MARIA KARINA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DO ACÚMULO DE EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DE GAMBICINA EM *Aedes aegypti* INFECTADO POR *Plasmodium gallinaceum* E VÍRUS dengue

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

São Paulo

2015

MARIA KARINA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DO ACÚMULO DEEXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DE GAMBICINA EM *Aedes aegypti* INFECTADO POR *Plasmodium gallinaceum* E VÍRUS dengue

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimaraes

Versão original

São Paulo

2015

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, Maria Karina.
Caracterização do acúmulo da expressão dos transcritos da gambicina em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* e vírus dengue / Maria Karina Costa. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Dissertação (Mestrado) – 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: Characterization of the accumulation of the expression of gambicina transcripts in *Aedes aegypti* infected with *Plasmodium gallinaceum* and dengue virus.

1. *Aedes aegypti* 2. Peptídeos antimicrobianos 3. Sistema Imune 4. Vírus dengue 5. *Plasmodium* 6. Gambicina I. Guimarães, Profa. Dra. 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/SBIB043/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Karina Costa.

Título da Dissertação: Caracterização do acúmulo da expressão dos transcritos da gambicina em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* e vírus dengue .

Orientador(a): Porfa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

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

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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **116** nas fls. **133** 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 *"Caracterização da expressão de gambicina em Aedes aegypti infectado por diferentes patógenos"* do qual participam o(s) aluno(s) **Maria Karina Costa,** 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 NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **09.08.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 10 de agosto de 2012.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus que me deu a oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço a minha família que é meu porto seguro e me apoiou em todos os momentos da minha vida e acompanhou de perto todas as etapas deste trabalho, ajudando e incentivando a cada instante.

Pai, mesmo o senhor não estando mais presente em minha vida, te dedico esse mestrado, sei que da onde o senhor estiver, está feliz, pois sabia da minha vontade em ingressar na pesquisa e sempre me apoiou, nunca desistiu de mim e dos meus sonhos! Te amo e será assim para sempre, o senhor foi o melhor pai do mundo!!

Mãe, minha GUERREIRA!!! Meu exemplo de vida, exemplo de lutar pela vida e não desistir por nenhum motivo! Esse mestrado também é seu!!! Obrigada por tudo, por cada conselho, cada puxão de orelha, por estar ao meu lado sempre, por me aconselhar, me ajudar, por lutar comigo na conquista desse sonho sempre me dizendo: "Vai dar tudo certo!" essas suas palavras confortavam meu coração na hora do desespero!! Obrigada por ser minha mãe, a melhor mãe!!Eu te amo tanto!!!

Amor, (Felipe), obrigada por toda ajuda durante esse período do mestrado e por todos esses anos que estamos juntos, obrigada por me acompanhar nos plantões, me dar idéias nos experimentos, por me escutar todos os dias contando que o experimento funcionou ou que tive que repetir por muitas vezes, obrigada por toda ajuda na escrita da tese, pois de computador e formatação eu não entendo nada e você sempre estava ali com muita paciência me ajudando! Obrigada por me apoiar neste sonho!! Te amo!!

Jú!!! Meu irmão querido, obrigada pelo abraço de parabéns quando soube que estava matriculada no mestrado! Nunca vou me esquecer daquela cena!!! Obrigada por cada palavra de apoio, por cada conselho, por tentar me acalmar quando os experimentos não davam certo, por estar ao meu lado, pelas caronas até a USP!! Enfim, obrigada por ser meu irmão!! Te amo!!!

Agradeço a todos os amigos que conquistei no lab MGM, que foram essenciais para a produção do mestrado, obrigada pelo apoio, pelos conselhos, pela ajuda nos experimentos, na correção da tese pelos momentos de alegria e por estarem ao meu lado nos momentos de tristeza...vocês são amigos que vou levar para o resto da minha vida e fazem uma falta imensa no meu dia a dia!!

Em especial agradeço ao André. Meu amigo, obrigada por tudo, desde o primeiro dia no lab você esteve ao meu lado, me ensinando, aconselhando, dando puxões de orelha quando necessário e nas horas difíceis (não só na ciência, mas na vida) estava ao meu lado com palavras de otimismo e me dando apoio para seguir. Muito obrigada!!! Aprendi e aprendo muito com você!!Te admiro muito e sempre estarei torcendo para que todos os seus objetivos sejam alcançados!!! Você merece!!!!

Obrigada professora Margareth pela oportunidade. Marga, tudo isso não seria possível se naquela segunda –feira de fevereiro, você não tivesse me dito sim para o pedido de estágio, muito obrigada!!! Meu sonho se realizou porque você permitiu que eu ficasse em seu laboratório, porque você me deu a oportunidade de desenvolver um projeto sob a sua orientação, só tenho que te agradecer!!! Obrigada pelos ensinamentos e conselhos! Obrigada por permitir

que eu cuidasse da minha mãe quando ela mais precisava, obrigada por não se preocupar só com a aluna, mas com a pessoa também!! Obrigada por tudo!!

Agradeço a CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

“Quem acredita sempre alcança”

Renato Russo

RESUMO

COSTA, M. K. **Caracterização do acúmulo da expressão dos transcritos da gambicina em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* e vírus dengue.** 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Mosquitos são insetos transmissores de patógenos que causam doenças graves para os seres humanos, dentre elas a febre amarela, malária e febre dengue. A imunidade inata que o mosquito apresenta tenta combater os patógenos dentro do organismo do mosquito impedindo que este seja transmitido para outros hospedeiros. Esta imunidade possui dois tipos diferentes de respostas: celular e humoral. A resposta celular apresenta três diferentes processos: fagocitose, encapsulamento e formação nodular, todos estes processos buscam eliminar os patógenos. Peptídeos antimicrobianos fazem parte da resposta humoral do mosquito, sendo codificados por genes e secretados por diversos tipos celulares. Vários estudos têm mostrado a eficácia de variados peptídeos contra patógenos, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativa, fungos filamentosos e *Plasmodium sp.*impedindo que o seu ciclo se complete. Um peptídeo novo pouco conhecido descoberto em *Anopheles gambiae*, a gambicina,demonstrou bons resultados no combate de parasitas. Este trabalho tem o objetivo de estudar a expressão da gambicina em *Aedes aegypti*. A gambicina é expressa em todas as fases de desenvolvimento do mosquito. Na infecção por *Plasmodium galleceum*, não há diferença significativa na expressão deste peptídeo entre o grupo controle e infectado nos intervalos analisados. Na infecção por vírus dengue, sorotipo 2, a gambicina não apresenta diferença significativa no intervalo de 24 horas após a infecção, quando comparamos grupo controle e infectado, nos intervalos de 7 dias e 14 dias após a infecção, a expressão da gambicina é maior no grupo controle quando comparemos com o grupo infectado.

Palavras-chaves: *Aedes aegypti*. Peptídeos Antimicrobianos. Sistema Imune.Vírus Dengue. *Plasmodium*. Gambicina.

ABSTRACT

COSTA, M. K. **Characterization of the accumulation of the expression of gambicina transcripts in Aedesaegypti infected with *Plasmodium gallinaceum* and dengue virus.** 2015. 61 p. Masters thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Mosquitoes are pathogens of transmitting insects that cause serious diseases to humans, among them yellow fever, malaria and dengue fever. Innate immunity presents a mosquito tries to combat the pathogens inside the body of the mosquito preventing it from being transmitted to other hosts. This immunity has two different types of responses: cellular and humoral. The cellular response has three different processes: phagocytosis, encapsulation and nodule formation, all these processes seek to eliminate pathogens. Antimicrobial peptides are part of the humoral response mosquito being encoded by genes and secreted by several cell types. Studies have shown promising efficacy of various peptides from pathogens, including gram-positive bacteria, Gram-negative filamentous fungi and *Plasmodium* sp. preventing your cycle is complete. A little known new peptide discovered in *Anopheles gambiae*, the gambicina showed good results in controlling pests. This work aims to study the expression of gambicina in *Aedesaegypti*. The gambicina is expressed in all stages of development mosquito. In *Plasmodium gallinaceum* infection, there is no significant difference in the expression of this peptide between the control group and infected in the analyzed intervals. In infection with dengue virus serotype 2, the gambicina no significant difference within 24 hours after infection when comparing the control group and infected at intervals of 7 days and 14 days after infection, the expression is higher in gambicina control group when compare to the infected group.

Keyworlds: *Aedes aegypti*. Antimicrobial Peptides.Immune System. Dengue Virus.*Plasmodium*. gambicin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -A-)Fêmea adulta de *Aedes aegypti,* durante o repasto sanguíneo. B-)Escamas em forma lira presente no tórax de *Ae. aegypti*utilizada na identificação morfológica da espécie. 14
Figura 2- Ciclo de vida do mosquito Aedes aegypti 14
Figura 3-Ciclo do Plasmodium 19
Figura 4- Mecanismos de ação dos Peptídeos Antimicrobianos 23
Figura 5- Esquema extraído do VectorBase da anotação do gene AAEL004522-RAque codifica o peptídeo gambicina 38
Figura 7-iniciadoresEletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação gênica. O DNA 40
Figura 8-Quantificação densitométrica da expressão de gambicina nos estadios de desenvolvimento de Aedes aegypti 42
Figura 10 - Perfil de transcrição semi-quantitativo da gambicina durante a infecção de aedes aegypti por Plasmodiumgallinaceum 44
Figura 11 - Análise por qPCR dos transcritos de gambicina na infecção por Plasmodiumgallinaceum 46
Figura 12- Análise quantitativa de PCR em tempo real na infecção por Plasmodiumgallinaceum 47
Figura 13- Análise por qPCR dos transcritos de gambicina em Aedes aegypti na infecção por vírus dengue - Sorotipo 2.....50
Figura 14 - Análise quantitativa de PCR em tempo real na infecção por vírus dengue 51
Figura 15 - Análise quantitativa absoluta de PCR em tempo real na infecção por vírus dengue.....51

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 13

1.1 Aedes aegypti 13

1.2 Dengue 15

1.3 Multiplicação do *Dengue vírus* no vetor 16

1.4 Malária 17

1.5 Sistema imune dos mosquitos 19

1.6 Peptídeos antimicrobianos (AMPs).....20

1.6.1 Estrutura de peptídeos antimicrobianos 21

1.6.2 Modo de ação.....22

1.6.3 Peptídeos Antivirais 23

1.6.4 AMPS com atividade antibacteriana 24

1.6.5 AMPs com atividade sobre parasitas 25

1.6.6 AMPs isolados e caracterizados em insetos 25

1.6.7 Peptídeo Antimicrobiano: Gambicina.....26

2 MATERIAL e MÉTODOS 29

2.1 Animais.....29

2.1.1 Aedes aegypti 29

2.1.2 Camundongos e Pintainhos 29

2.2 *Plasmodium gallinaceum*.....30

2.3 Extração de RNA.....30

2.4 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT).....31

2.5 PCR para cDNA.....31

2.6 PCR para DNA.....31

2.7 Eletroforese em gel de agarose 32

2.8 PCR em Tempo Real.....32

2.9 Preparação de bactérias eletrocompetentes 33

2.10 Transformação de bactérias eletrocompetentes 34

2.11 Extração e purificação de DNA de plasmídeo.....34

2.12 Clivagem de DNA de plasmídeo.....34

2.13 Sequenciamento de DNA 35

2.14 Manutenção das células C6/36.....35

2.15 Virus dengue.....36

2.16 Infecção das células C6/36 36

2.17 Alimentação oral dos mosquitos com Dengue vírus 36

2.18 Titulação viral 37

3 RESULTADOS 38

3.1 Análise da sequência de gambicina de *Aedes aegypti* e desenho dos oligonucleotídeos para as reações de RT-PCR e qRT-PCR 38

3.2 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores 40

3.3 Análise semi-quantitativa do perfil de transcrição de gambicina durante o ciclo de vida de *Aedes aegypti* 41

3.4 Análise semi-quantitativa do perfil de transcrição de gambicina durante a infecção de *Aedes aegypti* por *Plasmodium gallinaceum.*.....42

3.5 Quantificação de transcritos que codificam para gambicina durante o ciclo de vida de Aedes aegypti e durante a infecção por Plasmodiumgallinaceum. 44

3.6 Quantificação de transcritos que codificam para gambicina durante o ciclo de vida de *Aedes aegypti* e durante a infecção por vírus dengue (DENV2). 47

4 DISCUSSÃO 52

5 CONCLUSÃO.....54

REFERENCIAS* 55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aedes aegypti

Mosquitos são insetos dípteros da família Culicidae e subfamília Culicinae sendo também conhecidos como muriçocas ou pernilongos. A sub família Culicinae tem a maior representação da família Culicidae e os mosquitos do gênero *Aedes* são os mais estudados, pois são vetores de grande importância médica, responsáveis pela transmissão da febre dengue e febre amarela urbanae chikungunya (FORATTINI, 2002).

*Aedes aegypti*é um mosquito antropofílico, doméstico e com atividade hematofágica diurna. Os adultos são alados, possuem antenas, pernas e utilizam preferencialmente água limpa para colocarem seus ovos. São mosquitos com desenvolvimento holometábolo (metamorfose completa). Na fase larval, período que dura aproximadamente de 7 a 9 dias, a larva passa por 4estadios (L1 aL4). A fase de pupa dura de 1 a 2 dias, nesse período o inseto não se alimenta e se transforma em adultos (machos e fêmeas), que tem seu corpo dividido em cabeça, tórax e abdome.Na cabeça encontram-se os olhos, antenas e palpos. No tórax estão as perna e asas que são os apêndices responsáveis pela locomoção. No abdome está a maior parte dos órgãos internos do aparelho digestório, excretor e reprodutor (FORATTINI, 2002).

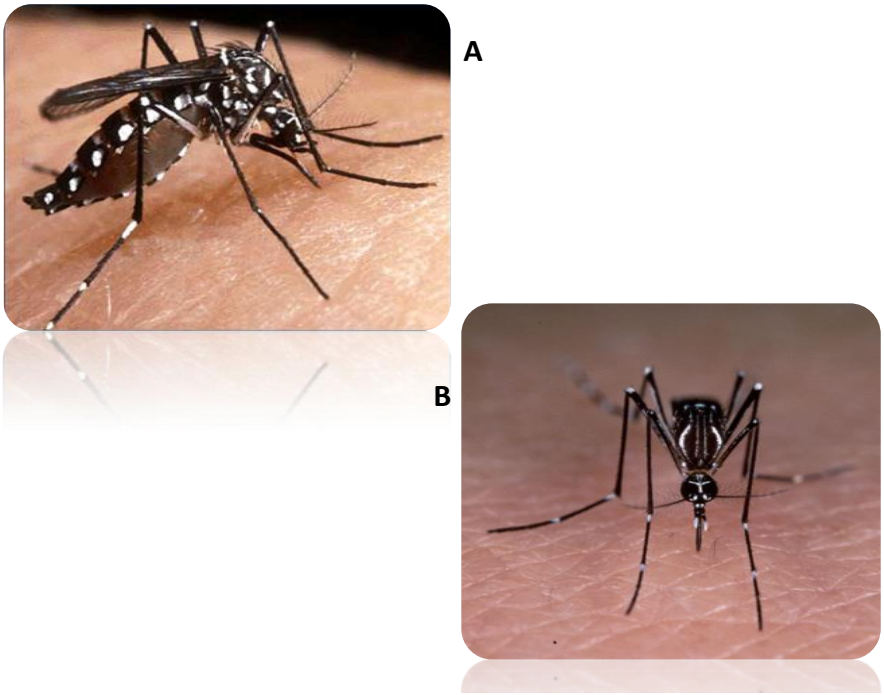


Figura 1 -A-)Fêmea adulta de *Aedes aegypti,* durante o repasto sanguíneo. B-)Escamas em forma lira presente no tórax de *Ae. aegypti*utilizada na identificação morfológica da espécie.

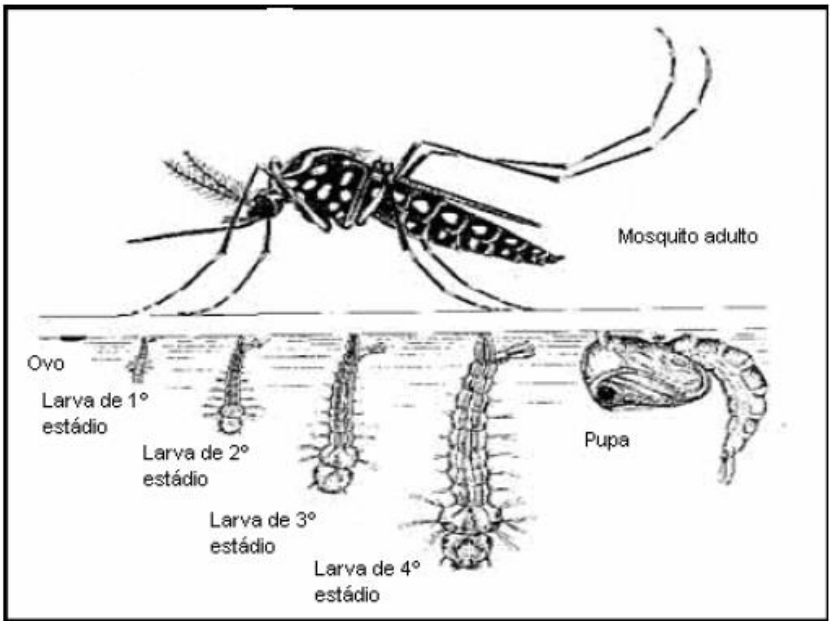


Figura 2 Ciclo de vida do mosquito Aedes aegypti

(Fonte: http://deolhonoaedesaegypti.blogspot.com.br/p/ciclo-de-vida.html)

Em condições de laboratório, os machos podem viver de 20 a 30 dias e as fêmeas aproximadamente 50 dias. As fêmeas necessitam da alimentação sanguínea para a obtenção de nutrientes necessários para a produção e maturação dos ovos e estão aptas para a oviposição 72 horas após cada repasto sanguíneo.

Ao fazer seu repasto sanguíneo o mosquito injeta sua saliva no vertebrado, esta saliva pode conter patógenos como vírus, bactérias e protozoários. Em 1881, um médico cubano, Carlos Finlay, identificou o *Aedes aegypti* como vetor da febre amarela. Hoje, sabe-se que os insetos são capazes de transmitir uma variedade de patógenos, entre eles, o vírus dengue e plasmódio, responsáveis pelos sintomas da dengue e malária, transmitindo também filarioses (FORRATINI, 2002).

1.2 Dengue

Nos últimos anos a dengue se tornou a principal arbovirose do mundo devido o aumento da sua incidência nos trópicos e sub – trópicos e sua alta morbidade .O impacto da dengue na saúde pública é enorme, pois 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas com risco diário de infecção, no Brasil, em 2013 foram notificados 204.650 casos, deste total, 324 casos foram casos graves e 33 óbitos(WORLD HEALTH ORGANIZATION,2013).

O genoma do vírus dengue é constituído por uma fita simples e positiva de RNA.Pertencente à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*. No Brasil, eles são transmitidos entre os humanos pelo mosquito *Aedes aegypti* como vetor primário e *Aedes albopictus* como vetor secundário. Já no continente Asiático o mosquito *Ae. albopictus* é o principal vetor para a transmissão do vírus. (GUBLER, 1998).

A complexidade da transmissão do vírus dengue acontece devido a existência de diversos sorotipos do vírus, DENV 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4 (REFERENCIA). Em 2007 foi detectada o sorotipo 5 (DENV 5) em um surto no estado de Sarawak na Malásia, o vírus foi sequenciado e observado que é filogenéticamente diferente dos outros quatro sorotipos. A suspeita é que este novo sorotipo circula entre macacos nas selvas da Malásia e Indonésia. O sorotipo 5 tem sido associado a apenas um

surto em humanos.(http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years). A infecção por um dos sorotipos produz imunidade permanente contra a reinfecção por esse mesmo sorotipo, entretanto a infecção sucessiva por sorotipos diferentes induz uma imunidade cruzada, isto provoca um fator de risco para o desenvolvimento de formas graves da doença (GUBLER, 1998).

Em 1950 aconteceu a primeira pandemia no sudeste asiático e em 1975, muitas crianças desta região morreram devido a dengue hemorrágica (DHF). Somente em 1980 as epidemias de febre de dengue tornaram-se comuns. Em 1990, quando foram registrados 40 milhões de casos de dengue e 100 mil casos de dengue hemorrágica, a Organização Mundial da Saúde, considerou a dengue, seguida da malária, a doença mais importante transmitida ao homem por mosquitos (WHO 2006).

1.3 Multiplicação do *Dengue vírus* no vetor

Os mosquitos adquirem o *Dengue vírus* após ingestão de sangue contaminado do hospedeiro vertebrado. As partículas virais se infectam e se replicam nas células epiteliais do intestino médio do mosquito (Fase de infecção). Após estabelecer a infecção neste órgão, deixam o intestino e passam para a hemocele podendo alcançar as glândulas salivares através da corrente hemolinfática ou após infectar os órgãos secundários como os ovários e o corpo gorduroso (Fase de disseminação). Por fim, os vírus são liberados das células epiteliais das glândulas salivares e são transmitidos juntamente com a saliva para um novo hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo (BLACK IV*ET AL*., 2002; GUBLER*ET AL.*, 2007; WOODRING*ET AL*., 1996;).

1.4 Malária

O termo malária é proveniente da expressão “mau-ar” e teve origem na Itália, onde acreditavam que a causa da doença era os vapores vindo dos pântanos. A doença também é conhecida como paludismo, tremedeira, febre palustre(NEVE,et al.,2000).

A malária está presente mais de 100 países que estão localizados nas áreas tropicais e sub-tropicais do globo terrestre, cerca de metade da população mundial está sob o risco de contrair a doença, entre eles crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas. Estima-se que 665.000 pessoas morreram em 2010 decorrente desta enfermidade. (WHO, 2011).

O agente causador da malária é um protozoário que pertence a ordem Coccidiia, sub ordem Haemos piridiiea, família Plasmodiidae, gênero Plasmodium. Nas Américas a malária é causada principalmente pelo *Plasmodium vivax*, porém, as infecções causadas pelo *Plasmodium falcipaum* desenvolvem as formas mais graves da doença, que podem levar a morte, mas em menor frequência. Há também outras espécies de *Plasmodium* que infectam o homem: *P. ovale, P. malariae* (WHO, 2006).

A transmissão do protozoário ocorre pela picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles.* Em todas as regiões endêmicas para malária, encontramos mais de 60 espécies de anofelinos, na África o principal vetor é o *Anophelesgambiae*, no Brasil, na região amazônica, o principal vetor *é An. darlingi* (HOLT et al., 2002).

Os parasitos são passados para o homem, pela picada de um mosquito infectado que inocula juntamente com a saliva, os esporozoitas (forma infectante do *plasmodium*) . Aproximadamente 1 hora após a inoculação, as formas infectantes alcançam o fígado, não sendo mais encontrados no sangue, no interior das células hepáticas ocorre a primeira divisão assexuada e passam a ser chamados de esquizontes, ao final da esquizogonia milhares de novos parasitas, denominados merozoítas são formados, processo que dura de 6 a 16 dias. Os merozoítas invadem as hemácias e iniciam um novo ciclo de reprodução assexuada (ciclo eritrocítico). Algum tempo após a infecção, aparecem no interior das hemácias algumas formas que não se dividem, os gametócitos (STURM et al., 2006).

No invertebrado, o ciclo inicia-se quando uma fêmea anofelina realiza um repasto sanguíneo em um homem infectado e ingere junto com o sangue as formas gametocíticas do parasita que invadem o intestino médio do mosquito onde sofrem maturação dando origem a micro e macro gametócitos que após fecundação formarão um zigoto diplóide. O zigoto amadurece se diferenciando em oocineto, a forma móvel do parasita. O oocineto atravessa a matriz peritrófica do intestino e atinge a parede do epitélio intestinal onde se transforma em oocisto. Nesta fase, inicia-se a esporogonia, onde são formados milhares de esporozoítas, que são liberados na hemolinfa quando ocorre a ruptura do oocisto maduro. Os esporozoítas invadem as glândulas salivares e estão prontos para serem inoculadas no hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo (SIDEN, 1999).

Outros vertebrados, além dos humanos, podem desenvolver a malária por outras espécies de *Plasmodium*. Dentre estes vertebrados estão, dois modelos utilizados em pesquisa, camundongos (*Mus musculos)* infectados por *P. berghei*ande o vetor invertebrado é o *An.stephensi* e galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*)infectadas por *P.gallinaceum* onde nesse caso o vetor invertebrado é o *Aedes aegypti*.

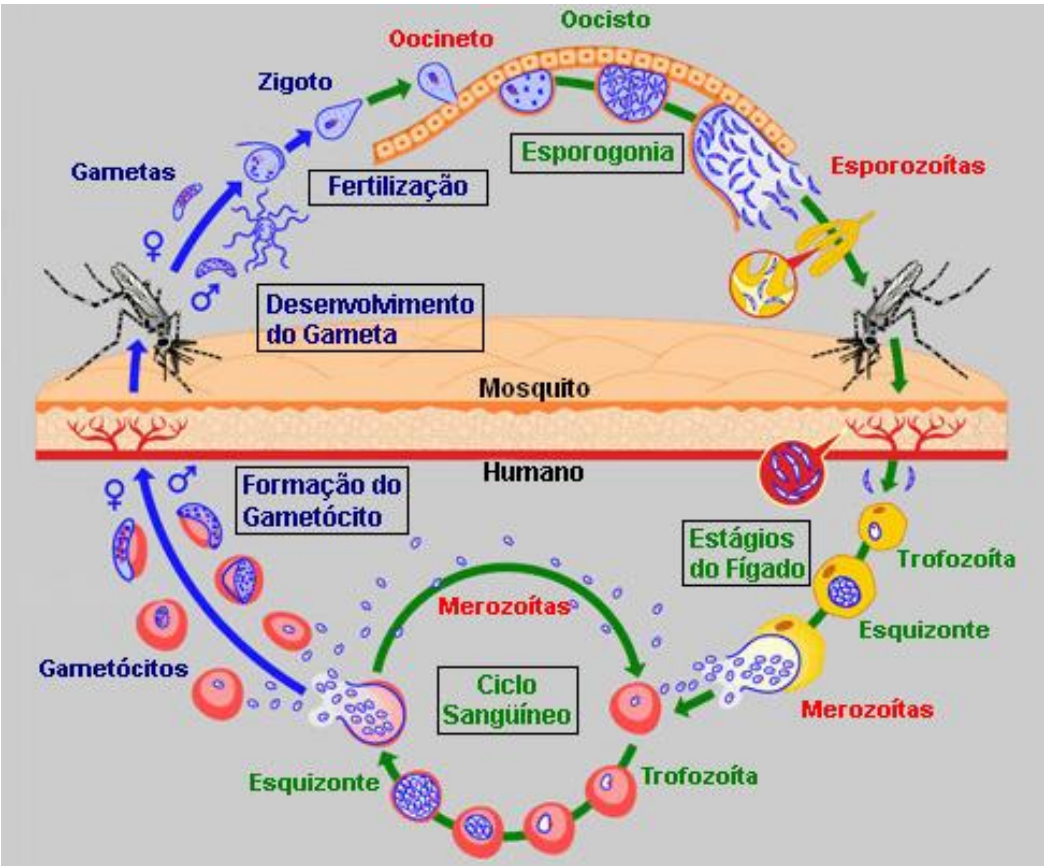


Figura 3-Ciclo do Plasmodium

1.5 Sistema imune dos mosquitos

Todos os insetos, inclusive os mosquitos,possuem um sistema imunológico inato que é ativado na presença de um patógeno, seja ele uma bactéria, vírus, protozoário ou fungo. A resposta imune inata dos insetos é largamente regulada por três principais vias de sinalização imune: a Tol, a Imunodeficiência (IMD) e via JAK-STAT, que é um sinal transdutor e ativador de transcrição Janus kinase(DIMOPOULOS, 2010;SIM; TZOU,et al., 2001).

A via Toll esta envolvida na defesa contra fungos, bactérias Gram-positiva e vírus. Estudos recentes mostraram que essa via também está envolvida com a resposta anti-vírus dengue (anti-DENV) em *Aedes aegypti*. Já a via IMD tem um papel importante na produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), que controla a infecção por bactérias Gram-negativas.Essa via foi amplamente estudada no modelo *Drosophila melanogaster* infectada com o vírus Sindbis (SINV) (SIM; DIMOPOULOS,

2010). Alguns autores mostraram que a via JAK-STAT está relacionada na defesa antiviral em insetos, inclusive contra DENV em *Ae. aegypti*(SIM; DIMOPOULOS, 2010; SOUZA-NETO, et al., 2009).

Estudos realizados com mosquitos infectados com plasmódios apontam que esses insetos também apresentam mecanismos efetores de resposta imunológica, dentre os quais podemos citar a melanização. Neste mecanismo moléculas secretadas principalmente pelo corpo gorduroso e hemócitos, geralmente carregadas positivamente, ligam-se à parede da bactéria, causando danos à membrana celular e/ou sua permeabilização. Em mosquitos, esse tipo de ativação do sistema imune foi observado em *Anopheles gambiae* infectados por *Plasmodium berghei*(DIMOPOULOS, et al., 1998; RICHMAN, et al., 1997). A cascata de serino protease é ativada através de enzimas secretadas pelos hemócitos para a hemolinfa, causando a conversão proteolítica da profenoloxidase em fenoloxidase. Essa, por sua vez ativa a formação de intermediários reativos de quinona para a síntese de melanina. Como consequência, os parasitos são imobilizados por uma cápsula de melanina e mortos, provavelmente, devido à formação de radicais livres e moléculas tóxicas liberadas durante a formação da cápsula (CHRISTOPHIDES,et al., 2002; MICHEL, et al., 2005; MULLER, et al., 1999).

1.6 Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

Peptídeos antimicrobianos são moléculas que agem contra organismos invasores como bactérias, fungos, vírus e parasitas. Estes peptídeos são pequenos, com massas moleculares menores que 10 k Da geralmente catiônicos e na maioria das vezes são anfipáticos, possuindo tanto um domínio hidrofílico quanto hidrofóbico. Devido a estas características estruturais, o alvo destas moléculas geralmente é a membrana dos organismos invasores.

Em 1939, Dubos extraiu um agente antimicrobiano da cepa de *Bacillus sp* de solo, este extrato demonstrou proteção durante uma infecção causada por *Pneumo cocus* em ratos. Este novo peptídeo antimicrobiano foi nomeado como gramicidina.

Em animais, o primeiro peptídeo antimicrobiano descrito foi a defensina, isolado de leucócitos de coelho em 1956(HIRSCH, 1956). Após alguns anos a bombinina do epitélio e lactoferrina do leite da vaca foram relatados como peptídeos

com atividade antimicrobiana. Nessa mesma época, foi demonstrado que os leucócitos humanos também continham AMPs em seus lisossomos. Até o ano de 2013 mais de 5.000 peptídeos antimicrobianos foram descritos.

AMPs são encontrados em procariontes (bactérias) e eucariontes (protozoários, fungos, insetos, plantas e animais). Em animais, os AMPs são encontrados em tecidos e órgãos expostos a patógenos, fazendo parte da imunidade inata contra fungos, bactérias e vírus(LEIPPE, 1999).

A maioria dos AMP sé produzida por células específicas constitutivamente, entretanto, pode haver indução dessa produção para alguns desses peptídeos.Em um modelo utilizando o bicho da seda,(*Bombyx mori)*, pesquisadores demonstraram que os peptídeos P9A e P9B podem ser induzidos na hemolinfa por injeção com *Enterobacter cloacae*(ANGELES, 2003). Em outro estudo, células epiteliais de ratos mostraram o aumento na taxa de transcrição de mRNA de defensina após a infecção com *Pseudomas aeruginosa*(ANGELES, 2003).

Entre as células eucariontes envolvidas na produção de AMPs, podemos destacar células epiteliais do sistema gastrointestinal, fagócitos e linfócitos do sistema imune. Lipopolissacarídeos (LPS) liberados a partir de bactérias, podem induzir a produção de AMPs em mamíferos, por exemplo células HEK293, que produzem defensina quando estimuladas por LPS(ANGELES, 2003).

1.6.1 Estrutura de peptídeos antimicrobianos

A maioria dos AMPs relatados até o momento pode apresentar estruturas secundárias descritas como: β – (folha pregueada), α – (Hélice) (HSU et al., 2005)

Alguns AMPs podem conter dois componentes estruturais diferentes, onde a conformação final ativa muitas vezes depende da muitos formam sua estrutura ativa quando interação com a membrana da célula alvo. Por exemplo, indolicina mostra conformação globular e anfipática em solução aquosa, mudando sua conformação durante interação com DNA (HSU et al., 2005).

Peptídeos antimicrobianos atingem a camada de lipopolissacarídeo da membrana celular de patógenos matando em poucos segundos após o contato inicial(NAGHMOUCHI et al., 2012).Peptídeos sintéticos são produzidos por síntese química, ou por expressão recombinante. Estes peptídeos artificiais são úteis para a modificação de peptídeos existentes e criação de novos peptídeos sintéticos colaborando para novos estudos com AMPs (BROWN; PIERS; HANCOCK, 1993; RAMOS et al., 2012; WADE et al., 2012)..

Apesar das vantagens das características apresentadas pelos peptídeos, ainda existem alguns desafios para a sua aplicação, tais como, toxicidade para humanos(MATSUZAKI, 2009; PACOR, 2002),sensibilidade a condições ambientais(SIEPRAWSKA-LUPA et al., 2004; SVENSON et al., 2008) e custo de sua produção. (BOMMARIUS et al., 2010).

1.6.2 Modo de ação

Alguns mecanismos de permeabilização da membrana bacteriana foram descritos.

No mecanismo chamado de “agregado”, os peptídeos se ligam na membrana lipídica e se inserem na bicamada lipídica, formando canais que não obedecem padrõesnemde tamanho e nem de orientação. Dessa forma, eles são capazes de fazer uma translocação pela membrana e migram da membrana externa para membrana interna. Este mecanismo é proposto para alguns peptídeos que agem no interior das membranas celulares impedindo a síntese de DNA e RNA ao interagir com o ribossomo do parasita inibindo o prolongamento da cadeia proteica.

O mecanismo poro toroidal, é onde os peptídeos se inserem na bicamada com orientação perpendicular aos lipídeos para que ocorra a formação dos poros por onde é extravasado o conteúdo intra-celular.

No mecanismo conhecido como “barril”, várias moléculas interagem perpendicularmente com o plano da membrana microbiana formando poros onde ocorre o vazamento do conteúdo intracelular levando a célula à morte celular.

Outro mecanismo, conhecido por “carpete”, para esse mecanismo é necessário que tenha um acúmulo de uma certa quantidade de peptídeos na superfície da membrana, então ocorre um tipo de ação detergente que causa a solubilização de fragmentos da bicamada podendo remover grandes porções da membrana.

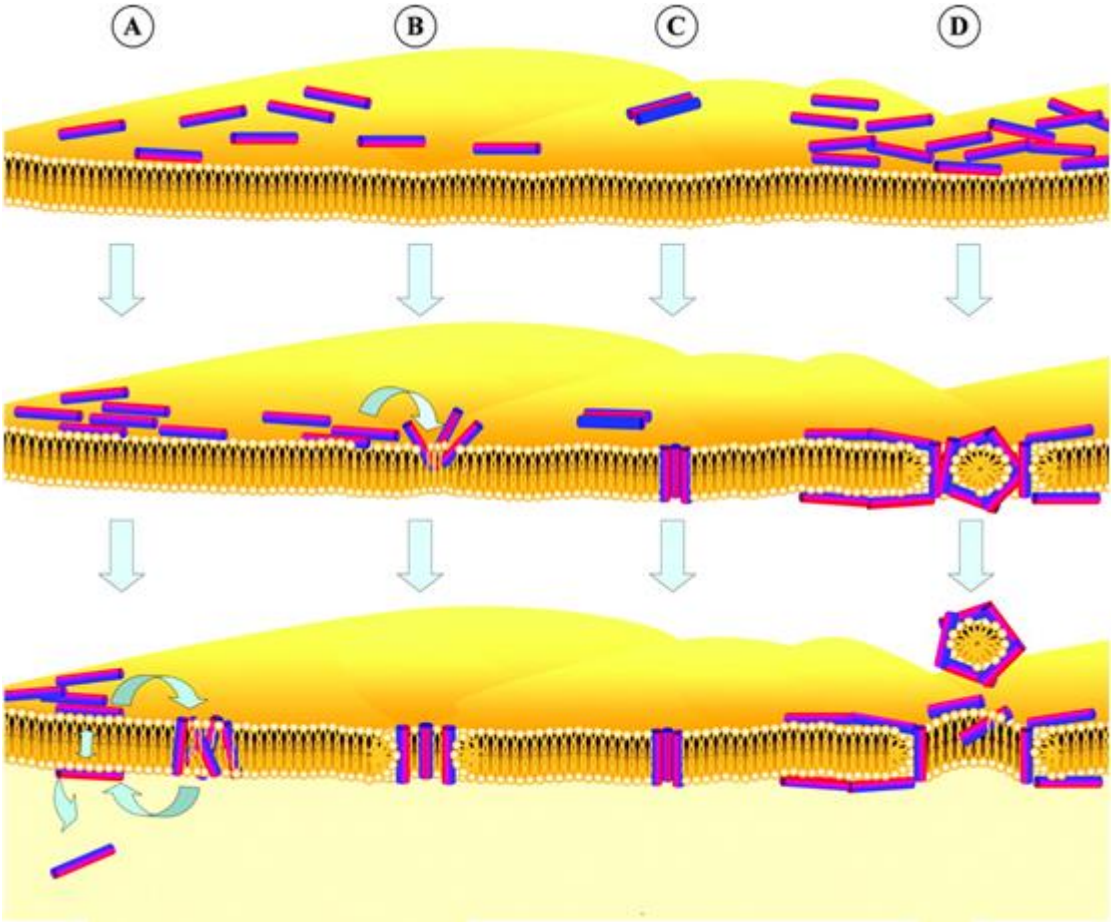


Figura 4- Mecanismos de ação dos Peptídeos Antimicrobianos

A) Agregado; B) Poro toroidal: C) Barril : D) Carpete

1.6.3 Peptídeos Antivirais

Peptídeos antivirais neutralizam vírus se integrando tanto no envelope viral ou na célula hospedeira. Ao integrar envelopes virais, os peptídeos causam instabilidade na membrana tornando os vírus incapazes de infectar células hospedeiras (ROBINSON et al., 1997).Alguns peptídeos que apresentam este mecanismo são: dermaseptina encontrada em rãs, defensinas de humanos e coelhos no combate do vírus da herpes (VSH) e indolicidina de bovinos.

AMPs também podem reduzir a ligação dos vírus com as células hospedeiras, por exemplo, defensinas ligam às glicoproteínas virais fazendo com que o vírus seja incapaz de se ligar as células hospedeiras (YASIN et al., 2004) .

Alguns peptídeos também podem impedir partículas virais a partir da célula hospedeira ocupando lugar de receptores específicos das células impedindo a ligação com as partículas (SONG et al., 2001).

.

1.6.4 AMPS com atividade antibacteriana

Peptídeos antimicrobianos são anfipáticos com domínios hidrofílicos e hidrofóbicos, que fornecem a capacidade de se ligarem em componentes lipídicos (região hidrofóbica) e grupos de fosfolipídios (região hidrofílica)(JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

Outro mecanismo utilizados por peptídeos é inibindo algumas vias de grande importância dentro da célula como a replicação de DNA e a síntese de proteínas, isso ocorre com a buforina II que podem se difundir dentro da célula e se ligam no DNA e RNA sem destruir a membrana plasmática(KRAGOL et al., 2001; OTVOS et al., 2000).

Em alguns casos peptídeos antimicrobianos se mostraram eficientes para matar bactérias resistentes a antibióticos. Um exemplo é o peptídeo nisina e o antibiótico vancomicina, ambos podem bloquear a síntese da parede celular. Uma cepa de *Staphylococcus aureus* se mostrou resistente ao antibiótico vancomicina, no entanto, a mesma cepa ainda está sensível ao peptídeo nisina(BRUMFITT, 2002).

1.6.5 AMPs com atividade sobre parasitas

O primeiro peptídeo antiparasitário relatado foi a magainina que é capaz de matar *Paramecium caudatum*(ZASLOFF, 1987).

Mais tarde um peptídeo sintético foi desenvolvido contra a *Leishmania.* Mesmo em parasitas multicelulares, o mecanismo de ação dos peptídeos é o mesmo descrito para bactérias e vírus, matando as células por interação com a membrana celular(PARK et al., 2004).

1.6.6 AMPs isolados e caracterizados em insetos

AMPs são estudados em muitos artrópodes. No conteúdo da hemolinfa e no tubo digestivo do carrapato bovino *Boophilus microplus*, foi encontrado um peptídeo antimicrobiano que atua contra bactérias gram-positivas e fungos. Outros peptídeos também foram isolados e caracterizados a partir do escorpião *Androctonus australis*, sendo que dois deles são peptídeos novos e outro é um representante da defensina que aparece em insetos (EHRET-SABATIER et al., 1996).

A atividade da gomesina, um peptídeo antimicrobiano isolado a partir dos hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, foi testada contra as formas assexuadas, sexuadas e pré-esporogônica de *Plasmodium falciparum* e *P. berghei*. A gomesina inibiu in vitro o crescimento das formas intra eritrocíticas de *P. falciparum*, diminuiu significativamente a formação de oocinetos quando foi

adicionado na cultura in vitro de gametócitos maduros de *P. berghei* e, in vivo, reduziu o número de oocistos de ambas espécies, *P. berghei* e *P. falciparum*, em *A. stephensis* (MOREIRA et al.,2007) .

Em *An. gambiae*, após 20-30 horas da ocorrência de infecção em por *P. berghei*, acontece uma resposta do sistema imunológico do mosquito contra o parasita. Os níveis de mRNAs que codificam a defensina são aumentados, esta resposta é ativada após a infecção tanto no intestino médio como em tecidos corporais restantes (DIMOPOULOS et al., 1997).

A defensina é um peptídeo que apresenta em sua composição 40 aminoácidos. Em *Ae. aegypti* encontramos a defensina A, B e C, que se diferem por causa da sequência de aminoácidos presentes nos peptídeos maduros (FALLON ; SUN, 2001).

A cecropina, peptídeo da imunidade inata do mosquito, é um peptídeo pequeno que contém de 35-39 aminoácidos e assim como seus derivados sintéticos, exibem atividades contra bactérias gram- negativas, gram- positivas, fungos filamentosos,leveduras, *Plasmodium sp*. e*Trypanossoma sp*. (VIZIOLI et al., 2000).

Estudos mostraram que a expressão dos dois peptídeos antimicrobianos, a cecropina A e a defensina A, sob controle do promotor do gene de vitelogenina (que faz aumentar a produção destes peptídeos quando o mosquito se alimenta de sangue) em *Ae. aegypti* infectados por *P.gallinaceum*, reduziram drasticamente o número de oocistos no intestino médio e nenhum esporozoíto foi encontrado nas glândulas salivares dessas fêmeas infectadas. Além disso, ao realizar experimentos de infecção em galinhas se observou que a transmissão foi completamente bloqueada (KOKOZA et al., 2009).

1.6.7 Peptídeo Antimicrobiano: Gambicina

A gambicina foi descrita primeiramente em *An.gambiae*. Expressa predominantemente no intestino médio,também é encontrada no tórax e abdome (REF). Esses autores mostraram que a expressão de gambicina, durante a infecção

por *P.berghei*, é induzida tanto nos estágios precoces como nos estágios tardios da infecção.Além disso, mostraram que gambicina é secretada por hemócitos e está presente em duas formas, oxidada e não-oxidada.Utilizando culturas celulares “in vitro” esses autores também mostraram que gambicina atua em bactérias gram-negativas, gram-positivas e mostra letalidade para oocinetos de *P.berghei* (VIZIOLI et al., 2001).

Um estudo de RNA de interferência em *An. Gambie* para analisar a regulação de genes que codificam AMPs*,* silenciou um domínio de REL 2 da via IMD, mostrrando que a expressão gambicina foi reduzida significativamente e a super expressão do mesmo domínio aumentou a expressão do peptídeo, sugerindo que a gambicina parece ser regulada pela via IMD (LUNA et al., 2006).

Uma gambicina homóloga a gambicina de *An.gambiae* foi encontrada em *An.albimanus*(GARCÍA GIL DE MUÑOZ et al., 2008). Esses autores mostraram que esse peptídeo é expresso constitutivamente no intestino médio e no corpo gorduroso desse mosquito. Este estudo observou o efeito de prostaglandina na modulação e expressão de peptídeos antimicrobianos, mostrando que este composto ao ser adicionado em culturas de intestino médio e corpo gorduroso de *An. albimanus*, diminui os níveis de RNA mensageiro da gambicina. (GARCÍA GIL DE MUÑOZ et al., 2008).

Em *Culex pipens pipiens* foi encontrada uma sequência com 71% de identidade com a sequência da gambicina descrita em *Anopheles gambiae* (BARTHOLOMAY et al. 2003), sendo que os transcritos estão presentes na hemolinfa, intestino médio e nos corpos gordurosos.Esses autores mostraram que em mosquitos *Cx. Pipiens pipiens* não infectados por patógenos, transcritos de gambicina praticamente não são detectados. Entretanto, são altamente ativados 6h após inoculação de bactéria e atingindo seu pico 24h após inoculação.

Em Aedes *aegypti,*infectados por *Micrococus luteus*, a gambicina não modifica seus níveis de expressão, porém, quando infectados por *Echerichia colli*, a gambicina tem um aumento de seua expressão 8 horas após a infecção.(BARTHOLOMAY, 2007).Este trabalho vai analisar a expressão dos transcritos de gambicina em Aedes aegypti infectados por *Plasmodium gallinaceum* e Vírus dengue.

2 MATERIAL e MÉTODOS

2.1 Animais

2.1.1 Aedes aegypti

A colônia dos mosquitos da espécie *Aedes aegypti* foi mantida no Biotério de insetos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II – ICB II – da Universidade de São Paulo – USP. Os mosquitos foram mantidos sob a temperatura de 28°C +- 1°C, umidade relativa do ar de 80% +- 10%. As larvas foram eclodidas de maneira sincronizada em água autoclavada armazenada em frasco fechado hermeticamente. Após a eclosão foram mantidas em recipientes plásticos com água destilada e alimentadas diariamente com ração para peixes moída (TETRAMIN) até alcançarem o estágio de pupa.

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

As fêmeas foram mantidascom sacarose 10% (p/v) e para o repasto sanguíneo foi utilizado camundongos ou pintainhos.

2.1.2 Camundongos e Pintainhos

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

As aves *Galus galus domesticus* (pintainhos com 1 dia de idade) fornecidos pela granja Kunitomo Mogi das Cruzes, SP – BR) foram mantidos no Biotério de aves do Departamento de Parasitologia (ICB II – USP) à 26°C e 60% de umidade relativa do ar. Estes pintainhos foram alimentados com ração livre de antibióticos e antiparasíticos e água.

2.2 *Plasmodium gallinaceum*

Amostras de sangue contaminado com *P.gallinaceum*, foram utilizadas para infectar pintainhos de dois dias de idade. A partir do 7° dia após a inoculação, foram feitas lâminas de esfregaço sanguíneo coradas com Giemsa e a parasitemia foi determinada através da contagem do número de células parasitadas/total de células contadas, através da microscopia óptica usando aumento de 1000x. Pintainhos com 5-10% de parasitemia foram anestesiados e utilizados no repasto sanguíneo de grupos de fêmeas de *Ae.aegypti* por 30 minutos. O pintainho infectado utilizado na alimentação dos mosquitos foi sacrificado em câmara de CO2. Os mosquitos foram anestesiados, colocados em placa de Petri e mantidos no gelo para separação de fêmeas ingurgitadas e não alimentadas. Sete dias após o repasto, de 5 a 10 fêmeas tiveram seus tratos digestórios dissecados e os tecidos foram analisados para contagem de oocistos e para verificação da infecção do grupo alimentado, através da microscopia de contraste de fase.

2.3 Extração de RNA

O RNA total foi extraído utilizando Trizol® (Invitrogem) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram processadas de acordo com cada experimento.Para analisar a expressão de acúmulo de transcritos da gambicina nas fases de desenvolvimento do mosquito,a extração do material foi realizada em um número diferente para cada uma fase de desenvolvimento, devido o tamanho de cada fase.Extração de um grupo de 100 larvas no estádio L1, L2, L3, um grupo de 10 larvas L4, pupas macho, pupas fêmeas, mosquitos machos e fêmeas com 5 dias após a emersão alimentados com sacarose e de fêmeas alimentadas com sangue 24, 48 e 72 horas após o repasto.Para o experimento que avalia o acúmulo de transcritos de gambicina em mosquitos infectados com *Plasmodium gallinaceum*, o RNA total foi extraído de um grupo de 10 mosquitos para os intervalos de 24, 48, 72

horas, 7 dias e 13 dias após a alimentação sanguínea em pintainhos infectados e pintainhos sadios utilizados como controle.

Após extração das amostras de RNA, o material foi quantificado em nano drop® e armazenado a -80 ^{o}C até a sua utilização.

2.4 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

Para realização desta técnica foram utilizados 2µg de RNA total para amplificação em uma solução com 1µL de oligo DT (0,5 mg/ml), 1µL 10 mMdNTPs. O RNA foi incubado por 5 minutos em uma temperatura de 65°C. Após esse tempo foiadicionado 4µL de Tampão de Super Script II Plantium (Descrever o tampão)Taq 5X e 2 µL de DDT 0.1M a solução foiincubada por 2 minutos à 42°C. Em seguida foi adicionada 1µL de Super Script II Platinum Taq 100 u e incubação de 50 minutos a 42°C e 15 minutos à 70°C. O produto final foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

2.5 PCR para cDNA

Ao (2µl) foram adicionados 16,8 µl de água MiliQ, 2,5 µl de tampão para PCR(descrevero tampão), 1,0 µl de Cloreto de magnésio (Concentração), 0.5 µl de dNTP 10mM, 1,0 µl de oligonucleotídeo iniciador 5’10mM (Gambi-1 ATGACACCACCCCAATTTGT), 1.0 µl de oligonucleotídeo iniciador 10mM (Gambi-2 CGATGTAGCATTCGGTGATG), 0.2 µl de Taq DNA polimerase 5 u/µl. Os seguintes ciclos térmicos eram realizados: 1 ciclo a 94ºC por 2 minutos, 30 ciclos a 94ºC por 1 minuto, 62ºC por 30 segundos, 72ºC por 1 minuto e incubação final a 72ºC por 10 minutos.

2.6 PCR para DNA

Ao DNA (1 µl) foram adicionados 17,8 µl de água MiliQ, 2,5 µl de tampão para PCR, 1,0 µl de Cloreto de magnésio (Concentração), 0.5 µl de dNTP 10mM, 1,0 µl

de oligonucleotídeo iniciador 5’10mM (Gambi-1 ATGACACCACCCCAATTTGT), 1.0 µl de oligonucleotídeo iniciador *10mM (*Gambi-2 CGATGTAGCATTCGGTGATG), 0.2 µl de Taq DNA polimerase. Os seguintes ciclos térmicos eram realizados: 1 ciclo a 94ºC por 2 minutos, 30 ciclos a 94ºC por 1 minuto, 62ºC por 30 segundos, 72ºC por 1 minuto e incubação final a 72ºC por 10 minutos.

2.7 Eletroforese em gel de agarose

As amostras foram previamente preparadas com a adição de 1/5do volume de tampão de amostra Orange G (Fabricante). A eletroforese era realizada em gel composto de agarose (Invitrogen) 1,0% (p/v), dissolvida em TBE 1x (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 50mM).Para solubilização completa da agarose, a mistura foi aquecida em forno microoondase posteriormente foi adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/ml). A solução foi transferida para o molde da cuba de eletroforese horizontal e após solidificação a cuba foi preenchida com tampão TBE1x até o gel ser coberto e as amostras forem aplicadas. O marcador utilizado nas eletroforeses foi o 1Kb plus DNA ladder (Invitrogem). A eletroforese foi realizada através de uma voltagem constante(100V) por um período de 1 hora. Em seguida, a visualização dos fragmentos era realizada com o auxilio de um aparelho transiluminador ultravioleta UV Transiluminador (UVP, Upland, CA, USA) e documentado em câmera fotográfica digital Olympus SP-350 (Olympus, Tóquio, Japão).

2.8 PCR em Tempo Real

Iniciadores específicos para essa reação (Descrever os oligos) foram desenhados, e as amplificações (150 pb) foram ligados novetor (TOPO® PCR Cloning) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os fragmentos foram confirmados por sequenciamento. O DNA dos plasmídeos foi linearizado por tratamento com a enzima de restrição *Xba*I (Invitrogen). Os plasmídeos linearizados,foram quantificados e a concentração utilizadas para a

obtenção da curva padrão dos ensaios foi obtida de acordo com a fórmula:Vi.Ci=Vf.Cf

Foram realizadas diluições seriadas de 1ng a 0,01pg. Para a reação de qRT-PCR, foram utilizados 1.0µl de cDNA obtidos a partir do RT-PCR das amostras experimentais,1,0µl de oligonucleotídeos iniciador foward, 1,0µl de oligonucleotídeo iniciador reverse, na concentração de 20pmol, para as reações de gambicina e para as reações de actina 1. O Kit SYBR Green ® (invitrogem) foi utilizado, seguindo protocolo do fabricante. Os seguintes ciclos foram realizados: 1 ciclo de 95ºC por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 94ºC por 30 segundos , 62ºC por 30 segundos e 72 ºC por 30 segundos, seguido do passo para a realização da curva de dissociação (curva de melting).

2.9 Preparação de bactérias eletrocompetentes

A partir do estoque de bactérias *Escherichia coli*(cepa DH5α) armazenado a -80 ºC, obteve-se um pré-inóculo que foi semeado em 5ml de meio de cultura LB liquido (10 g de triptona, extrato de levedura 5g e NaCl 5g para 1L) e incubado sob agitação a 37 ºC por 16 horas. A cultura total saturada foi adicionada em 500 ml de meio LB liquido e a mistura foi incubada sob agitação a 37 ºC até atingir uma $DO600_{nm}$igual a 0,6.

A cultura foi incubada em gelo por 30 minutos e em seguida foi centrifugada por 5 minutos a 7000 xg a 4 ºC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as bactérias sedimentadas foram ressuspendidas em 500 ml de água gelada. As células novamente centrifugadas como descrito anteriormente foram ressuspendidas em 250 ml de água gelada. O material foi levado ao último passo de centrifugação sob as mesmas condições e finalmente as bactérias foram ressuspendidas em 1,5 ml de solução de glicerol 10% (v/v). Microtubos foram colocados em gelo e as bactérias preparadas foram aliquotadas (20 µl/microtubo), congeladas em banho de gelo seco e armazenadas a -80 ºC até o momento do uso.

2.10 Transformação de bactérias eletrocompetentes

À alíquota (20µl) de bactérias eletrocompetentes foi adicionado um volume de 5µl da reação de ligação e a mistura foi despejada em cubeta de eletroporação de 0.2 mm (Bio-Rad, Hercule, CA, USA). A cubeta foi colocada em eletroporador Cellject Hybaid (BioscienceTecnology, Rockaway, NJJ, 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 liquido, e a mistura foi transferida para um tubo de cultura e mantida a 37ºC por 1h em agitação suave. Após este período as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo IPTG 1mM, ampicilina 10% e X-Gal 30 µg/ml.

2.11 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 3ml de LB liquido contendo 3 µl de antibiótico 10% e a mistura foi incubada sob agitação a 37ºC por 16 horas. Ao término da incubação, 1,5ml da cultura foi centrifugado por 1 minuto a 12.100 xg. O sobrenadante foi descartado e as bactérias sedimentadas foram lisadas para recuperação e purificação do DNA de plasmídeo com o uso do kit QIAGEM Plasmid Mini Kit (QIAGEM) de acordo com as instruções do fabricante.

2.12 Clivagem de DNA de plasmídeo

Amostras de DNA de plasmídeo (0,1µl a 1µl/mg) foram digeridas com o uso de enzimas de restrição Invitrogem, em condições descritas pelos fabricantes. Em reações com volume final de 20µl, as digestões foram incubadas na temperatura de 37ºC por 1 hora. Todos os produtos de digestão foram conferidos por eletroforese em gel de agarose no item 2.7.

2.13 Sequenciamento de DNA

Os clones de interesse purificados foram utilizados como molde nas reações de sequenciamento realizadas com kit BigDay® Terminador v3.1 Cycle sequencing Kit (AppliedBiosytems, Carisbab, CA, USA) conforme manual do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Biometra® (Biometra) e o programa foi configurado com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 96ºC por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 96ºC por 15 segundos, anelando a 50 ºC por 15 segundos e extensão a 60ºC por 4 minutos.

Finalizada a etapa da reação de sequenciamento, a precipitação dos produtos foi efetuada. Para isso a cada reação foi adicionado 90µl de isopropanol 66% (v/v) , incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente num local protegido de incidência de luz. As amostras foram então centrifugadas a 15.300 xg por 20 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e ao precipitado foram adicionados 150µl 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 (AppliedBiosystems) e as sequências obtidas foram analisadas no programa Seqman (Software DNAStar, Lasergene).

2.14 Manutenção das células C6/36

A linhagem celular contínua C6/36 originárias de trato digestivo de larvas de mosquitos *Aedes albopictus,*foi cultivada em meio Leibovitz (L-15, Gibco) contendo antibióticos 1% (Gibco), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB, Gibco) e mantido à 28 ºC sem CO_2.

2.15 Virus dengue

A cepa do vírus utilizada para os experimentos foi DENV-2 ACS-46, na qual o estoque viral possuía menos de 8 passagens em cultura de células C6/36 e gentilmente cedida pelo Instituto de Medicina Tropical - USP.

2.16 Infecção das células C6/36

Realizamos a infecção das células C6/36 segundo Das et al., 2007 com algumas modificações. Células C6/36 foram cultivadas em frasco de 75cm² até atingir 80% de confluência. O estoque viral foi adicionado a cultura com multiplicidade de infecção (MOI) de 1 partículas/célula. O frasco foi agitado por 15 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, incubado por 45 minutos a 37ºC. Após este período, foi adicionado meio L15 contendo 2% SFB e incubado por 7 dias a 28ºC. A infecção foi observada através da presença do efeito citopático (formação de sincícios) característicos da presença da infecção viral na cultura de células. Neste momento, o sobrenadante da monocamada foi coletado e imediatamente congelado à -80 ºC até o momento dos experimentos. O mesmo procedimento foi realizado em cultura de células sem a adição do vírus para serem utilizadas como controle.

2.17 Alimentação oral dos mosquitos com Dengue vírus

Fêmeas adultas com 5 dias após a emergência, foram desprovidas de solução de sacarose 10% por 24 hs. Uma solução contendo eritrócitos humanos citratados, sobrenadante de cultura celular infectado com DENV e soro humano inativado na proporção de 10:10:1, respectivamente, foi oferecida as fêmeas através do sistema artificial *Glytube* como descrito por Costa-da-Silva et a., 2013 durante 30 minutos. O grupo controle foi alimentado com o sobrenadante da cultura celular não infectada. Após a alimentação, as fêmeas foram separadas e mantidas com solução de sacarose 10%.

2.18 Titulação viral

Para a realização da titulação utilizando imunodetecção de formação de foco (*Foci-forming Immuno detection Assay– FFU*) o sobrenadante da cultura celular infectada por DENV foi diluído de forma seriada e adicionado em placas de titulação de 24 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland) contendo 1,1 x 10^5 células C6/36 em cada poço. Após 1h e 30 min, uminóculo foi removido e adicionado meio contendo L15 suplementado com 10% de SFB, 0.52% de triptose, antibióticos e antimicóticos 1X (Gibco), 1.6% carboxi metilcelulose (CMC). A imunomarcação foi realizada após 7 dias utilizando anticorpo monoclonal 4G2 específico para o grupo *Flavivirus* (hybridoma D1-4G2-4-15, ATCC HB-112) e anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina (Promega, Madison, WI, USA). A revelação foi realizada utilizando como substrato a solução NBT (nitro bluetetrazolium chloride) e hggb\h eBCIP (5-bromo-4-chloro-39-indolyphosphate p-toluidinesalt) (Promega, Madison, WI, USA). Os focos foram contados e expressos como FFU C6/36/ml. Todo procedimento foi realizado em duplicata (Desprèset al., 1993).

Para a realização da titulação pelo ensaio de formação de placa (*Plaque–formingunits – PFU*) foram utilizadas de 2 x 10^5 células LLCMK2 em placas de 6 poços mantidas com meio Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEN - Gibco), contendo antibióticos e antimicóticos 1X suplementado com 1% soro fetal bovino à 37 ºC com 5% de CO_2. O sobrenadante da cultura celular infectada por DENV foi diluído de forma seriada e adicionado nas placas que foram mantidas na estufa de CO_2 por 60 minutos sob leve agitação. Após este período, o sobrenadante foi removido e adicionado meio DMEN contendo 1,6% CMC e SFB 2%. Após 7 dias, as placas foram fixadas com paraformaldeído 3% e coradas com solução de Cristal de violeta 1%. As unidades formadoras de placas presentes nos poços foram contadas e através de um cálculo de regressão foi estimado a quantidade de PFUs por ml de solução. Todo procedimento foi realizado em duplicata.

3 RESULTADOS

3.1 Análise da sequência de gambicina de *Aedes aegypti* e desenho dos oligonucleotídeos para as reações de RT-PCR e qRT-PCR

A anotação automática do gene que codifica a gambicina está descrita no banco de dados VectorBase (https://www.vectorbase.org/Aedes_aegypti/Gene/Summary?collapse=none;db=core;g=AAEL004522;r=supercont1.122:2186816-2188508;t=AAEL004522-RA). A anotação automática foi realizada a partir de um transcrito de cDNA, onde os resultados mostram que esse transcrito é composto por dois introns e três exonsapresenta 258 pb, codificando para um peptídeo composto de 85 aminoácidos com aproximadamente 9.5 kDa (Figura 2 e 3). A anotação também descreve a presença de peptídeo sinal de exportação extracelular.

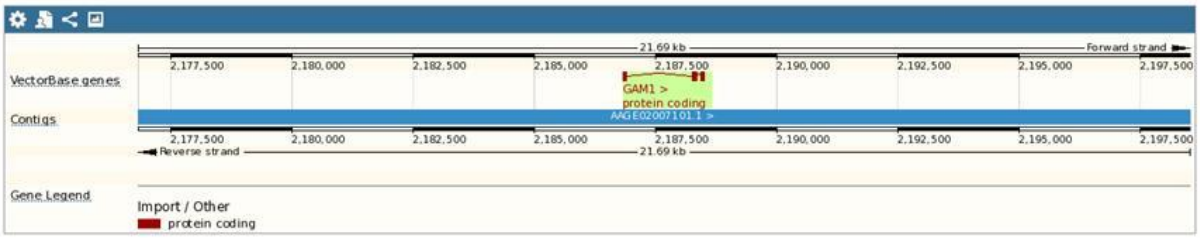


Figura 5- Esquema extraído do VectorBase da anotação do gene AAEL004522-RAque codifica o peptídeo gambicina

Baseada na sequência descrita (Figura 6), foram desenhados 3oligonucleotídeosiniciadores para as reações de RT-PCR assim como qRT-PCR, como mostrado na figura 5 e Tabela 1. O par de iniciadores PrimerF e PrimerR amplifica um fragmento com 285 pb e o Primer F (interno) utilizado juntamente com o Primer R para a realização dos experimentos de PCR em tempo real que falaremos nos próximos tópicos O desenho dos iniciadores Primer F e Primer R, foram baseados em uma anotação para o transcrito de gambicina onde antiga, ainda na base de dados do TiGR que não existe mais. Podemos notar que o Primer F nessa anotação esta em um intron. Entretanto, quando efetuado experimentos de

RT-PCR (Figura 7) a amplificação ocorreu, e o tamanho das bandas tanto para DNA genômico assim como para o cDNA correspondem. No momento não podemos afirmar se a anotação esta errada, ou é uma variação de sequência da linhagem de *Aedes aegypti* que esta depositada no VectorBase (Liverpool) com a linhagem que é utilizada em nosso laboratório (Higgs). Na tentativa de esclarecer se essa variação é valida, esperamos poder sequenciar completamente o gene de gambicina da linhagem Higgs. Apesar desses dados não constarem dessa dissertação, eles completam a informação da anotação desse gene.

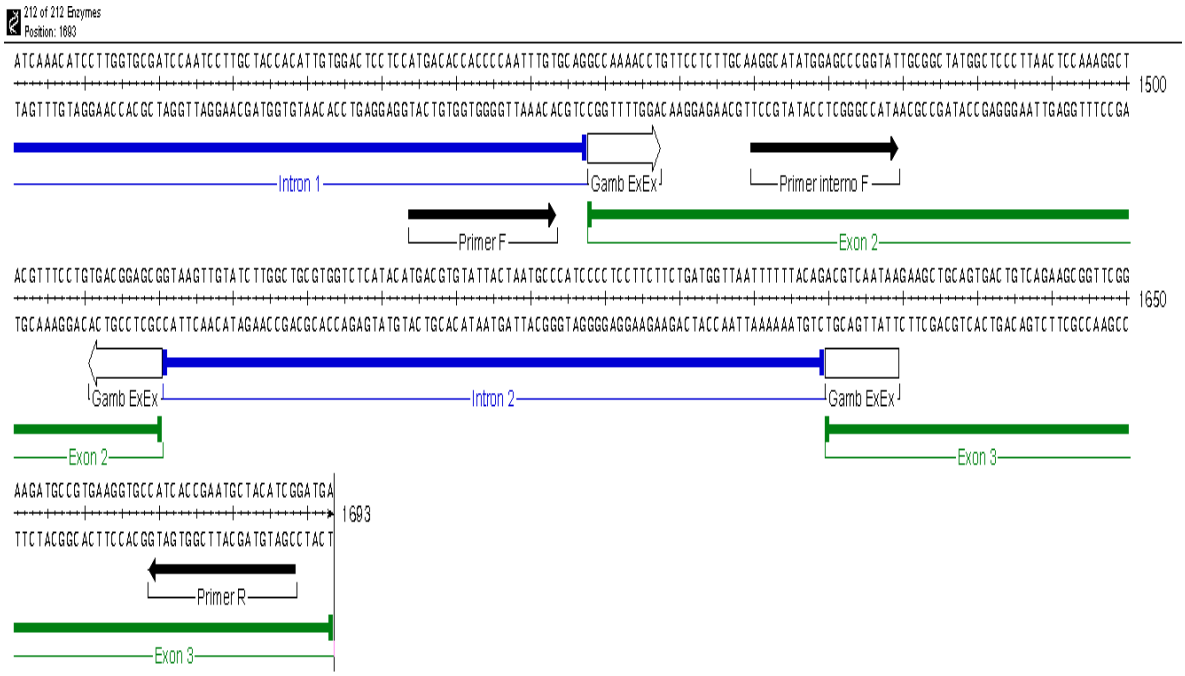


Figura 6 Sequência de nucleotídeos do gene AAEL004522-RA anotado como gambicina de Aedes aegypti.

INICIADORES	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO (PB)
Primer F	5'ATGACACCACCCCAATTTGT3'	285
Primer R	5'CATCACCGAATGCTACATCG3'	285
Primer F (interno)	5'AAGGCATATGGAGCCCGGTA3'	150

Tabela 1: Iniciadores utilizados para realização dos experimentos, suas sequencias e tamanho dos fragmentos amplificados.

3.2 Validação dos oligonucleotídeos iniciadores

Para validar os iniciadores foram realizados PCR's como descrito no item 2.4 de Material e Métodos utilizando DNA genômico assim com cDNA de fêmeas de *Aedes aegypti* na fase adulta, mantidas em solução de sacarose 10%. Após o ciclo de amplificações, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Podemos observar na figura 7 que tanto a banda amplificada do DNA genômico assim como a obtida na RT-PCR tem o mesmo tamanho (~280 pb) apesar da anotação atual do gene de gambicina mostrar que o oligonucleotídeo Primer F estar localizado em um Intron.

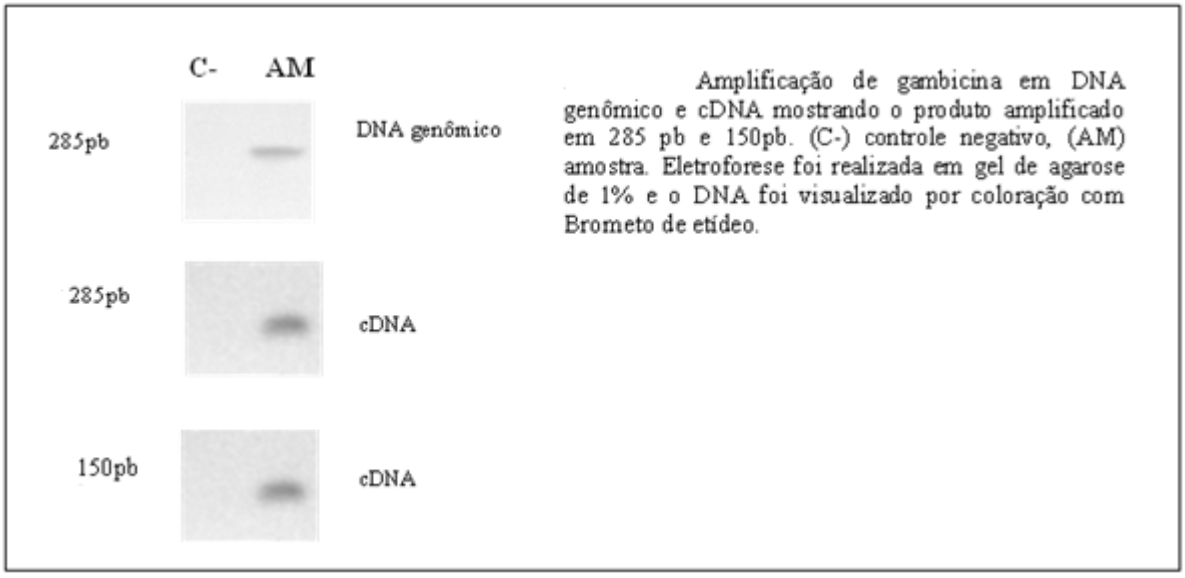


Figura 7- Validação dos oligonucleotídeos iniciadores

Esses resultados foram surpreendentes, entretanto quando esses oligonucleotídeos foram desenhados, a anotação do gene da gambicina de *Ae.aegypti*não mostrava a presença desse intron e portanto a sequência correspondente desse primer estava no exon 1. Entretanto, nas reações de RT-

PCR da linhagem Higgsverificamos que a aplicação ocorre, podendo ser uma variação de linhagens ou um erro da nova anotação. Para isso, iremos sequenciar o gene completo da gambicina na tentativa de contribuir para anotação desse gene.

3.3 Análise semi-quantitativa do perfil de transcrição de gambicina durante o ciclo de vida de *Aedes aegypti*

Para analisar a expressão de acúmulo de transcritos da gambicina nas fases de desenvolvimento do mosquito, foi extraído material de um grupo de 100 larvas no estádio L1, L2, L3, um grupo de 10 larvas L4, pupas macho, pupas fêmeas, mosquitos machos e fêmeas mantidos com solução de sacarose 10% e fêmeas alimentadas com sangue 24, 48 e 72 horas após o repasto. O mRNA foi extraído conforme o descrito em Material e Métodos (item 2.3), tratado com DNAse para a remoção de qualquer DNA genômico contaminante e então o RT-PCR foi realizado.

A fim de comparar a expressão do gene da gambicina, duas PCRs foram preparadas para todas as amostras (estádios de desenvolvimento do mosquito) em uma das PCRs foi utilizado iniciadores de um gene normalizador (Actina), no outro iniciadores da gambicina.

Após realização de um gel de agarose, este foi analisado e observada a presença de bandas referentes a um fragmento do cDNA de beta-actina em todos os estádios dos mosquitos como já era esperado e também bandas em todos os estádios referente a gambicina (Figura 8). Este experimento foi realizado em triplicata biológica. Observamos que a gambicina está presente em todas as fases de desenvolvimento do mosquito.

Foi observado nos estádios larvas L3, pupa macho, macho alimentado com sacarose e nos três intervalos de fêmea após o repasto sanguíneo, a presença de bandas duplas, isto pode ser um splicing alternativo realizado pelo gene da gambicina durante estas fases de desenvolvimento do mosquito.

Em *Ae.aegypti* o perfil de transcrição de gambicina em mosquitos não infectados se mostrou bastante constitutivo. Podemos observar na figura 8 que não existem diferença na quantidade desses transcritos durante todo o ciclo de vida de

Ae.aegypti. A figura 9 mostra a analise quantitativa dos transcritos de gambicina normalizada com o perfil de transcrição de Actina-1 , utilizando para isso ao Programa Image J. Análises estatísticas realizadas pelo teste ANOVA, mostraram que não foi observada diferença significativa entre os dados, onde p**<0,05**.

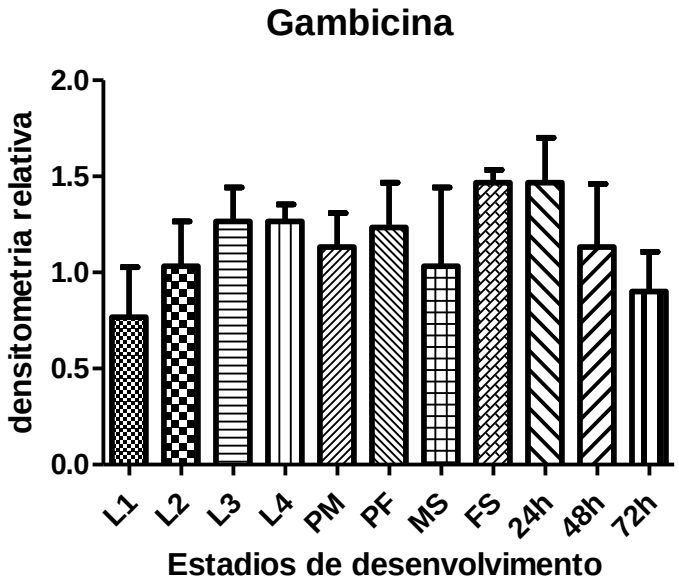


Figura 7-Quantificação densitométrica da expressão de gambicina nos estadios de desenvolvimento de Aedes aegypti

Amostras dos géis representado na figura 8 foram utilizados para a quantificação dos transcritos de gambicina e normalizados com o perfil de transcrição de actina-1 de *Ae.aegypti,* utilizando o programa Image J. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA: p<0,05

3.4 Análise semi-quantitativa do perfil de transcrição de gambicina durante a infecção de *Aedes aegypti* por *Plasmodium gallinaceum.*

Para o experimento que avalia a expressão de acúmulo de transcritos de gambicina em mosquitos infectados com Plasmodium gallinaceum, o RNA total foi extraído de um grupo de 10 mosquitos para os intervalos de 24, 48, 72 horas, 7 dias e 13 dias após a alimentação sanguínea em pintainhos infectados e pintainhos sadios utilizados como controle.

Depois de analisar o perfil de transcrição de gambicina em todos os estadios de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*, partimos para análise do perfil de transcrição da gambicina em mosquitos infectados com *Plasmodium gallinaceum*, agente causador da malária aviaria.

Copos contendo mosquitos fêmeas foram mantidos no insetário de segurança do departamento, para realização do experimento, os mosquitos realizaram repasto sanguíneo em pintainhos sadios (controle) e infectados (parasitemia entre 5 e 10%) com *Plasmodiumgallinaceum*. Após a alimentação as fêmeas ingurgitadas foram separadas e 24 horas após a alimentação um pool de 10 fêmeas foi coletado para a extração de RNA total utilizando trizol®, o mesmo aconteceu nos intervalos de 48 horas, 72 horas, 7 dias e 13 dias após a infecção.

Feita a extração do RNA total, o material foi quantificado em Nano Drop® e 2,2µg de cada amostra foi tratada com DNAse, após o tratamento foi realizado uma PCR para confirmar a descontaminação de cada amostra, com a confimação do tratamento das amostras,ocDNA de cada uma foi sintetizado com a enzima Super Script.

Então, uma PCR foi feita utilizando primersFoward e reverse para gambicina, o mesmo realizado utilizando primers para actina (gene utilizado como gene normalizador). Após realização do PCR, um gel de agarose 1% foi produzido para análise das amostras. A corrida de eletroforese aconteceu a 100W por 50 minutos. Ao final da eletroforese o gel foi observado em luz ultravioleta e asbandas foram analisadas.

Foi observada bandas em referente ao fragmento de gambicina em todos os intervalos analisados, porém, não foi observada diferença entre as amostras controle em comparação comas infectadas pelo método de PCR convencional, sendo assim, partimos para a quantificação de transcritos pelo método de PCR em tempo real, método mais sensível, por este motivo, a densitometria de bandas não foi realizada neste experimento.

Experimento realizado em triplicata biológica

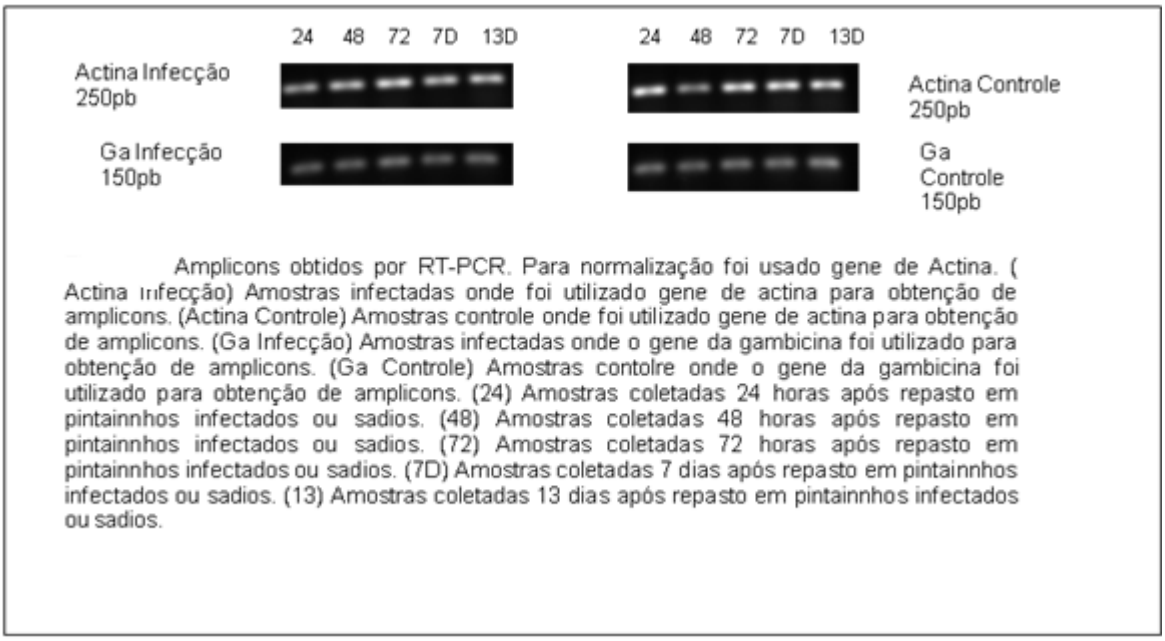


Figura 8 - Perfil de transcrição semi-quantitativo da gambicina durante a infecção de aedes aegypti por Plasmodium gallinaceum

3.5 Quantificação de transcritos que codificam para gambicina durante o ciclo de vida de Aedes aegypti e durante a infecção por Plasmodiumgallinaceum.

Para iniciar os experimentos foi realizado uma PCR com oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados (Primer R e Primer F interno – Tabela 1) . Após PCR ser realizado e confirmado a presença de banda por gel de agarose e eletroforese, foi realizada e reação de ligação, em seguida a transformação em bactéria eletrocompetente, logo depois extração e purificação de DNA de plasmídeo, seguido da clivagem de DNA de plasmídeo e finalmente a reação de sequenciamento.

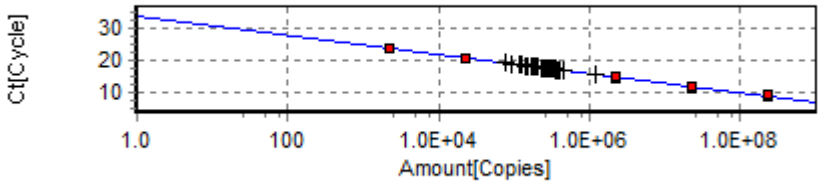
Com as sequências obtidas foi realizado um BLAST no site Vectorbase, confirmando ser um fragmento do gene da Gambicina. Posteriormente o plasmídeo que continha o inserto foi linearizado e a curva padrão construída.

Para os ensaios quantitativos, a figura 7, mostra os padrões de corrida de PCR em tempo real realizada para obtenção dos resultados. A curva padrão apresenta 5 pontos, o R2=0,99, sloope=3,1. A curva de dissociação apresentou apenas um pico, mostrando especificidade na amplificação das amostras.

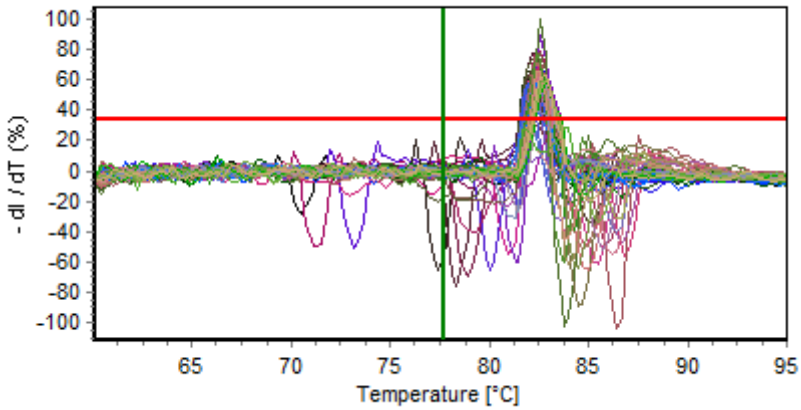
Os ensaios de Q – PCR mostraram,segundo teste estatístico ANOVA way, que transcritos de gambicina não apresentaram diferença significativa entre as amostras do grupo controle e infectado nos intervalos analisados. Porém, podemos observar que mesmo não havendo diferença significativa, o número de cópias de transcritos de gambicina no grupo infectado é maior quando comparamos com o grupo controle nos intervalos de 48, 72 horas e 7 dias após a infecção, sendo que, o ponto de 7 dias após a infecção foi o que apresentou maior número de transcritos de gambicina no grupo infectado.

No intervalo de 24 h após o repasto sanguíneo, o número de transcritos da gambicina é maior no grupo controle, porém essa diferença não é grande como podemos observar no gráfico da figura 12, o mesmo acontece no intervalo de 13 dias após o repasto.

A – curva padrão



B – curva de dissociação



CURVA PADRÃO	
	Valores
R2	0,99
sloope	3,1

Figura 9 - Análise por qPCR dos transcritos de gambicina na infecção por Plasmodiumgallinaceum

A-Curva padrão obtida através da quantificação das amostras analisadas. **B**- Curva de dissociação indicando a especificidade da amplificação das amostras (amplicons apresentando um único pico de dissociação).A tabela mostra os valores do R2 e sloope obtidos na curva.

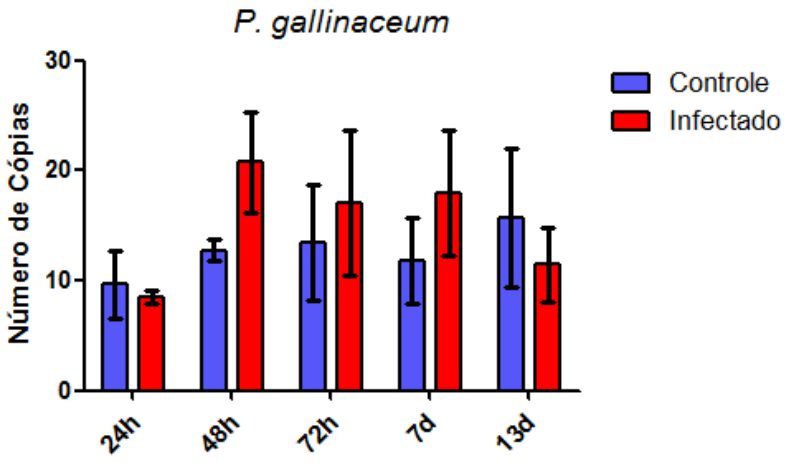


Figura 10- Análise quantitativa de PCR em tempo real na infecção por Plasmodiumgallinaceum

Quantificação absoluta da expressão de transcritos de gambicina na infecçãopor*Plasmodiumgallinaceum*nos intervalos de 24 horas,48 horas, 72 horas, 7 dias e 13 dias após a infecção, comparando o grupo controle com o grupo infectado.Teste estatístico ANOVA way mostrou que não há diferença significativa entre os intervalos analisados, p>0,05 .

3.6 Quantificação de transcritos que codificam para gambicina durante o ciclo de vida de *Aedes aegypti* e durante a infecção por vírus dengue (DENV2).

Nós infectamos mosquitos com dengue, pois queríamos analisar o que aconteceria com a gambicina, queríamos saber se ela estaria aumentada ou diminuída durante a infecção dengue. O experimento foi realizado em duplicata biológica.

Para controle do experimento foram realizados extrações de RNA dos mosquitos do grupo infectado nos intervalos de 24 horas, 7 dias e 14 dias pós infecção (item 2.3) e posteriormente reações de Q-PCR (item 2.7) para identificação dos mosquitos que realmente estavam infectados com o vírus. Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados os iniciadores TS1 e D2 e o kit one-step da invtrogen®.

O programa realizado para o Q-PCR foi: 1 ciclo de 95 ºC por 15 minutos, seguido por 40 ciclos de 94 ºC por 30 segundos, 55 ºC por 30 segundos e 72 ºC por 30 segundos, seguido da curva de melting.

As amostras positivas foram agrupadas em pools e as negativas para vírus Dengue, descartadas.

Observamos que no intervalo de 24 horas após a alimentação sanguínea, nas duas infecções, 100% dos mosquitos alimentados, apresentavam o vírus. Para o intervalo de 7 dias após a alimentação, no primeiro experimento, 30% dos mosquitos alimentados apresentavam o vírus, no segundo experimento foram 40%. O intervalo de 14 dias após alimentação apresentou 20% no primeiro experimento e 40% no segundo experimento (tabela 2).

Para o grupo controle, foi realizado um pool de 10 mosquitos, nos mesmos intervalos para o grupo infectado, extraído o RNA, quantificado e armazenado em freezer -80 ºC.

Primeira alimentação Sanguínea			Segunda alimentação sanguínea		
Intervalos após o repasto sanguíneo	**Número de mosquitos alimentados**	**Porcentagem de mosquitos infectados (%)**	**Intervalos após o repasto sanguíneo**	**Número de mosquitos alimentados**	**Porcentagem de mosquitos infectados (%)**
24 horas	30	100	24 horas	30	100
7 dias	60	30	7 dias	30	40
14 dias	40	40	14 dias	30	40

Tabela 2- dados observados nas duas alimentações sanguíneas com vírus dengue em *Aedes aegypti*. Número de mosquitos alimentados, porcentagem de mosquitos que apresentaram o vírus nos intervalos realizados.

Para análise de acumulo de transcritos de gambicina na infecção vírus dengue, foi realizado PCR em tempo real (item 2.7) com as amostras de RNA de mosquitos infectados e mosquitos controle. Os iniciadores utilizados amplificam um pedaço do gene de gambicina com tamanho de 150pb, foi utilizado kit one- step para as reações.

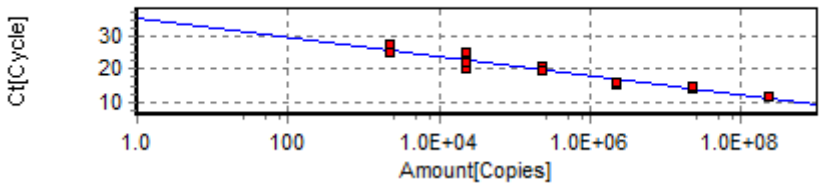
Para este Q – PCR foi utilizado o seguinte programa: 1 ciclo de 95 ºC por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 94 ºC por 30 segundos , 62 ºC por 30 segundos e 72 ºC por 30 segundos, seguido do passo para a realização da curva de melting.

Foi realizado análises absoluta e relativa para análise dos resultados obtidos. O gráfico da figura 14, mostra os resultados obtidos utilizando a análise relativa, nela, o intervalo de 24 horas após o repasto sanguíneo não apresenta diferença significativa entre o número de transcritos de gambicina no grupo infectado e controle. No intervalo de 7 dias e 14 dias após a infecção, o número de transcritos de gambicina no grupo infectado cai drasticamente, apresentando diferença significativa entre os grupos, segundo teste estatístico Mann Whitney ($p>0,05$).

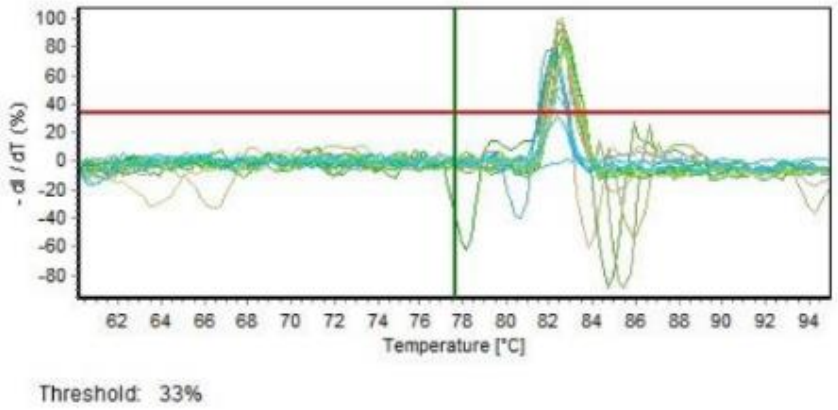
A figura 15, mostra a análise absoluta, por esta análise o intervalo de 24 horas após a infecção não apresenta diferença significativa entre os grupos controle e infectado.Nos intervalos de 7 dias e 14 dias após a infecção, o número de transcritos de gambicina é maior no grupo controle ao compararmos com o grupo infectado, apresentando diferença significativa entre os grupos.

O intervalo de 14 dias após o repasto sanguíneo, tanto na análise quantitativa e absoluta, é o intervalo que apresenta menor número de transcritos de gambicina no grupo infectado. Já o intervalo de 24 horas após a infecção, foi o que apresentou maior número de transcritos no grupo infectado.

A- Curva padrão



B- Curva de dissociação



CURVA PADRÃO	
	Valores
R2	0,99
sloope	3,0

Figura 11- Análise por qPCR dos transcritos de gambicina em Aedes aegypti na infecção por vírus dengue - Sorotipo 2

A-Curva padrão obtida através da quantificação das amostras analisadas. **B**- Curva de dissociação indicando a especificidade da amplificação das amostras (amplicons apresentando um único pico de dissociação). Tabela mostra os valores de R2 e sloope obtidos na curva padrão

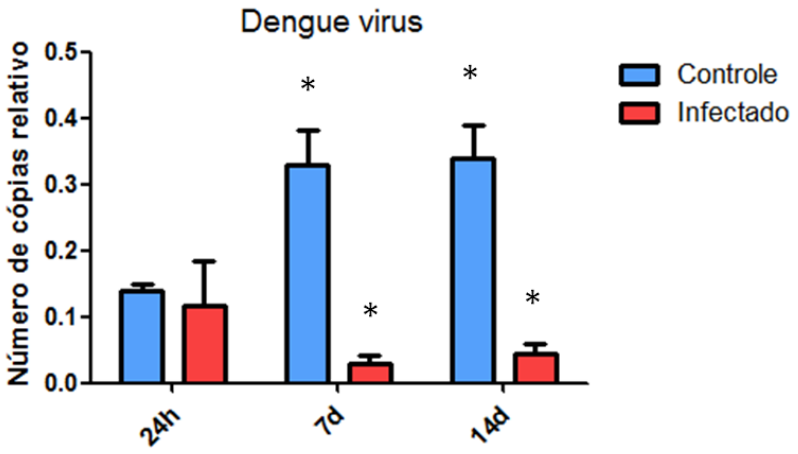


Figura 12 - Análise quantitativa de PCR em tempo real na infecção por vírus dengue

Quantificação relativa da expressão de transcritos de gambicina na infecção dengue nos intervalos de 24 horas, 7 dias e 14 dias após a infecção, comparando o grupo controle com o grupo infectado.Teste de Mann Whitney mostrou que somente nos intervalos de 7 dias e 14 dias após a infecção há diferença significativa $p<0,05$.

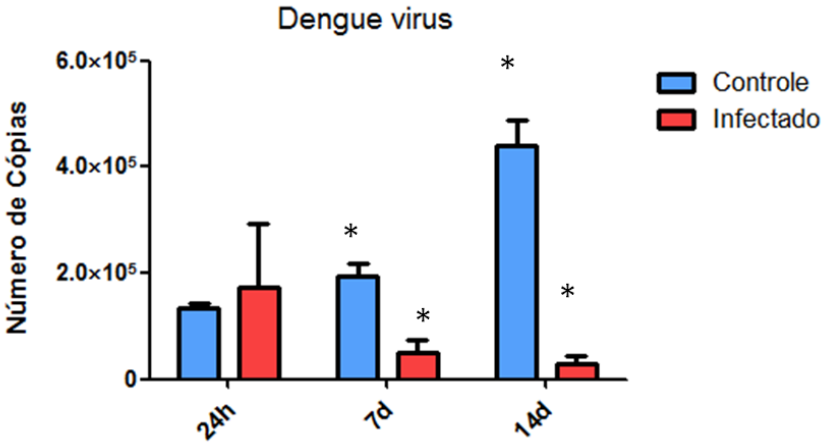


Figura 13 - Análise quantitativa absoluta de PCR em tempo real na infecção por vírus dengue

Quantificação absoluta da expressão de transcritos de gambicina na infecção dengue nos intervalos de 24 horas, 7 dias e 14 dias após a infecção, comparando o grupo controle com o grupo infectado. Teste de Mann Whitney mostrou que apenas nos intervalos de 7 dias e 14 dias após a infecção há diferença significativa $p<0,05$.

4 DISCUSSÃO

Mosquitos possuem vias de sinalização imune que são ativadas na presença de patógenos, entre essas vias podemos destacar Toll e IMD que são bem caracterizadas em *Drosophila sp*. Quando ocorre a ativação dessas vias, uma cascata de fatores é acionada que induz a transcrição de genes que codificam moléculas efetoras. Dentre essas moléculas podemos destacar os peptídeos antimicrobianos (AMP), que causam lise ao microrganismo alvo.

Alguns estudos dizem que peptídeos antimicrobianos são codificados somente quando o hospedeiro é infectado por patógeno, outros estudos mostram que o mosquito possui uma expressão basal destes peptídeos e que está expressão é aumentada na presença de invasores pela ativação das vias de sinalização.

Segundo Vizioli et al (2001), em *Anopheles gambiae* a gambicina é altamente encontrada em pupas e adultos e isso também ocorre no Ae. aegypti. Podemos observar a existência de bandas com uma intensidade mais forte a partir do estágio de pupas se estendendo até mosquitos adultos. Gambicina em *An. gambiae* não é encontrada em todos os estádios larvais diferente do *Ae.aegypti* onde a o peptídeo é encontrado de L1 à L4.

Peptídeos antimicrobianos podem apresentar atividade contra uma gama de microrganismos, mas, dentro de alguns gêneros o mesmo peptídeo pode agir de forma diferentes entre as espécies .

Vizioli em 2001, quando descreveu a gambicina,mostrou que o peptídeo tinha ação contra ocinetos de *Plasmodium berghei* na infecção em *An.gambiae*, bactérias gram positiva e fungos,já Dimopolus, em 2006, mostrou que o silenciamento do gene da gambicina tem um papel específico na resistência da infecção do *Plasmodium berghei* em *An.gambiae*, porém,isto não se mostra presente na infecção por *Plasmodiumfalciparum*, onde o silênciamento do gene não interfere na infeção.

Isto pode acontecer, pois apesar de serem parasitas da mesma espécie, são microrganismos diferentes, infectam hospedeiros diferentes, portanto, ao invadirem o hospedeiro invertebrado, a resposta imunológica não é necessariamente igual para todos.

Ao analisarmos os resultados obtidos quando o *Ae.aegypt i*está infectado com o vírus dengue (DENV2) observamos uma repressão da gambicina no grupo de mosquitos infectados em relação ao grupo controle. Segundo Dimopolus,2010, quando analisou a expressão de transcritos de gambicina em intestino e corpo gorduroso de mosquitos da cepa Rockefeller infectados com vírus dengue 24 horas e 3 dias após a infecção, a gambicina se mostrou reprimida no intestino, para intervalos analisados e ativada no corpo gorduroso, também para os dois intervalos.

Neste mesmo trabalho, outros peptídeos analisados também apresentaram repressão no número de transcritos, como a defensina C, para os dois intervalos analisados e para os dois tecidos, lisozima g, no intervalo de 3 dias para os dois tecidos, cecropina A, também no intervalo de 3 dias para a corpo gorduroso e defensina A no corpo gorduroso para o intervalo de 24 horas após a infecção.

Isto sugere que o vírus pode exercer uma atividade imunomoduladora, reprimindo estes peptídeos antimicrobianos.

Dimopolus, 2008, mostrou a importância da via Toll na infecção dengue em Aedes aegypti, ela que é ativada e que controla a infecção. Para isto ele silenciou reguladores negativos da via Toll (Cactus) e IMD (Caspar), somente o silenciamento cactus mostrou interferência na infecção, também foi analisada a expressão de peptídeos antimicrobianos e a gambicina somente se mostrou induzida pelo silenciamento de Caspar. Este deve ser um dos motivos que fazem a expressão da gambicina se mostrar menor no grupo de mosquitos infectados, pois ela é ativada pela via IMD que não exerce influência na infecção dengue em mosquito *Ae.aegypti*.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo analisar a expressão dos transcritos do peptídeo gambicina em *Aedes aegypti*, durante o seu ciclo de vida e quando está infectado com *Plasmodium gallinaceum* e Vírus Dengue (sorotipo 2 – DENV 2). Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Os transcritos do peptídeo gambicina estão presentes em todas as fases de vida do mosquito, desde a fase larval (L1 à L4), pupas (macho e fêmea), mosquitos adultos (machos alimentados com sacarose e fêmeas alimentadas com sangue e sacarose) apresentando uma expressão basal.

- Quando o mosquito está infectado por *Plasmodiumgallinaceum*, nos intervalos analisados (24,48,72 horas e 7 e 14 dias), não há diferença significativa no número de cópias de transcrito da gambicina, quando comparamos o grupo controle e infectado.

- Na infecção de *Aedes aegypti* por vírus dengue sorotipo-2, no intervalo de 24 horas após a infecção, não diferença significativa no número de cópias de transcrito de gambicinaentre os grupos controle e infectado. Nos intervalos de 7 dias e 14 dias após a infecção o número de transcritos da gambicina é maior no grupo controle em relação ao grupo infectado.

REFERENCIAS*

BARTHOLOMAY, L. C. et al. Culex pipiens pipiens: characterization of immune peptides and the influence of immune activation on development of Wuchereria bancrofti. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 43–50, ago. 2003.

BOMMARIUS, B. et al. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in Escherichia coli. **Peptides**, v. 31, n. 11, p. 1957–1965, nov. 2010.

BRUMFITT, W. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 731–734, 20 set. 2002.

CHRISTOPHIDES, G.K; Zdobnov, E; Barillas-Mury, C; Birney, E; Blandin, S; Blass, C; Brey, P.T; Collins, F.H; Daniell,i A; Dimopoulos, G; et al. Immunity-related genes and gene families in Anopheles gambiae. **Science**, v. 298, n.5591, p.159-165, ,2002.

DIMOPOULOS, G; Richman, A; Muller, HM; Kafatos, FC. Molecular immune responses ofthe mosquito Anophelesgambiaetobacteriaandmalaria parasites. **Proceedings National of AcademyScience**.,U.S.A , v 94, n.21, p. 11508-11513, 2007.

DIMOPOULOS, G; Seeley, D; Wolf, A; Kafatos, FC. Malaria infection of the mosquito Anopheles gambiae actives immune-responsive genes during critical transution stages of the parasite life cycle. **EMBO Journal**,v 17,p. 6115-6123, 1998.

---

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

FALLON, AM; Sun, D. Exploration of mosquito immunity using cells in culture. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v 31, p.: 263-278, 2001.

First-new-dengue-virus-type-50-years.disponível em: **(http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years).** Acesso em 28 mar.2015

FORATIN, I O. P. **Culicidologiamédica**. São Paulo: ED.USP, 2002. 860p.

GANZ, T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity1. **Integrative Comparative Biology,** v.43, p. 300–304, 2003.

GARCÍA GIL DE MUÑOZ, F. L. et al. Prostaglandin E2 modulates the expression of antimicrobial peptides in the fat body and midgut of Anopheles albimanus. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 68, n. 1, p. 14–25, 2008.

HIRSCH, B. Y. J. G. **Preliminary investigation of the bactericidal activity of intact and of dis- rupted exudate leucocytes** .From The Rockefeller Institute for Medical Research, 1956.

HSU, C.-H. et al. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 13, p. 4053–4064, . 2005.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

KOKOZA, V; Ahmed, A; Shin, SW; Okafor, N; Zou, Z; Raikhel, AS. Blocking of plasmodium transmission by cooperative action of Cecropin A and DefensinA in transgenic Aedesaegypti mosquitoes. **Proceedings National of Academy Science**.,U.S.A,v. 107, n. 18,p. 8111-8116, 2009.

KRAGOL, G. et al. Articles The Antibacterial Peptide Pyrrhocoricin Inhibits the ATPase Actions of DnaK and Prevents Chaperone-Assisted Protein Folding **Biochemistry**, v 40, n 10,p. 3016–3026, 2001.

LEIPPE, M. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa - e € ector molecules of primitive phagocytes. **Developmental Comparative Immunology**, . v. 23, n 5, p. 267–279, 1999.

LUNA, C. et al. Expression of immune responsive genes in cell lines from two different Anopheline species. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 6, p. 721–729,. 2006.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1687–1692, ago. 2009.

MICHEL, K; Kafatos, FC.Mosquito immunity against Plasmodium.**Insect Biochemistry and Molecular Biology**., v. 35, p. 677-689, 2005.

MOREIRA, CK; Rodrigues, FG; Ghosh, A; Varotti, FP; Miranda, A; Daffre, S; JacobsLorena, M; Moreira, LA. Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of Plasmodium ssp. **Experimental Parasitology**,v 116, p. 346-353, 2007.

MULLER. HM; Dimopoulos, G; Blass, C, , FC. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector Anopheles gambiae expresses six prophenoloxidase genes. **Jounal of Biology Chemistry**, v 274: 11727-11735,1999.

NAGHMOUCHI, K. et al. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of Pseudomonas fluorescens and antibiotic-resistant variants. **Research in microbiology**, v. 163, n. 2, p. 101–108, 2012.

OTVOS, L. et al. Interaction between Heat Shock Proteins and Antimicrobial Peptides **Biochemistry,** v. 21**,**. n. 14, p. 14150–14159, 2000.

PACOR, S. Analysis of the cytotoxicity of synthetic antimicrobial peptides on mouse leucocytes: implications for systemic use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 50, n. 3, p. 339–348, . 2002.

PARK, Y. et al. Antinematodal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against Caenorhabditis elegans. **Journal of Peptide Science**, v. 10, n. 5, p. 304–311, maio 2004.

PIERS, K. L.; BROWN, M. H.; HANCOCK, R. E. W. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria.**Gene,** v. 134, n. 1, p. 7–13, 1993.

RAMOS, R. et al. Recombinant expression and purification of the antimicrobial peptide magainin-2. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 1, p. 17–22, 2012.

RICHMAN, AM; Dimopoulos, G; Seeley, D; Kafatos, FC.Plasmodium actives the innate immune response of Anopheles gambiaemosquitoes.**EMBO Journal**. v. 16, n. 20. p. 6114-6119, 2007.

ROBINSON, W. E. et al. Anti-HIV-1 activity of indolicidin , an antimicrobial peptide from neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology.** v. 63, n. 1, p. 94-100, 1997.

SIEPRAWSKA-LUPA, M. et al. Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by Staphylococcus aureus Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by Staphylococcus aureus-Derived Proteinases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** , v. 48, n. 12, p. 4673-4679, 2007.

SIM, S. &Dimopoulos, G. Dengue VirusInhibitsImmune Responses in Aedes aegypti Cells. Plos One, 2010; 5: 1-9. Souza-Neto, JA; Sim, S; Dimopoulos G.An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense.**Proceedings National of Academy Science**, v. 106, n 42, p. 17841–17846, 2009..

SONG, B. H. et al. Human cytomegalovirus binding to heparan sulfate proteoglycans on the cell surface and / or entry stimulates the expression of human leukocyte antigen class I. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 10, p. 2405–2413, 2001.

SVENSON, J. et al. Antimicrobial Peptides with Stability toward Tryptic Degradation. **Biochemistry,** v. 47, n. 12, p. 3777–3788, 2008.

TZOU, P; Reichhart, JM; Lemaitre, B. Constitutiveexpressionof a single antimicrobialpeptidecanrestorewild-typeresistancetoinfectionin immunodeficientDrosophilamutants. **Proceedings National of AcademyScience**., v. 99, n. 4, p. 2152–2157, 2009..

VIZIOLI, J; Bulet, P; Charlet, M; Lowenberger, C; Blass, C; Muller, HM; Dimopoulos, C; Hoffmann, J; Kafatos, FC; Richman, A. cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, Anopheles gambiae. I**nsect Molecular Biology**, v. 9, n.1, p. 75-84, 2009.

VIZIOLI, J; Bulet, P; Hoffmam, JA; Kafatos, FC; Muller, HM; Dimopoulos, G. Gambicin: A novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector Anoplelesgambiae. **Proceedings National of AcademyScience**.,n 98, v 22, 12630-12635, 2001.

WADE, J. D. et al. Chemical synthesis and biological evaluation of an antimicrobial peptide gonococcal growth inhibitor**. Amino acids**, v. 43, n. 6, p. 2279–2283, 2012.