; ZHU, J.; LI, C.; TU, Z.; RAIKHEL, A. S. Two isoforms of the early E74 gene, an Ets transcription factor homologue, are implicated in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 190, n. 1-2, p. 147-157, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001. Suplemento.

TELANG, A.; WELLS, M. A. The effect of larval and adult nutrition on successful autogeneus egg production by a mosquito. **J. Ins. Phys.**, v. 50, p. 677-685, 2004.

THANGAMANI, S.; WIKEL, S. K. Differential expression of *Aedes aegypti* salivary transcriptome upon blood feeding. **Parasit. Vectors**, v. 2, n. 1, p. 34, 2009.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, 4876-4882, 1997.

TRAVANTY, E. A.; ADELMAN, Z. N.; FRANZ, A. W.; KEENE, K. M.; BEATY, B. J.; BLAIR, C. D.; JAMES, A. A.; OLSON, K. E. Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. **Ins. Bioch. Mol. Biol.**, v. 34, n. 7, p. 607-613, 2004.

URDANETA-MARQUEZ, L.; FAILLOUX, A. B. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. **Infect. Genet. Evol.**, v. 11, n. 2, p. 253-261, 2010.

USD. **National music museum.** 1996. Disponível em: <<http://orgs.usd.edu/nmm/Exhibitions/BeethovenBerlioz/BBlyre.html>>. Acesso em: 03 jan. 2006.

VALLE, D.; MONNERAT, A. T.; SOARES, M. J.; ROSA-FREITAS, M. G.; PELAJO-MACHADO, M.; VALE, B. S.; LENZI, H. L.; GALLER, R.; LIMA, J. B. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. **J. Insect Physiol.**, v. 45, n. 8, p. 701-708, 1999.

VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VOGT, R. G. Odorant binding protein homologues of the malaria mosquito *An. gambiae*; possible orthologues of the OS-E and OS-F OBPs of *Drosophila melanogaster*. **J. Chem. Ecol.**, v. 28, p. 2371–2376, 2002.

VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature**, v. 293, p. 161-163, 1981.

WALKER, K. **Yellow fever mosquito** (*Aedes aegypti*). **Pest and Diseases Image Library**. 2008. Disponível em: <<http://www.padil.gov.au>>. Acesso em: 15 fev. 2011

WATERHOUSE, R. M.; WYDER, S.; ZDOBNOV, E. M. The *Aedes aegypti* genome: a comparative perspective. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**. Fact Sheet n°117. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. Geneva: WHO Press 2009. 160 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Yellow Fever**. Fact sheet N°100. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>>. Acesso em: 25 fev. 2011.

ZHOU, J. J.; HE, X. L.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses. **Insect Mol. Biol.**, v. 17, n. 2, p. 147-163, 2008.

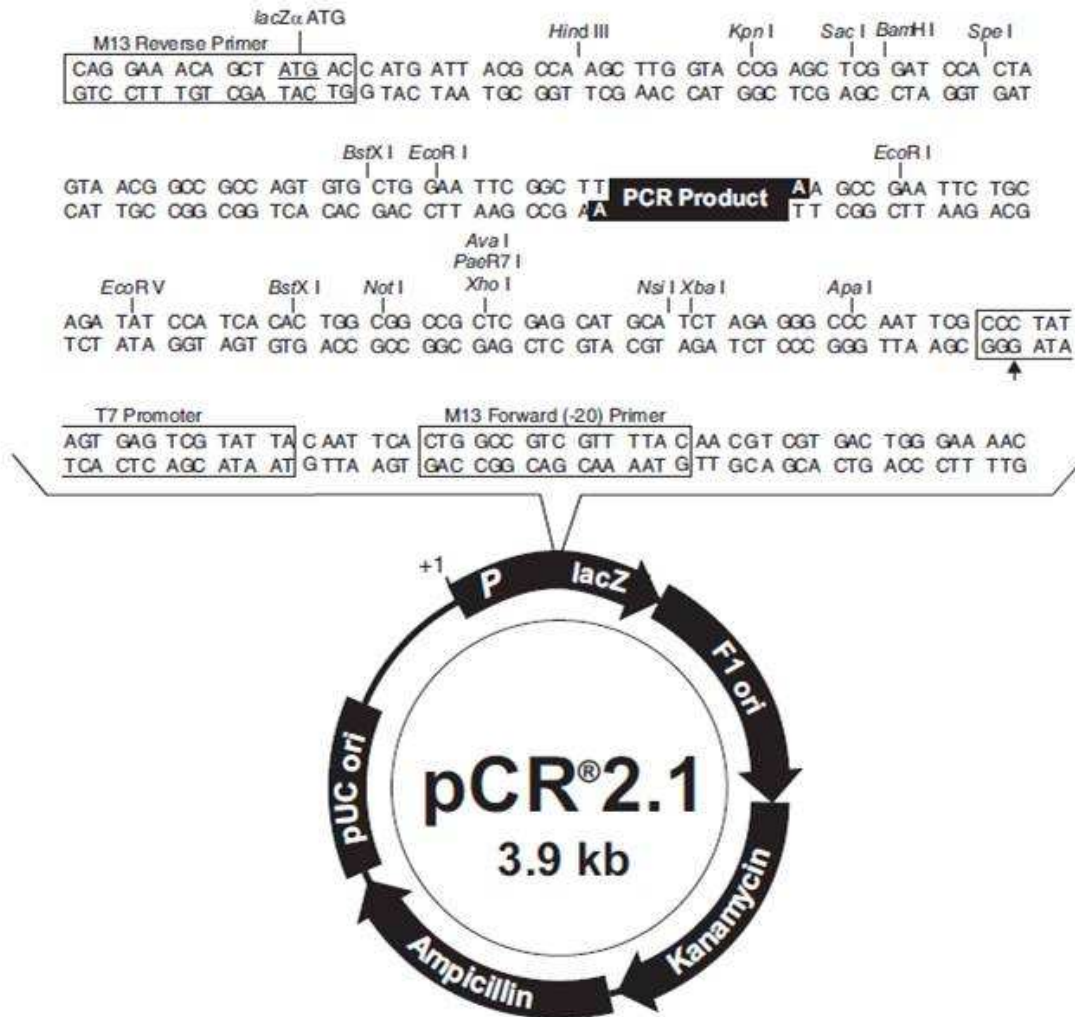
ZHOU, J. J.; HUANG, W.; ZHANG, G. A.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M. "Plus-C" odorant-binding protein genes in two *Drosophila* species and the malaria mosquito *An. gambiae*. **Gene**, v. 327, n. 1, p. 117-129, 2004.

ZHU, J.; CHEN, L.; RAIKHEL, A. S. Distinct roles of Broad isoforms in regulation of the 20-hydroxyecdysone effector gene, Vitellogenin, in the mosquito *Aedes aegypti*. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 267, n. 1-2, p. 97-105, 2007.

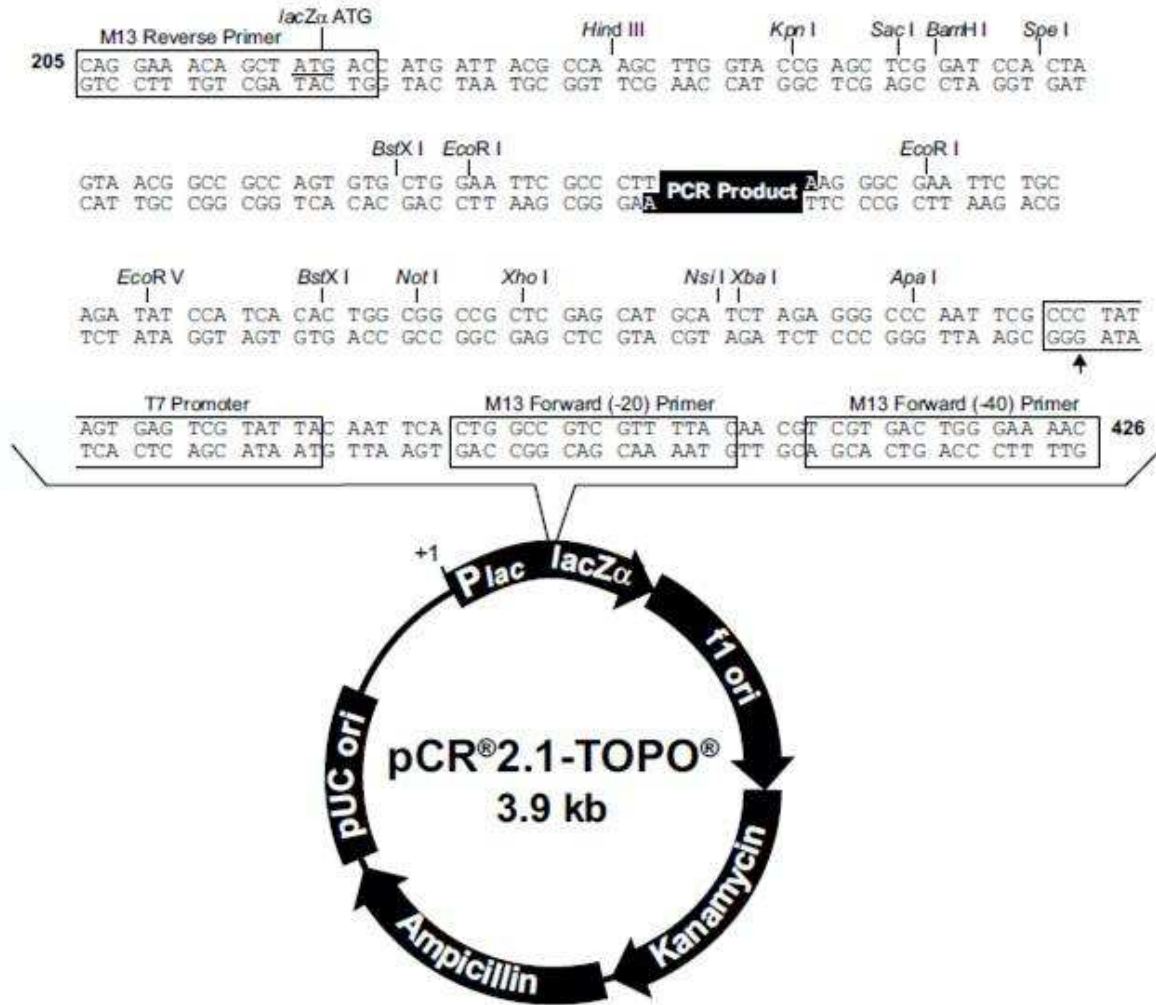
ANEXOS

ANEXO A - Mapa do vetor de clonagem comercial pCR[®] 2.1 e sequências nucleotídicas adjacentes ao sítio de clonagem. O vetor possui genes que conferem resistência aos antibióticos Ampicilina (*Ampicillin*) e Canamicina (*Kanamycin*). A região indicada por *lacZ* corresponde à fase aberta de leitura que codifica para proteína repórter β-galactosidade. O local de inserção para clonagem de fragmentos de DNA está indicado por *PCR Product*.

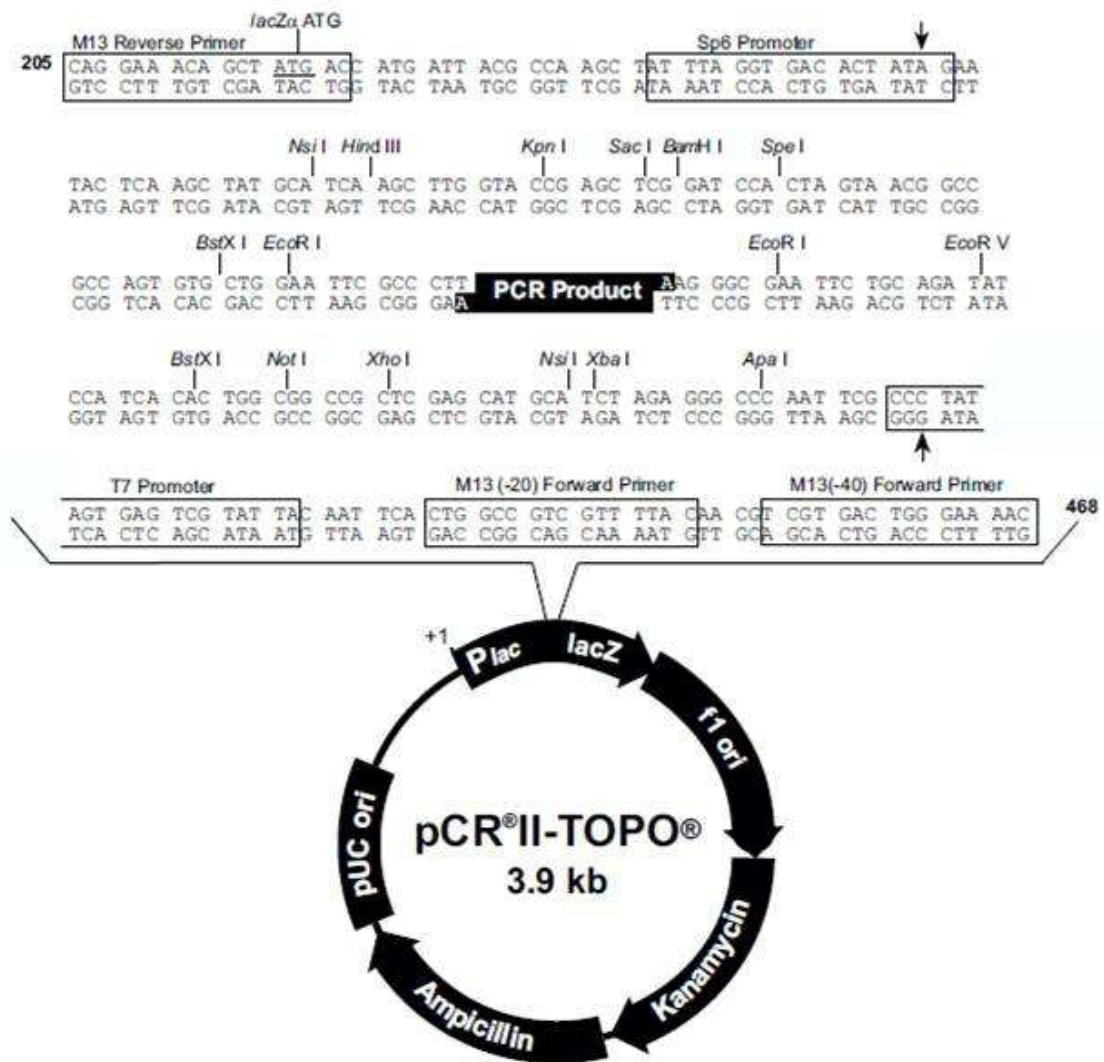
FONTE: Modificado de TA Cloning[®] kit User Manual (Invitrogen), 2004.



ANEXO B - Mapa do vetor de clonagem comercial pCR[®]2.1-TOPO[®] e sequências nucleotídicas adjacentes ao sítio de clonagem. O vetor possui genes que conferem resistência aos antibióticos Ampicilina (*Ampicillin*) e Canamicina (*Kanamycin*). A região indicada por *lacZ* corresponde à fase aberta de leitura que codifica para proteína repórter β-galactosidade. O local de inserção para clonagem de fragmentos de DNA está indicado por *PCR Product*.
 FONTE: Modificado de TOPO TA Cloning[®] kit User Manual (Invitrogen), 2001.

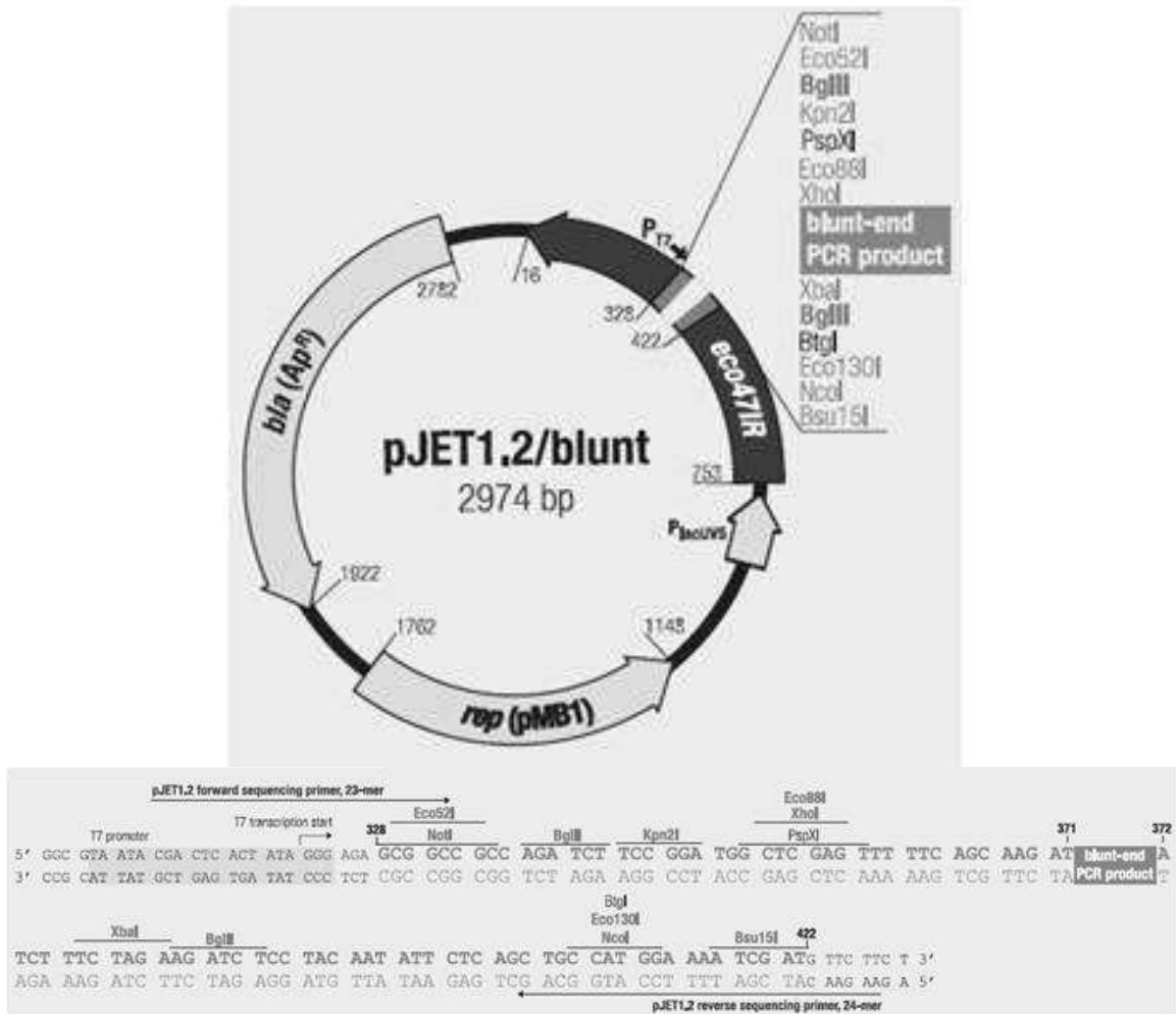


ANEXO C - Mapa do vetor de clonagem comercial pCR[®]II-TOPO[®] e sequências nucleotídicas adjacentes ao sítio de clonagem. O vetor possui genes que conferem resistência aos antibióticos Ampicilina (*Ampicillin*) e Canamicina (*Kanamycin*). A região indicada por *lacZ* corresponde à fase aberta de leitura que codifica para proteína repórter β-galactosidase. O local de inserção para clonagem de fragmentos de DNA está indicado por *PCR Product*.
 FONTE: Modificado de TOPO TA Cloning[®] kit User Manual (Invitrogen), 2001.



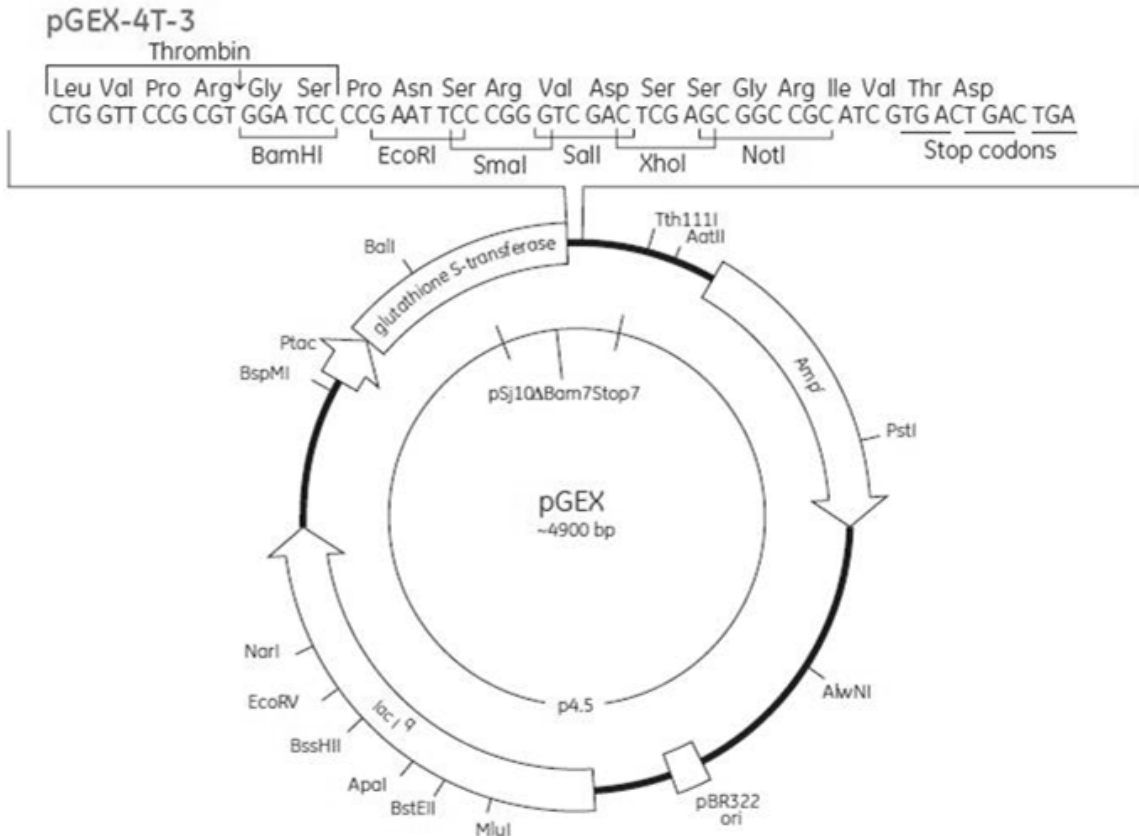
ANEXO D - Mapa do vetor de clonagem comercial pjet1.2, indicando sítio múltiplo de clonagem e sequências adjacentes ao sítio de clonagem. O vetor possui gene que confere resistência ao antibiótico Ampicilina (*bla* Ap^R). A região indicada por *eco47IR* corresponde à fase aberta de leitura que codifica para gene letal que permite seleção positiva dos recombinantes (com inserto). O local de inserção para clonagem de fragmentos de DNA está indicado por *blunt-end PCR product*, flanqueado pelo sítio de múltipla clonagem.

FONTE: Modificado de CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas), 2011.

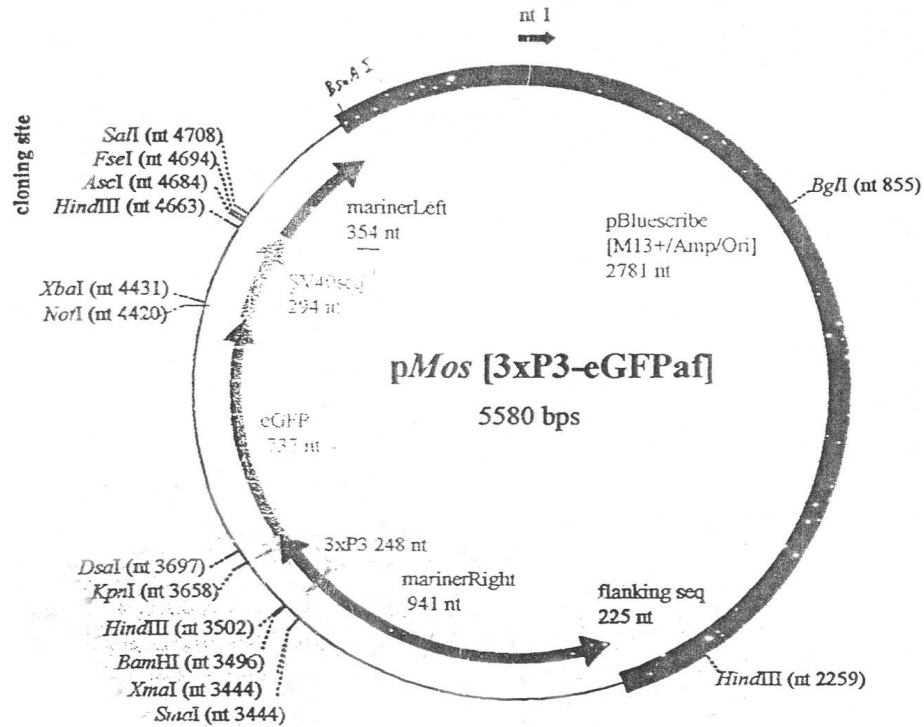


ANEXO E - Mapa do vetor de expressão comercial pGEX-4T-3 e sequências adjacentes ao sítio de clonagem. O vetor possui genes que confere resistência ao antibiótico Ampicilina (*Amp^r*). A região indicada por *lac^f* corresponde à fase aberta de leitura codificante para proteína repressora que se liga à região operadora do promotor *Ptac*, prevenindo a expressão da proteína glutationa S-transferase (*glutathione S-transferase*) sem o indutor IPTG. O local de inserção para clonagem de fragmentos de DNA está apontado no mapa e evidenciado em destaque, através da exibição da sequência nucleotídica acima do esquema do vetor.

FONTE: Modificado de pGEX vectors, GST Gene Fusion System (GE Healthcare), 2009.



ANEXO F - Mapa do vetor de transformação doador *pMos*[3xP3-EGFP], exibindo sítio de múltipla clonagem. Os sítios únicos para as enzimas de restrição *FseI* e *AscI* estão posicionados na região de múltipla clonagem. O braço direito do elemento de transposição *Mariner* está indicado por *marinerRight* e o braço esquerdo por *marinerLeft*. O promotor tecido-específico de olhos está indicado por 3xP3. A fase aberta de leitura que codifica para a proteína marcadora verde fluorescente melhorada (*enhanced green fluorescent protein*) está indicada por *eGFP*. A região indicada por *SV40seg* é a parte não traduzida do gene marcador, composta pela sequência 3'UTR do vírus SV40.



ANEXO G - Mapa do vetor auxiliar pKhsp82MOS, com destaque para os sítios de restrição. A fase aberta de leitura da enzima transposase do elemento de transposição *Mariner* está indicada por *MOS-ORF*.

