Ricardo Vieira Araujo

**Estudo dos efeitos da infecção por
Plasmodium gallinaceum em processos
fisiológicos de *Aedes aegypti***

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

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

São Paulo

2007

Ricardo Vieira Araujo

**Estudo dos efeitos da infecção por
Plasmodium gallinaceum em processos
fisiológicos de *Aedes aegypti***

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

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

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

São Paulo

2007

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

© reprodução total

Araujo Ricardo Vieira.

Estudos dos efeitos da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em processos fisiológicos de *Aedes aegypti* / Ricardo Vieira Araujo. -- São Paulo, 2007.

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: Estudo de interação patógeno-vetor.

Versão do título para o inglês: Effects on physiological processes in *Plasmodium gallinaceum* infected *Aedes aegypti*.

Descritores: 1. *Aedes aegypti* 2. *Plasmodium gallinaceum* 3. Vitelogênese 4. Hemolinfa 5. Eletroforese Bidimensional 6. Expressão gênica I. Capurro, Margareth de Lara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB082/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ricardo Vieira Araujo.

Título da Tese: Estudos dos efeitos da infecção por *Plasmodium*
gallinaceum em processos fisiológicos 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. **38** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Margareth de Lara Capurro-Guimarães, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Controle alternativo de mosquitos vetores**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Fabiana Feitosa, André L. da Costa da Silva, Ricardo V. Araújo, Bianca Burini, João Vicente Camargo e Silva, Ceres M. de Miranda, Thalita Borges**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **17.10.2006**.

São Paulo, 18 de outubro de 2006.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA - ICB/USP

Dedico essa conquista aos meus amados
pais, João e Maria, sem os quais nada
disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo a todos da minha família pelo fundamental apoio e incentivo durante todos esses anos.

À Dr^a Margareth Capurro por permitir o desenvolvimento desse projeto em seu laboratório, pela orientação, auxílio, paciência e apoio.

Aos meus colaboradores, Dr. Marcos N. Eberlin, Dr. Demian R. Ifa e Gustavo H.M.F. Souza do Instituto de Química da UNICAMP, pelo auxílio fundamental nos experimentos de espectrometria de massas. Ao Dr. Klaus H. Hartfelder da FMRP-USP pela realização das quantificações por Radioimunoensaio. Ao Dr. Alexander S. Raikhel pelo fornecimentos dos anticorpos anti vitelogenina e catepsina B.

Ao Dr. Antônio G. Bianchi e Dr. Carlos E. Winter pelas opiniões, críticas construtivas e diversas discussões sobre os resultados.

Agradeço emocionadamente aos integrantes do laboratório de mosquitos geneticamente modificados (Fabiana, Bianca, Juliano, Alexandre Zezinho, Ceres, João, Daniela, Andrezinho, Tita, Ediane, Fernanda, Neuzinha e Lourdes.... quanta gente!!!!), muito obrigado por me aturarem e terem sido minha segunda, mas não menos importante, família durante esses anos.

Agradeço também a Dr^a Tânia Bijovsky e todos de seu laboratório, meus estimados amigos Fábio, André, Alexandre Moura e Renato.

A Lenice por ter sido tão importante e companheira em momentos decisivos. Ao Maurício pelo incentivo, apoio e por me mostrar um mundo além das moléculas.

Aos professores e alunos do Departamento de Parasitologia que direta ou indiretamente contribuíram na minha formação e amadurecimento profissional.

Por fim, agradeço o apoio financeiro da FAPESP e CNPq.

"Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."
(Fernando Pessoa)

“A morte de um homem começa no instante em que ele desiste de aprender”
(Albino Teixeira)

RESUMO

Araujo, RV. Estudo dos efeitos da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em processos fisiológicos de *Aedes aegypti* [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Nossos resultados mostraram que a linhagem RED ou Rexville de *Aedes aegypti* apresenta uma redução de 26% na produção de ovos quando infectada por *Plasmodium gallinaceum*. Além disso, detecta-se diminuição de níveis de hormônios ecdisteróides e de proteína total de ovário em fêmeas vitelogênicas infectadas. Outro dado importante foi o aumento de concentração de proteína total de hemolinfa no período correspondente a invasão de oocinetos no trato digestivo. Nesse mesmo período foi demonstrado que a transcrição e acúmulo de proteínas precursoras de vitelo (vitelogenina e catepsina B vitelogênica) estão diminuídos, e os perfis de expressão de proteínas de hemolinfa são alterados. As proteínas de hemolinfa foram separadas por eletroforese bidimensional, submetidas à espectrometria de massas em aparelho MALDI-TOF e identificadas por *Peptide Mass Fingerprinting*. Os dados obtidos mostraram que a maioria das proteínas não possui função conhecida. Dentre as proteínas identificadas três possuem ação enzimática, uma está envolvida no processo de síntese protéica e outra em regulação de transcrição. Análises de sequência dos polipeptídeos para predição de localização celular mostraram que 75% das proteínas podem ser e 25% extracelulares. Também observou-se que ocorre aumento da transcrição de genes codificadores para proteínas do sistema imune (defensina A e transferrina) entre sete e oito dias após a alimentação com sangue infectado, momento onde ocorre liberação de esporozoítas na hemolinfa dos mosquitos. Outra alteração interessante foi observada no perfil de expressão de lipoforina (transportadora de lipídeos na hemolifna), que apresentou aumento de transcrição e acúmulo protéico na hemolinfa durante o período de esporogonia.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; *Plasmodium gallinaceum*; Vitelogênese; Eletroforese Bidimensional; Expressão Gênica.

ABSTRACT

Araujo, RV. Effects on physiological processes in *Plasmodium gallinaceum* infected *Aedes aegypti* [Ph.D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Our results show that *Plasmodium gallinaceum* infection of *Aedes aegypti* (RED or Rexville strain) results in 26% reduction in fecundity and a reduction in total ovary protein. Ecdysteroid levels were also reduced in infected mosquitoes. Hemolymph protein concentration increases during the midgut invasion by ookinetes. Concomitantly vitellogenin and vitellogenic cathepsin B levels were diminished and hemolymph protein profile was modified, due to alterations in transcript levels. Hemolymph proteins were separated by two-dimensional electrophoresis, submitted to mass spectrometry (MALDI-TOF) and analyzed by Peptide Mass Fingerprinting. The results show that most of the proteins have unknown function. Three of the identified proteins are putative hydrolytic enzymes, one is involved in protein synthesis and another in transcription regulation. Prediction analyses of polypeptide sequences show that 75% of the proteins are intracellular and 25% are extracellular. Our results also show an increase in transcription of genes that encode proteins from the immune system (defensin and transferrin) seven and eight days after infected blood feeding. During this period the sporozoites are being released from the oocysts on the hemolymph. In addition, our results show that lipophorin (hemolymph lipid transporter) presents increase on transcriptional and protein levels during sporogony.

Key-words: *Aedes aegypti*; *Plasmodium gallinaceum*; Vitellogenesis; Bidimensional Electrophoresis; Gene Expression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

20E	20-hidroxiectidisona
cDNA	DNA complementar
CHAPS	3-[(3-colamidapropil) dimetilamônio]-1-propanosulfonato
DEPC	dietil-piromcarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
Dnase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleosídeo-trifosfato
DO	densidade ótica
DTT	ditiotretitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
HEPES	N (2-hidroxietyl) piperazina-N'-2-etano-ácido sulfônico
IPG	<i>immobilized pH gradient</i>
IPTG	isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani
mRNA	RNA mensageiro
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
NP-40	nonidet P-40
PCR	polymerase chain reaction
pb	pares de bases
RNA	ácido ribonucléico
RT	<i>reverse transcriptase</i>
rpm	rotações por minuto
SDS	lauril sulfato de sódio
TFA	ácido trifluoroacético
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilenodiamina
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	unidade de enzima
X-gal	5-bromo 4-cloro 3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Vitelogênese e ciclo gonadotrófico.....	14
1.2. Transporte de moléculas na hemolinfa.....	16
1.3. Ciclo de vida do plasmódio no hospedeiro invertebrado.....	18
1.4. Resposta imunológica do mosquito.....	20
1.5 Alterações fisiológicas em mosquitos infectados por plasmódios.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Animais.....	26
3.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	26
3.1.2. <i>Gallus gallus domesticus</i>	26
3.1.3. <i>Plasmodium gallinaceum</i>	26
3.2. Obtenção de Hemolinfa.....	27
3.3. Obtenção de Proteínas solúveis de ovários.....	27
3.4. Postura Individual.....	28
3.5. Quantificação de Proteína Total.....	28
3.6. Focalização Isoelétrica das Proteínas.....	29
3.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS.....	29
3.8. Análise Digital dos géis.....	30
3.9. Espectrometria de massas.....	30
3.9.1. Digestão <i>in gel</i> das proteínas com tripsina.....	30
3.9.3. MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight).....	31
3.9.4. PMF (Peptide Mass Fingerprinting).....	31
3.10. RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction) semiquantitativo...	32
3.10.1. Purificação de RNA total.....	32
3.10.2. Tratamento de RNA com DNase.....	32
3.10.3. Síntese de cDNA fita simples.....	33
3.10.4. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	33
3.10.5. Eletroforese em gel de agarose.....	35
3.11. Clonagem em vetor plasmidial.....	35
3.11.1. Preparação de Células Eletrocompetentes.....	35

3.11.2. Ligação e clonagem dos produtos das PCRs.....	36
3.11.3. Recuperação de DNA de plasmídeos.....	36
3.12. PCR Em Tempo Real Quantitativo.....	36
3.13. Reação de seqüenciamento de DNA.....	38
3.14. <i>Western blot</i>	38
3.15. Radioimunoensaio (RIA).....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Efeito da infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> na fecundidade de fêmeas da linhagem RED ou Rexville de <i>Aedes aegypti</i>	40
4.2. Quantificação por radioimunoensaio (RIA) de ecdisona na hemolinfa de <i>Aedes aegypti</i> infectado por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	45
4.3. Quantificação de proteínas hemolinfáticas e solúveis de ovários em <i>Aedes aegypti</i> infectados por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	47
4.4. Efeito da infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> na transcrição de <i>Aedes aegypti</i>	50
4.5. Quantificação absoluta por PCR em tempo real de mRNA de lipoforina, vitelogenina e catepsina B vitelogênica durante a infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	55
4.6. Análise do acúmulo de vitelogenina, catepsina B vitelogênica e lipoforina em hemolinfa e ovários durante a infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	61
4.7. Análise de expressão e identificação por espectrometria de massa de proteínas de hemolinfa.....	68
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

As doenças veiculadas pelos mosquitos causam grande impacto econômico e de saúde pública das áreas onde ocorrem. Doenças como a dengue e a malária afetam um número muito alto de pessoas, sendo que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas habitam em regiões com perigo de contaminação por dengue. São registrados anualmente cerca de 300-500 milhões de casos de malária, levando a óbito em torno de 1 milhão de pessoas, principalmente crianças menores de 5 anos (WHO, 2004).

Os insetos popularmente conhecidos como mosquitos pertencem a família *Culicidae*, ordem *Diptera*. As fêmeas são hematófagas e utilizam os nutrientes obtidos na digestão do sangue de vertebrados no amadurecimento dos seus ovos. Devido a esse hábito esses insetos causam grande incômodo e podem transmitir agentes patogênicos aos seres humanos. Dentre os patógenos transmitidos pelos mosquitos, os protozoários do gênero *Plasmodium*, nematóides (filárias) e os vírus da Dengue, Febre amarela e Encefalites são os de maior importância em saúde pública. As espécies de mosquitos vetores estão distribuídas principalmente entre os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*. Os patógenos são inoculados no hospedeiro vertebrado através da saliva que é secretada durante o repasto sanguíneo

Essas doenças foram controladas durante as décadas de 50 e 60 devido a programas em larga escala de redução das populações de vetores. O ressurgimento dessas doenças iniciou-se no final da década de 70 e continua até os dias atuais devido a fatores como a resistência dos mosquitos aos inseticidas utilizados, falta de vacinas efetivas, resistência dos parasitas as drogas empregadas e problemas sociais, econômicos e políticos das áreas afetadas.

A alta capacidade reprodutiva dos mosquitos é um dos principais fatores que dificultam o controle da população de vetores numa área, por essa razão é importante

desenvolver novas estratégias de controle. Para isso é importante estudar processos fisiológicos como reprodução e mecanismos de interação com patógenos para buscar alvos mais efetivos no combate aos insetos vetores

1.1. Vitelogênese e ciclo gonadotrófico.

- Após a ingestão e durante a digestão do sangue ocorre a maturação dos ovócitos e formação de grânulos de vitelo (fonte de nutrientes para o embrião). Durante esse processo o corpo gorduroso sintetiza e secreta proteínas formadoras de vitelo para a hemolinfa. Esse processo é denominado vitelogênese e tem sido estudado extensivamente em *Aedes aegypti* (Clements, 1992). Nessa espécie esse fenômeno pode ser dividido em três períodos diferenciados:
- A pré-vitelogênese ocorre antes da ingestão de sangue e corresponde a uma fase preparatória ou de amadurecimento dos tecidos envolvidos. Nesse período ocorre a proliferação de organelas biossintéticas no corpo gorduroso e separação das células foliculares ovarianas, permitindo que as moléculas precursoras de vitelo alcancem o ovócito. Essa fase sofre influência do hormônio juvenil III nos três primeiros dias após a emergência das fêmeas adultas. Se não o corpo gorduroso e os ovários não forem expostos a esse hormônio eles não serão responsivos aos hormônios que promovem o período vitelogênico (hormônio ecdisteroidogênico e 20-hidroxiecdisona) (Raikhel *et al.*, 2002).
- O período vitelogênico inicia após a ingestão de sangue. Como resposta à alimentação sangüínea ocorre a secreção pelo cérebro do hormônio ecdisteroidogênico ovariano – OEH (Lea *et al.*, 1967; Brown *et al.*, 1998). Esse hormônio estimula os ovários a produzir e secretar ecdisona para hemolinfa, essa molécula ao chegar no corpo gorduroso é convertida em 20-hidroxiecdisona (20E). A 20E estimula a síntese das

principais proteínas precursoras de vitelo (vitelogenina, carboxipeptidase e catepsina-B vitelogênicas) que serão secretadas para hemolinfa, endocitadas pelos ovários e armazenadas nos ovócitos. Essa fase ocorre entre 0h a 48 horas após a ingestão de sangue (Raikhel & Dhadialla, 1992; Deitsch *et al.*, 1995).

- O término do período vitelogênico (aproximadamente entre 48 a 72 após repasto sangüíneo), representa o fim da síntese de proteínas precursoras de vitelo pelo corpo gorduroso e a produção de córion, camada glicoprotéica que dará origem a cutícula protetora do ovo. Ao final da ovogênese a fêmea deposita seus ovos em superfícies úmidas, finalizando um ciclo gonadotrófico (Raikhel & Dhadialla, 1992).

Experimentos utilizando corpos gordurosos mantidos em cultura mostraram que a adição do hormônio 20-hidroxiecdisona em doses fisiológicas provoca a ativação da síntese das proteínas precursoras de vitelo, demonstrando que os genes da vitelogenina, catepsina B e carboxipeptidase vitelogênicas são reguladas por esse hormônio. Essa molécula transduz seu sinal pela ligação a um heterodímero composto por dois receptores nucleares (Receptor de ecdisona - EcR e *ultraspiracle* - USP), que regulam a transcrição de genes envolvidos na cascata de sinalização de 20E, incluindo os “early genes” E74, E75 e *broad* que agem como fatores de transcrição na ativação do gene da vitelogenina (revisado por Attardo *et al.*, 2005).

A vitelogenina é a principal proteína precursora de vitelo na maioria dos animais ovíparos, em *Aedes aegypti* a vitelogenina ao ser sintetizada possui 200 kDa de massa molecular e após ser processada resulta em dois polipeptídeos de 120 kDa e 55 kDa (Chen *et al.*, 1994; Kokoza *et al.*, 2001).

A enzima catepsina B vitelogênica é composta por cinco ou seis subunidades de 44 kDa que ao ser internalizada pelo ovócito é processada para polipeptídeos de 42 kDa de massa

molecular. A catepsina B apresenta polipeptídeos de 33 kDa durante a embriogênese quando se torna ativa na degradação da vitelina (forma cristalizada da vitelogenina), Cho *et al.*, 1999.

A carboxipeptidase vitelogênica depois de sintetizada no corpo gorduroso também é transportada via hemolinfa e captada pelos ovócitos em formação. A ativação desta enzima está associada a uma redução em sua massa molecular de 53 para 48 kDa que é regulada durante a embriogênese (Hays & Raikhel, 1990; Cho *et al.*, 1991).

1.2. Transporte de moléculas na hemolinfa.

A hemolinfa circula no corpo dos insetos banhando os tecidos diretamente, sendo constituída por um fluido plasmático no qual as células sangüíneas (hemócitos), estão suspensas. As proteínas de hemolinfa são numerosas e possuem diferentes funções. A quantidade total dessas proteínas varia conforme o estágio de desenvolvimento ou fisiológico do inseto; sendo classificadas principalmente como proteínas de sistema imune, reserva, transportadoras de lipídeos, vitelogeninas, enzimas, e inibidoras de protease. A maior parte das proteínas de hemolinfa são sintetizadas no corpo gorduroso, além disso, este tecido também possui a função de reserva de proteínas, lipídeos e carboidratos (Chapman, 1998).

Durante a ovogênese há um aumento da demanda de transporte de lipídeos e ferro provenientes do sangue ingerido. Nesse período ocorre aumento de síntese e secreção de proteínas transportadoras para a hemolinfa, essas proteínas realizam o transporte de lipídeos e ferro para os outros tecidos do mosquito, principalmente os ovários.

A lipoforina é uma proteína transportadora de lipídeos que possui em sua forma nativa aproximadamente 700 kDa de massa molecular, sendo que 40 % dela é composta por lipídeos. Em *Aedes aegypti* apresenta duas subunidades – Apolipoforina I e Apolipoforina II com 224 kDa e 73 kDa, respectivamente. (Capurro *et al.*, 1994; Van Heusden *et al.*, 1997).

A ferritina que na maioria dos animais é um componente citosólico, nos insetos é secretada e encontrada no sistema vacuolar das células e na hemolinfa. Essa proteína possui aproximadamente 20 subunidades que formam uma grande esfera na qual o ferro é armazenado na forma de cristal. Estudos mostraram que a ferritina de *Aedes aegypti* é composta por 3 principais subunidades codificadas por dois genes. Um codifica a subunidade de 28 kDa (cadeia leve) e o outro codifica duas subunidades (cadeias pesadas) de 26 e 24 kDa (Dunkov *et al.*, 1995). A multiplicidade de cadeias pesadas observada é resultado de modificações pós-traducionais ainda não conhecidas. Essa é constitutiva na vida adulta do mosquito, porém apresenta um aumento no acúmulo dessa proteína em tecidos como trato digestivo, corpo gorduroso, ovários e hemolinfa (Dunkov *et al.*, 2002).

As transferrinas são proteínas consideradas como transportadores de ferro e moléculas de reserva em insetos. No entanto, em mosquitos sua função ainda não está totalmente esclarecida. Podendo estar envolvida no processo de ovogênese, uma vez que, está presente na forma de dois produtos de degradação proteolítica em ovários de *Aedes aegypti* alimentado com sangue (Harizanova *et al.*, 2005). Essa proteína é encontrada abundantemente na hemolinfa, sendo que ocorre aumento de transcrição desse gene em mosquitos inoculados com bactérias e durante o processo de melanização de filárias (Yoshiga *et al.*, 1997; Beerntsen *et al.*, 1994). Também não está claro qual o mecanismo de ação dessa proteína, embora estudos mostram que peptídeos derivados de degradação proteolítica da transferrina apresentam atividade contra um amplo espectro de microorganismos. (Farnaud & Ewans, 2003).

1.3. Ciclo de vida do plasmódio no hospedeiro invertebrado.

Durante a tomada de sangue, o anofelino ingere parasitas intra-eritrocíticos incluindo as formas de microgametócito (masculino) e macrogametócito (feminino). Eles permanecem no lúmen do trato digestivo onde ocorre a exflagelação dos microgametócitos que fecundarão os macrogametócitos (reprodução sexuada). Os parasitas sofrem modificações estruturais resultando numa forma de zigoto móvel (oocineto) que é capaz de atravessar a camada de quitina (matriz peritrófica) que protege o epitélio intestinal dos produtos tóxicos da digestão sangüínea. Os oocinetos penetram o epitélio do trato digestivo e se alojam entre as células epiteliais e a lâmina basal. Essa parte do desenvolvimento do plasmódio ocorre nas primeiras 24 horas após a ingestão de sangue, simultaneamente com a digestão sangüínea, síntese de proteínas precursoras de vitelo e transporte de lipídeos, ferro para os ovários. O oocineto se desenvolve atingindo a forma de oocisto que inicia o processo de esporogonia, após alguns dias os oocistos maduros liberam milhares de formas esporozoíticas na hemocele dos insetos (aproximadamente 16 dias após o repasto). As formas livres esporozoítas invadem as glândulas salivares permanecendo neste órgão até o mosquito realizar outro repasto sangüíneo, transmitindo as formas infectantes para outro hospedeiro vertebrado (Sherman, 1998; Whitten, et al., 2006), Figura 1.

No entanto, os plasmódios causadores de malária aviária (*Plasmodium gallinaceum*) quando infectam mosquitos *Aedes aegypti* realizam o processo de esporogonia mais rapidamente. Pois, como visto na Figura 2, no oitavo dias após o repasto detecta-se esporozoítas nas glândulas salivares desses insetos.

Figura 1: Ciclo de vida do plasmódio em mosquitos do gênero *Anopheles*.
Extraído de Whitten *et al.* (2006).

Figura 2: Contagem de formas oocísticas e esporozoítas (spz) de *Plasmodium gallinaceum* em tecidos de *Aedes aegypti*.
Extraído e modificado de Miranda, C.M. (2006).

1.4. Resposta imunológica do mosquito.

Dentre os mecanismos descritos em insetos, a síntese de peptídeos antimicrobianos e melanização são apontados como os principais mecanismos efetores de resposta a plasmódios.

Peptídeos antimicrobianos são moléculas, geralmente, carregadas positivamente que se ligam à parede celular das bactérias causando danos na membrana celular e/ou permeabilização. Essas moléculas são secretadas principalmente pelo corpo gorduroso e hemócitos. A ativação transcricional de peptídeos antimicrobianos classificados como defensina, GNPB (proteína ligante a bactéria Gram-negativa) e IGALE20 são induzidas em *Anopheles gambiae* infectados por *Plasmodium berghei* (Richman *et al.*, 1997; Dimopoulos *et al.*, 1998). Outro estudo mostrou que *Anopheles gambiae* transgênico superexpressando o peptídeo antimicrobiano Cecropina no trato digestivo reduz significativamente o número de oocistos de *Plasmodium berghei*. (Kim *et al.*, 2004).

A melanização é uma potente resposta imune em insetos, apontada como um mecanismo que confere refratoriedade aos mosquitos contra os plasmódios. A ativação de uma cascata de serino proteases leva a conversão proteolítica da profenoloxidase em fenoloxidase. Todas as enzimas da cascata de melanização são secretadas na hemolinfa pelos hemócitos. A fenoloxidase ativa a formação de intermediários reativos de quinona para síntese de melanina. Os patógenos e parasitas são imobilizados pela formação de uma cápsula de melanina e mortos, aparentemente, pela produção de radicais livres e moléculas intermediárias tóxicas produzidas durante a formação da cápsula. (Muller *et al.*, 1999; Christophides *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 2005).

Oocinetos de *Plasmodium berghei* infligem danos irreversíveis às células epiteliais durante sua passagem através das células do trato digestivo de *Anopheles stephensi*. As células invadidas tornam-se protuberantes para o lúmen e sofrem mudanças características como a indução de expressão da óxido nítrico sintase, perda da microvilosidade e

fragmentação do DNA genômico. A enzima óxido nítrico sintase catalisa a formação de óxido nítrico, uma molécula altamente reativa e tóxica. O óxido nítrico é instável e reage prontamente com outras moléculas, gerando múltiplos intermediários nitrogênio-reativos (Murphy, 1999). A produção de óxido nítrico possui um importante papel limitando a infecção pelos oocinetos no epitélio do trato digestivo. Estudos mostraram que a administração de um inibidor da óxido nítrico sintase resultou em um aumento de duas vezes no número de oocistos (Luckhart *et al.*, 1998).

Os oocinetos secretam uma serino protease (anotada como uma possível subtilisina) e a Pbs21 (proteína de superfície ancorada por glicosilfosfatidilinositol) no citoplasma das células invadidas e são capazes de se movimentar lateralmente entre as células. A invasão ativa uma série de reações tóxicas aos parasitas, conseqüentemente levando a célula invadida à morte por apoptose. Porém, um mecanismo de reparação mediado por polimerização da actina que permite que o epitélio expulse as células invadidas para o lúmen sem perder a integridade do tecido. Esses dados levaram a predição de um modelo (*Time Bomb Model*) que consiste na hipótese de que para garantir a sobrevivência, os oocinetos devem migrar para fora da célula antes que a “bomba” seja detonada (Han *et al.*, 2000; Han & Barillas-Mury, 2002).

No entanto, outro modelo de ataque ao parasita sugere uma resposta constituída por duas etapas principais de resposta de *Anopheles gambiae* ao *Plasmodium berghei*. Na primeira ocorre lise do parasita, mediada pela proteína hemolinfática TSP1, em seguida os parasitas mortos sofrem melanização (Whitten *et al.*, 2006).

Os dados que sugerem esse mecanismo são: a melanina nunca foi observada em parasitas vivos, embora isso não exclua a possibilidade que moléculas tóxicas intermediárias da cascata da profenoloxidase tenham matado os parasitas. Oitenta por cento dos parasitas mortos, observados em linhagens de mosquitos susceptíveis, não apresentam melanização. E

o fato de nunca ter sido observado um oocineto morto em contato direto com o citoplasma de uma célula do trato digestivo invadida.

Luckhart *et al.* (2003) demonstraram que a infecção por plasmódios induz o aumento da transcrição de óxido nítrico sintase no trato digestivo 6-8 horas após o repasto sanguíneo (antes do início da invasão das células epiteliais pelos oocinetos), mostrando que a invasão celular não é o único evento que induz a expressão de óxido nítrico sintase no trato digestivo.

1.5 Alterações fisiológicas em mosquitos infectados por plasmódios.

Alguns estudos mostraram que a infecção por plasmódios causa uma redução na capacidade reprodutiva (produção de ovos) dos mosquitos infectados. Esse fenômeno foi demonstrado em modelos de laboratório utilizando *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* (Hacker, 1971), *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae* infectados por *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Hogg & Hurd, 1995; Ahmed *et al.*, 1999). Essa redução de fecundidade também foi observada em mosquitos *Anopheles gambiae* de área endêmica infectados por *Plasmodium falciparum*, nesse estudo observou-se que fêmeas infectadas (abrigando oocistos no trato digestivo) eram capazes de sugar a mesma quantidade de sangue que fêmeas não infectadas (Hogg & Hurd, 1997).

Gray & Bradley (2005) utilizaram *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* para mostrar que não há diferença do volume de sangue tomado se o mesmo estiver contaminado ou não. Outros parâmetros foram comparados nesse trabalho, como o conteúdo de lipídeos, carboidratos e taxa metabólica de fêmeas infectadas. No entanto, nenhuma diferença foi observada nos mosquitos infectados em relação ao grupo controle. Dados como esses sugerem que a queda no número de ovos em mosquitos infectados com plasmódios não ocorre por diferenças nutricionais do sangue contendo parasitas.

Um estudo realizado em *Anopheles stephensi* infectado por *Plasmodium yoelii nigeriensis* demonstrou que os ovários de fêmeas alimentadas com sangue infectado apresentam quantidades menores de proteína total (Hogg *et al.*, 1997).

Jahan & Hurd (1998) quantificaram vitelogenina na hemolinfa e nos ovários (vitelina) de *Anopheles stephensi* durante o primeiro ciclo gonadotrófico, em fêmeas infectadas por *Plasmodium yoelii nigeriensis*. Os resultados mostraram que a concentração dessa proteína reduz significativamente nos ovários de fêmeas infectadas entre 24 e 48 horas após a alimentação sangüínea, no entanto, na hemolinfa ocorre o inverso.

Estudos posteriores mostraram que *Anopheles gambiae* quando infectados por *Plasmodium yoelii nigeriensis* apenas apresentam reduções marcantes de acúmulo de vitelogenina no segundo ciclo gonadotrófico após o primeiro repasto infectado. E assim como observado em *Anopheles stephensi*, no período onde observa-se redução de vitelina nos ovários a concentração de vitelogenina na hemolinfa estava aumentada. Esse trabalho também mostra o perfil transcricional de vitelogenina durante os dois ciclos gonadotróficos, e os resultados obtidos mostraram que os níveis de mRNA de vitelogenina estão reduzidos em fêmeas infectadas durante o segundo ciclo gonadotrófico (Ahmed *et al.*, 2001).

Além da redução de transcrição de vitelogenina, outros dados foram obtidos que explicam a redução de fecundidade durante a infecção. Foi demonstrado que *Anopheles stephensi* apresenta indução de apoptose em células foliculares circundantes aos ovócitos, 12-18 horas após alimentação com sangue contendo *Plasmodium yoelii nigeriensis*. A apoptose em células foliculares resulta na reabsorção dos ovócitos em desenvolvimento e consequentemente na diminuição do número de ovos produzidos (Hopwood *et al.*, 2001). Em *Anopheles gambiae* foram observadas células apoptóticas também nos ovários de indivíduos com sistema imune ativado artificialmente por lipopolissacarídeos e microesferas de resina com carga neutra ou negativa. O mesmo perfil de ativação de apoptose em ovário também foi observado em fêmeas infectadas por *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Ahmed & Hurd, 2006).

Outros estudos sugerem que a redução de fecundidade possa ser uma adaptação dos mosquitos a infecção. Uma vez que, linhagens de *Anopheles gambiae* susceptíveis á infecção sofreram pressão seletiva em laboratório até a conversão em uma linhagem refratária a *Plasmodium yoelii nigeriensis*, e como consequência a fecundidade de fêmeas refratárias tornou-se menor que a de fêmeas susceptíveis infectadas (Hurd *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram determinar o efeito da infecção por *Plasmodium gallinaceum* na fecundidade da linhagem RED ou Rexville de *Aedes aegypti*, observação dos níveis de hormônios ecdisteróides e proteína total em hemolinfa e ovários de fêmeas parasitadas por *Plasmodium gallinaceum*. Avaliar os efeitos da infecção por *Plasmodium gallinaceum* na expressão de genes relacionados com reprodução, transporte e sistema imune de *Aedes aegypti*; e estudar a influência dos plasmódios no perfil de expressão de proteínas de hemolinfa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

3.1.1 *Aedes aegypti*

Os mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem Red ou Rexville D) foram mantidos em colônia no insetário em temperatura média de 26 °C e 80 % de umidade relativa do ar. As larvas foram mantidas em recipientes plásticos com água destilada e alimentadas com ração para peixes (TETRAMIN) moída. As pupas foram separadas e colocadas em copos de plástico de 500 mL com água para emergência dos adultos. Os copos foram fechados com filó e os mosquitos adultos alimentados com solução de sacarose 10% *ad lib*. Para ocorrência da postura de ovos as fêmeas realizavam o repasto sangüíneo em camundongos anestesiados com injeção de cloridrato de xilazina 10 ng/Kg e acepromazina 1 ng/Kg.

3.1.2. *Gallus gallus domesticus*

Foram utilizados pintainhos (*Gallus gallus domesticus*) com 2 a 10 dias de idade para manutenção *in vivo* de *Plasmodium gallinaceum*, no biotério de aves do Departamento de Parasitologia do Instituto Ciências Biomédicas. Os animais são mantidos com ração (Purina) e água *ad lib*. As condições de temperatura foram de 26 °C e 60 % de umidade relativa do ar.

3.1.3. *Plasmodium gallinaceum*

A parasitemia dos pintainhos infectados foi determinada em esfregaços de sangue obtidos a partir do 7º dia após os pintainhos terem sido picados por mosquitos infectados, as lâminas de esfregaço de sangue foram coradas com giemsa 0,076 %, glicerol 50 % e metanol 50 % por 10 minutos, depois de lavadas e secas a temperatura ambiente foram analisadas por microscopia óptica, usando aumento de 1000x. Após a contagem de células infectadas e

cálculo da porcentagem de parasitemia os animais foram anestesiados com injeção de cloridrato de xilazina 3 ng/Kg e acepromazina 0,3 ng/Kg. Pintainhos com parasitemia de 2 a 8 % foram anestesiados e ficavam a disposição dos mosquitos por um período de 30 minutos para que fosse realizado o repasto sangüíneo pelos mosquitos. Após esse tempo, os mosquitos foram anestesiados com CO₂ e mantidos no gelo para separação das fêmeas alimentadas das não alimentadas. Sete dias após o repasto sangüíneo foram dissecados de 5 a 10 tratos digestivos em salina de *Aedes* (NaCl 150 mM, KCl 4 mM, CaCl 3 mM, NaHCO₃ 1,8 mM, MgCl₂ 0,6 mM e HEPES, pH 7, 25 mM), esse material foi analisado por microscopia de contraste de fase para contagem de oocistos. As fêmeas infectadas foram utilizadas para inocular pintainhos sadios.

3.2. Obtenção de Hemolinfa

A coleta de hemolinfa foi realizada em fêmeas adultas (3 a 6 dias após emersão) anestesiadas em gelo. Os primeiros pares anteriores de pernas foram arrancadas, em seguida injetou-se aproximadamente 3 µL de solução uréia 8 M ou PBS (NaHPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 2 mM, pH 7, NaCl 140 mM) até a hemolinfa ser expelida pelos ferimentos e coletada em um microcapilar de 10 µL. A hemolinfa foi utilizada imediatamente ou dissolvida em tampão de amostra (Tris-HCl 108 mM, pH 6,8, contendo SDS 3,6 %, DTT 200 mM, glicerol 18 % e azul de bromofenol 0,009 %) e armazenadas à -20°C.

3.3. Obtenção de Proteínas solúveis de ovários

Os pares de ovários foram dissecados em salina de *Aedes* e homogeneizados em tampão de lise (uréia 6 M, CHAPS 4 % e DTT 100 mM) utilizando pistilo apropriado para tubo eppendorf. O material foi centrifugado a 14000 RPM durante 10 minutos e o

sobrenadante contendo fração a protéica solúvel foi coletado. Esse material foi diluído 1x em tampão de amostra e armazenado a -20°C .

3.4. Postura Individual

As fêmeas de *Aedes aegypti* foram alimentadas em pintainhos sadios ou infectados por *Plasmodium gallinaceum*, em seguida os mosquitos foram anestesiados com CO_2 para separação das fêmeas ingurgitadas. No terceiro dia após o repasto sangüíneo os mosquitos eram novamente anestesiados e colocados em ovitrampas individuais. Foi colocado um volume de água suficiente para cobrir o fundo de cada tubo de vidro e uma tira de papel filtro (palheta) para servir como superfície úmida para as fêmeas depositarem seus ovos. Os tubos foram cobertos com filó e os mosquitos foram mantidos em estufa com temperatura média de 26°C e 60 % de temperatura relativa do ar. No dia seguinte, as fêmeas foram retiradas e os ovos depositados no papel de filtro e nas paredes dos tubos foram contados.

3.5. Quantificação de Proteína Total

As quantificações de proteína total foram realizadas utilizando-se o método descrito por Spector (1978). As amostras foram diluídas em um volume final de 10 μL em solução uréia 8 M, em seguida adicionava-se 200 μL de Coomassie Blue G 0,001 %, etanol 5 % e ácido fosfórico 10 %. Diluições seriadas de albumina de soro bovino (Sigma) foram utilizadas para construção de curva padrão. A leitura de absorbância foi feita em placa de Elisa no comprimento de onda de 595 nm, em um aparelho Multiskan EX (Uniscience), e as equações das retas obtidas no programa Microsoft Excel.

3.6. Focalização Isoelétrica das Proteínas

15 µg de proteína total de hemolinfa foram dissolvidas em 150 µL de solução de hidratação (uréia 8 M, NP-40 4 %, DTT 100 mM, anfolitos 3/10 0,08 % e azul de bromofenol 0,001 %), esse material foi usado na hidratação das fitas de focalização isoeletrica - *IPG strips* pH 4-7, 7 cm (BIO-RAD). As condições de hidratação foram 50 V a 20 °C por 16 horas. A focalização dos polipeptídeos foi realizada através da aplicação de 250 V por 15 minutos, 4000 V por 2 horas, seguido de um aumento crescente na voltagem até atingir 20000 V. A hidratação e isoeletrofocalização foram feitas no equipamento PROTEAN IEF Cell (BIO-RAD). Antes da separação dos polipeptídeos em gel de poliacrilamida na presença de SDS, as fitas foram incubadas em tampão Tris 375 mM, pH 8,8, contendo uréia 6 M, SDS 2 % e DTT 130 mM sob agitação por 20 minutos. Em seguida as fitas foram novamente incubadas pelo mesmo tempo em tampão Tris 375 mM, pH 8,8, contendo uréia 6 M, SDS 2 % e iodocetamida 135 mM.

3.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS

Os géis foram polimerizados em placas de vidro do sistema de mini-gel da Bio-Rad (mini protean III) como molde, com espaçadores de 0,75 mm ou 1,0 mm de espessura. As concentrações de acrilamida utilizadas foram 8, 10, 12 e 14 %, conforme o experimento, utilizando Tris 390 mM, pH 8,8, contendo 0,1 % SDS, persulfato de amônio 0,1 % e TEMED 0,04 a 0,08 %. A eletroforese foi realizada com voltagem constante igual a 20 V / cm. Os polipeptídeos foram corados por Nitrato de Prata como descrito por Shevchenko *et al.* (1996), ou Coomassie blue R 0,2 % dissolvido em metanol:ácido acético:água (50:10:40, v/v/v) por um tempo aproximado de 20 minutos e descorados por uma solução composta de etanol:ácido acético:água (25:8:65, v/v/v).

3.8. Análise Digital dos géis

Os géis bidimensionais foram digitalizados em cores com resolução de 300 dpi em formato JPEG, os arquivos gerados foram convertidos para formato TIFF através do programa ADOBE Photoshop v.7. As imagens dos géis foram analisadas no programa ImageMaster™ 2D Platinum (Amersham Biosciences), onde as bandas polipeptídicas (*spots*) foram quantificadas. O parâmetro usado para quantificação dos *spots* foi o volume. As médias dos volumes de cada *spot* foram comparadas e as proteínas que apresentaram aumento ou redução maiores que 2,5 vezes foram consideradas diferencialmente expressas. A normalização desses dados foi feita utilizando os valores de volume do *spot* 1.

As análises de densitometria de géis de agarose, SDS-PAGE e experimentos de western blot foram realizadas utilizando o programa BandLeader v.3.00.

3.9. Espectrometria de massas

3.9.1. Digestão *in gel* das proteínas com tripsina

Os *spots* foram recortadas dos géis e separadas em tubos eppendorf, em seguida, foram descoradas com ferrocianeto de potássio 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM durante 30 minutos, lavadas com água bidestilada por 1 hora e incubadas por mais uma hora com bicarbonato de amônia 100 mM sob agitação. A redução e alquilação das pontes dissulfeto das proteínas foram realizadas da seguinte forma: incubação com bicarbonato de amônio 100 mM e DTT 10 mM por 30 minutos a 60 °C, seguido de incubação com bicarbonato de amônio 100 mM e iodocetamida 5 mM por 30 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. Os *spots* recortados foram então incubados com solução de acetonitrila 50 % e bicarbonato de amônio 50 mM, sob agitação, depois foram incubados com acetonitrila 100 % por 10 minutos e secos a vácuo. Os *spots* foram ressuspensos em solução de bicarbonato de amônio 25 mM contendo 0,1 µg de tripsina (sequencing grade, SIGMA) e incubadas a 37 °C por 13 horas.

3.9.2. Extração de peptídeos

A extração dos peptídeos foi realizada com duas incubações, de 20 minutos cada, em solução acetonitrila 60 % e TFA 0,1 %. Em seguida, os *spots* foram incubados em solução acetonitrila 100 % por dez minutos, após cada incubação o volume contido no tubo foi transferido para outro. O volume total recolhido nas três incubações foi seco a vácuo. Os peptídeos foram ressuspensos em TFA 1,68 %, ligados numa coluna C₁₈ acoplada a uma ponteira P10 (Zip-Tip – Millipore), os peptídeos foram lavados com solução 0,1 % TFA e eluídos em acetonitrila 50 % e TFA 0,1 %. O volume eluído foi seco a vácuo e os peptídeos foram armazenados a –20 °C.

3.9.3. MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*)

Os peptídeos foram ressuspensos em 2,5 µL de acetonitrila 50 % e TFA 0,1 %, cada amostra foi aplicada na placa do equipamento (MALDI *plate*) e secas em temperatura ambiente, em seguida, aplicou-se 2 µL de matriz (α -ciano-4-hidrocínamico 1 %, acetonitrila 50 % e TFA 0,1 % sobre cada amostra. As massas dos peptídeos foram determinadas em aparelho MALDI-TOF modelo Micromass (Waters) em modo positivo de ionização.

3.9.4. PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*)

Os espectros obtidos no aparelho MALDI-TOF foram processados com o uso do programa ProteinLynxGlobalServer 2.0v, os arquivos com extensão *.pkl foram convertidos em arquivos de texto contendo as massas e intensidade dos peptídeos detectados (*peak lists* – Material Suplementar). Os *peak lists* monoisotópicos foram importados no programa ALDENTE (<http://www.expasy.org/tools/aldente>), que compara as massas dos peptídeos

produzidos pela digestão com tripsina das proteínas analisadas com as massas das proteínas do banco de dados do programa digeridas *in silico*. O valor de tolerância entre as diferenças de valores de massa entre os peptídeos teóricos e os obtidos nas condições experimentais foi de 25 ppm.

3.10. RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) semiquantitativo

3.10.1. Purificação de RNA total

Os insetos foram anestesiados no gelo, imersos em TRIzol[®] (Life technologies) e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 1/5 do volume de clorofórmio e centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para outro tubo, o RNA foi precipitado pela adição de 2,5 volumes de isopropanol, incubado por 10 minutos em temperatura ambiente e o material foi centrifugado novamente como descrito acima. Após a centrifugação o sedimento foi lavado com etanol 75 % para ser novamente centrifugado, seco a vácuo, ressuspendido em H₂O DEPC 0,1 % e armazenado a –70 °C.

3.10.2. Tratamento de RNA com DNase

O RNA total foi tratado com 6 U de DNase I (Invitrogen) em tampão Tris-HCl 2 mM, pH 5, contendo MgCl₂ 0,5 mM e KCl 50mM. Foram realizadas três incubações de 15 minutos em temperatura ambiente, o tratamento foi iniciado com 2 U de enzima e ao fim de cada incubação adicionava-se mais 2 U da enzima e solução tampão para ajuste de concentração. A enzima foi inativada com incubação de 10 minutos a 65 °C. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 – Pharmacia Biotech) num comprimento de onda de 260 nm. Para confirmar a ausência de DNA contaminante utilizou-se 2 µg do RNA total

tratado como molde para PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores para o gene da actina. Esse material foi submetido à eletroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídeo e somente os RNA correspondentes às amostras que não apresentaram bandas nos géis de agarose foram utilizadas para síntese de cDNA.

3.10.3. Síntese de cDNA fita simples

Para síntese do cDNA a partir do RNA extraído das fêmeas utilizou-se 2 µg de RNA, 500 ng de Oligo (dT) e dNTPs 0,1 mM. O material foi incubado por 5 minutos a 65 °C, em seguida adicionado Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM e DTT 10 mM. Após incubação por 2 minutos a 42 °C adicionou-se 200 U de enzima SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguido de incubação a 42°C por 50 minutos. A inativação da enzima foi efetuada a 70 °C por 15 minutos.

3.10.4. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A amplificação foi feita em equipamento automático para PCR (Biometra). As misturas de reação continham MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,4 mM, 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 1), 2 µL de cDNA, 1 U Taq Polimerase, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, e KCl 50 mM. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores da reação de acordo com o especificado para cada experimento. As amostras foram desnaturadas a 94 °C por 2 minutos e submetidas a ciclos de replicação de 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 55 °C para anelamento dos oligonucleotídeos e 40 segundos a 72 °C.

Tabela 1: Sequências de oligos iniciadores utilizados para PCR.

Transcrito	GenBank (Nº de acesso)	Oligonucleotídeos	Fragmento (pb)
<u>Actina</u>	U20287	<i>Forward – 5' GAGCGTGGCTACTCCTTCAC 3'</i> <i>Reverse – 5' AGTTTCGTGGATACCGCAAG 3'</i>	199
<u>Apo II</u>	AF038654	<i>Forward – 5' GCGTCGGAAGCTTAGTCAAC 3'</i> <i>Reverse – 5' TGTTGGATCAGCAGAAGCAC 3'</i>	485
<u>Carboxipeptidase vitelogênica</u>	M79452	<i>Forward – 5' GTCGTCCAGGTGAAAGTGGT 3'</i> <i>Reverse – 5' AACAGATTGGGGAACAGCAC 3'</i>	481
<u>Catepsina B vitelogênica</u>	AF127592	<i>Forward – 5' AGGGATGTCACCCATATCCA 3'</i> <i>Reverse – 5' GCGGACCATCTTGAAGAATC 3'</i>	392
<u>Defensina A</u>	AY432880	<i>Forward – 5' AAGGACCAACCATGAAGTCG 3'</i> <i>Reverse – 5' AATGCAATGAGCAGCACAAG 3'</i>	248
<u>Ferritina</u>	AY064106	<i>Forward – 5' TTGCCCAGGAAAAGATCAAC 3'</i> <i>Reverse – 5' CCCATACTGCCTCGTGTTTT 3'</i>	437
<u>Receptor de Lipoforina</u>	AF355595	<i>Forward – 5' TCCATCAAAACGGTCAACAA 3'</i> <i>Reverse – 5' GCTTGATACTTCCGGCAGAG 3'</i>	416
<u>Receptor de Vitrogenina</u>	AH010501	<i>Forward – 5' CCTTTGCTTCGCAAGTCTTC 3'</i> <i>Reverse – 5' ATCGCAGACGTTTTTCAGCTT 3'</i>	488
<u>Transferrina</u>	AY064538	<i>Forward – 5' ACAAGTGCGAAGTCATGCAG 3'</i> <i>Reverse – 5' CATGGTGTAGTCCACGTTGC 3'</i>	491
<u>Vitrogenina</u>	U02548	<i>Forward – 5' AAGTCAGCTTCTTCGGTGGA 3'</i> <i>Reverse – 5' TCCTTCATGCTGTGTTCTCTG 3'</i>	589

3.10.5. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1 %, TBE 1x (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 50 mM e brometo de etídeo 0,1 µg/mL). Aos produtos da PCR foi adicionado o equivalente a 1/5 do volume de solução glicerol 50 %, EDTA 1 mM e xilenocianol 0,25 % e as amostras foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada com voltagem constante de 100 V por 50 minutos. Os géis foram submetidos a três lavagens com água destilada, sob agitação; a primeira lavagem de uma hora e as seguintes de 30 minutos cada. Os fragmentos amplificados de DNA foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta, em câmera Polaroid Gel Cam usando filme Polaroid 667. As fotografias foram digitalizadas e as densitometrias das bandas foram efetuadas no programa BandLeader v.3.00.

3.11. Clonagem em vetor plasmidial

3.11.1. Preparação de Células Eletrocompetentes

Um inóculo de estoque de bactérias da cepa DH10B de *Escherichia coli* mantida a -70 °C foi semeado em meio LB líquido (triptona 10 g, extrato de levedura 5 g e NaCl 5 g para 1 L) e incubado a 37°C, sob agitação, até a cultura atingir uma DO_{600nm} de 0,5. A cultura foi incubada por 20 minutos no gelo e as células foram recuperadas por centrifugação por 5 minutos a 1000 g e 4°C. As células foram ressuspensas em água e novamente centrifugadas como descrito acima. O sedimento foi ressuspendido em metade do volume inicial de água e incubado no gelo por 20 minutos. Esse material foi centrifugado sob as mesmas condições descritas acima e o sedimento foi ressuspendido em 500 µL de glicerol 10 %. Após 10 minutos no gelo as células foram aliquotadas (40 µL / tubo) e mantidas -70 °C.

3.11.2. Ligação e clonagem dos produtos das PCRs

Os produtos das PCRs foram ligados aos braços do plasmídeo pCR 2.1 (Invitrogen). As reações de ligação foram realizadas com 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen), Tris-HCl, pH 7,6, contendo 50 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM e polietilenoglicol-8000 5 % por 16 horas em temperatura ambiente. O produto da ligação foi eletroporado em células eletrocompetentes DH10B, preparadas como descrito anteriormente. As condições de eletroporação foram de 2500 V utilizando cubetas de 0,2 mm (Invitrogen). As células foram ressuspensas em meio LB líquido, incubadas por 1 hora a 37 °C e plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 5 g e ágar 10 g para 1 L) contendo IPTG 1 mM, ampicilina 0,01 % e X-gal 12 mg.

3.11.3. Recuperação de DNA de plasmídeos

Bactérias obtidas de colônias brancas isoladas foram semeadas em meio LB líquido contendo ampicilina 0,01 % (p/v). Após 16 horas de incubação a 37°C, sob agitação, o material foi centrifugado por 5 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Para a recuperação de plasmídeos foram utilizados os reagentes do GFXTM Micro Plasmid Prep kit (Amersham).

3.12. PCR em Tempo Real Quantitativo

Os experimentos de PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando o termociclador Rotor Gene 2000 (CORBETT) na presença de SYBR[®] green, utilizando 400 nM de cada oligonucleotídeo (Tabela 2) e 1 µL de cDNA para um volume final de 20 µL. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 15 minutos e submetidas a 35 ciclos de replicação de 40 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C para anelamento dos oligonucleotídeos e 40 segundos a

72°C. A especificidade das amplificações foram confirmadas através das curvas de dissociação geradas após os ciclos de replicação, de acordo com o manual do fabricante.

A quantificação dos transcritos de vitelogenina foi realizada através da construção de curvas padrão utilizando diluições seriadas de plasmídeos previamente linearizados com enzima de restrição BamH1 em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, contendo MgCl₂ 10 mM e NaCl 100 mM por 1 hora a 37°C. A análise dos dados foi feita no Rotor-Gene Real-Time Analysis software 6.0. Foi realizada também a amplificação de transcritos de actina das amostras de cDNA para confirmação da integridade das amostras.

Tabela 2: Sequências de oligos iniciadores utilizados para PCR em Tempo Real quantitativo.

Transcrito	GenBank (Nº de acesso)	Oligonucleotídeos	Fragmento (pb)
<u>Actina</u>	U20287	<i>Forward</i> - 5' ATTGCTCCACCAGAACGTAAATACT 3' <i>Reverse</i> - 5' CAGGATTAACCTTAGAAGCACTTGCG 3'	151
<u>Apo II</u>	AF038654	<i>Forward</i> - 5' GCGTCGGAAGCTTAGTCAAC 3' <i>Reverse</i> - 5' TGTTGGATCAGCAGAAGCAC 3'	485
<u>Catepsina B vitelogênica</u>	AF127592	<i>Forward</i> - 5' AGTCTAAGGGAAATCCGCGATC 3' <i>Reverse</i> - 5' ACGAGTGACAGCAAGACAGCA 3'	151
<u>Vitelogenina</u>	U02548	<i>Forward</i> - 5' TGAATTTGTCACCCCCGATC 3' <i>Reverse</i> - 5' TTCACGCTTGACACATTCCTG 3'	151

As concentrações de cada plasmídeo foram utilizadas no cálculo de número de cópias de acordo com a seguinte fórmula:

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

3.13. Reação de seqüenciamento de DNA

Os clones e produtos de PCR de interesse foram seqüenciados utilizando Big Dye™ Terminator v 3.1 (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante. Para cada reação foram utilizados 100-200 ng de DNA, oligonucleotídeo M13 (*Foward* – 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' e *Reverse* – 5' GGAAACAGCTATGACCATTG 3') 4 mM, Tris 50 mM, pH 9, e MgCl₂ 1 mM. As amostras foram desnaturadas a 96 °C por 1 minuto e submetidas a 30 ciclos de replicação de 10 segundos a 96 °C, 20 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60 °C. O produto da reação foi precipitado pela adição de 4 volumes de isopropanol 75 % e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. O material foi submetido a 30 minutos de centrifugação a 3100 rpm, o sedimento foi lavado com etanol 70 % e centrifugado como descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi seco por 1 minuto a 90 °C e ressuspendido em 1,3 µL de 5 Dye (Applied Biosystems). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6 % (Long Ranger 50 % Stock Solution, BMA), contendo uréia 6 M em tampão TBE 1x, a uma voltagem de 1680 V por 7 horas, no seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

3.14. *Western blot*

As proteínas separadas pela eletroforese em poliacrilamida na presença de SDS foram eletroforeticamente transferidas para membranas de nitrocelulose (BIO-RAD) utilizando o sistema semi-seco – *Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell* (BIO-RAD) na presença de tampão Tris 48 mM, glicina 39 mM, 0,037 % SDS e metanol 20 %, como descrito por Harlow & Lane (1988). Após a transferência as membranas foram incubadas com diferentes concentrações de anticorpo primário, de acordo com cada experimento. Os anticorpos anti lipoforina, vitelogenina e catepsina B vitelogênica foram produzidos conforme descrito por Capurro *et al.* (1994), Raikhel *et al.* (1986) e Hays & Raikhel (1990), respectivamente. Como

anticorpos secundários foram utilizados anti-IgG de coelho, produzido em cabra, conjugado com peroxidase (Sigma) para experimentos utilizando anticorpos primários anti-Lp e anti-VCB. Nos experimentos cujo anticorpo primário era anti-Vg foi utilizado anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, produzido em ovelha, conjugado com peroxidase. Para visualização dos polipeptídeos reativos foram usados os reagentes do ECL Plus Western Blotting (Amersham).

3.15. Radioimunoensaio (RIA)

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Klaus Hartmann Hartfelder, Professor Associado do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos FMRP/USP. O anticorpo utilizado foi produzido por injeção em coelhos de hemisuccinato de ecdisona como descrito por Bollenbacher *et al.* (1983) e Warren & Gilbert (1986). O ligante não marcado usado para estabelecimento das curvas padrão foi 20-hidroxiectdisona (Simes). A hemolinfa foi coletada em tampão PBS (NaHPO_4 7 mM, NaH_2PO_4 2 mM, pH 7, NaCl 140 mM). Os ecdisteróides contidos nas amostras de hemolinfa foram quantificados conforme Feldlaufer & Hartfelder (1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da infecção por *Plasmodium gallinaceum* na fecundidade de fêmeas da linhagem RED ou Rexville de *Aedes aegypti*.

Duzentos mosquitos foram alimentados em pintainhos sadios ou infectados com *Plasmodium gallinaceum* (2 - 5 % parasitemia). No terceiro dia após o repasto sangüíneo, os mosquitos foram colocados em ovitrampas individuais como descrito em Materiais e Métodos (item 2.4.), após 24 horas as palhetas foram retiradas para determinação do número de ovos. Os tratos digestivos das fêmeas infectadas foram dissecados (sete dias após a infecção) e o número de oocistos foi determinado utilizando microscopia de contraste de fase.

A Figura 3 mostra que a média do número de ovos produzidos por fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas por *Plasmodium gallinaceum* foi reduzida em 26 %. Análises estatísticas usando o Teste *t Student* bicaudal mostraram que essa redução é estatisticamente significativa num intervalo de confiança de 95 % (Tabela 4). Esses dados corroboram com estudos anteriores que demonstram redução de fecundidade de 19 a 33 % nas linhagens BANGKOK, GKEP, ROCK, TRINIDAD, TRIN-GKEP E GKEP-TRIN de *Aedes aegypti* após infecção por *Plasmodium gallinaceum* (Hacker, 1971).

A Figura 4 mostra o número de ovos produzidos e o número de oocistos por trato digestivo em um grupo de fêmeas infectadas por *Plasmodium gallinaceum*. Os nossos resultados mostraram que fêmeas abrigando maior número de oocistos produzem praticamente o mesmo número de ovos que as com poucos oocistos. Confirmando que não há relação entre número de ovos produzidos e intensidade da infecção, como sugerido por Hacker & Kilama (1974).

Como visto na Introdução, item 1.5, o fenômeno de interferência na fecundidade também foi descrito nas infecções por *Plasmodium yoelii nigerienses* e *Plasmodium*

falciparum, em mosquitos *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae*, respectivamente. E que a redução na produção do número de ovos em anofelinos infectados ocorre devido à morte celular programada.

Embora esse fenômeno não tenha sido ainda estudado em *Aedes aegypti*, a apoptose em células foliculares ovarianas pode ser a explicação para a diminuição na fecundidade de *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*, se essa característica for conservada entre os culicíneos.

Tabela 3: Produção de ovos em fêmeas sadias e infectadas por *Plasmodium gallinaceum*.

Fêmeas Controles	Fêmeas Infectadas
26	29
26	62
32	62
39	73
53	77
75	83
77	87
83	98
93	85
97	76
98	95
105	86
109	36
109	78
109	74
112	99
113	76
114	78
114	82
121	81
123	71
127	28
127	58
130	76
139	65
144	33
145	85

Média	97,7	71,6
Desvio Padrão	35,4	19,8

Teste *t Student* bicaudal

Intervalo de confiança: 95 %

$P = 0,0015$

Figura 3: Produção de ovos em fêmeas sadias e infectadas por *Plasmodium gallinaceum*.

As fêmeas de *Aedes aegypti* foram alimentadas com sangue controle ou infectado por *Plasmodium gallinaceum*. após 72 horas foi feita a postura individual, como descrito em Materiais e Métodos. O número individual de ovos produzidos pelas fêmeas foi determinado 24 horas após a postura. As linhas horizontais dispostas entre os pontos representam as médias obtidas para cada grupo.

Figura 4: Número de ovos produzidos em relação à intensidade de infecção no trato digestivo.

Fêmeas de *Aedes aegypti* foram infectadas por *Plasmodium gallinaceum*. Após três dias as fêmeas foram separadas e deixadas para oviposição individual por 24 horas, e o número de ovos foi determinado. Após sete dias, os tratos digestivos foram dissecados em salina de *Aedes* para a determinação do número de oocistos. Coeficiente de correlação: - 0,01.

4.2. Quantificação por radioimunoensaio (RIA) de ecdisona na hemolinfa de *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

Os hormônios ecdisteróides possuem papel fundamental na reprodução de *Aedes aegypti*. A ecdisona é produzida pelos ovários, durante a fase adulta, secretada para a hemolinfa, hidrolisada no corpo gorduroso na forma de 20-hidroxiecdisona (20E) e passa a agir como ativadora indireta da síntese de proteínas de vitelo. As proteínas vitelogênicas sintetizadas nos corpos gordurosos são secretadas para a hemolinfa e endocitadas pelas células ovarianas (Raikhel & Dhadialla, 1992).

Hemolinfa de fêmeas pré-vitelogênicas (mantidas com sacarose) e alimentadas com sangue controle ou infectado foi coletada em tampão PBS e utilizada para quantificação de ecdisona, utilizando-se a técnica de radioimunoensaio, Figura 5.

As quantificações mostraram que fêmeas pré-vitelogênicas apresentam em média 32 pg de ecdisona / μL de hemolinfa e 16 horas após o repasto sangüíneo tanto as fêmeas controles quanto infectadas possuem quantidades similares de ecdisona (44 e 42 pg / μL , respectivamente). A partir de 24 horas após o repasto sangüíneo, em fêmeas infectadas ocorre redução na quantidade de ecdisona em todos os tempos analisados. Fêmeas vitelogênicas 24 e 30 horas após o repasto sangüíneo apresentam em média 42 e 49 pg / μL , enquanto as infectadas possuem 30 e 23 pg / μL , respectivamente. Em 42 horas após a alimentação com sangue controle observa-se quantidades de ecdisona em torno de 19 pg / μL , nas fêmeas infectadas a quantidade de ecdisona foi 9 pg / μL de hemolinfa.

Com esses dados vimos que a infecção por *Plasmodium gallinaceum* altera a produção e/ou secreção de ecdisona pelos ovários. Com isso todos os eventos seguintes na cascata de ativação de genes vitelogênicas deverão estar alterados, refletindo na queda de produção de ovos nas fêmeas infectadas (Figura 3).

Figura 5: Quantificação de Ecdisona em hemolinfa de *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

Foi coletada hemolinfa de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e alimentadas com sangue controle ou infectado. As amostras de hemolinfa foram utilizadas para quantificação de ecdisona por radioimunoensaio como descrito em Materias e Métodos.

4.3. Quantificação de proteínas hemolinfáticas e solúveis de ovários em *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum*.

Os níveis de proteínas totais de hemolinfa e de ovários de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas por *Plasmodium gallinaceum* foram quantificados conforme descrito no item 2.2. de Materiais e Métodos. Os nossos resultados mostraram perfis similares de proteína na hemolinfa de fêmeas controles e infectadas. Porém, em 24 horas após o repasto infectado observa-se um acentuado acúmulo de proteína total (Figura 6).

Os dados de quantificação obtidos mostram quantidades médias de 1,5 μg de proteína total / μL de hemolinfa em fêmeas pré-vitelogênicas, após 24 horas do repasto sanguíneo a quantidade de proteína aumenta para 3,5 μg / μL no grupo controle. Entretanto, nas fêmeas infectadas por *P. gallinaceum* a quantidade de proteína total na hemolinfa é de 5 μg / μL . Nos demais tempos analisados (48 a 192 horas após alimentação com sangue) os valores de proteína total na hemolinfa de fêmeas infectadas foram similares aos de fêmeas controles (em torno de 2,5 μg / μL).

É interessante notar que 24 horas após o repasto é o tempo aproximado de invasão dos oocinetos no epitélio do trato digestivo, isso pode estar associado ao aumento da concentração de proteínas na hemolinfa. Em mosquitos anofelinos ocorre nesse período a secreção pelos hemócitos de moléculas envolvidas no processo de lise e cascata de melanização (Whitten *et al.*, 2006).

Como mostrado na figura 2, entre 168 e 192 horas após o repasto infectado está ocorrendo a liberação de esporozoítas na hemolinfa. Nesse momento somente 10 % dos esporozoítas chegam às glândulas salivares, isso ocorre pela dispersão desordenada dos parasitas pelo corpo do mosquito e pela destruição dos mesmos por ação do sistema imune (Hillyer *et al.*, 2007). No entanto, esse conjunto de eventos ocorridos nesse período não causaram mudanças drásticas no perfil de proteína total na hemolinfa das fêmeas infectadas.

Os dados de quantificação de proteínas solúveis de ovários demonstrados na Figura 6B mostraram uma redução média de 29 % nas fêmeas infectadas em todos tempos analisados após o repasto sangüíneo (24, 48 e 72 horas).

As fêmeas pré-vitelogênicas apresentaram em média 18,6 µg de proteína solúvel / par de ovários, essa concentração aumenta em 24 horas após a alimentação sangüínea (70 µg / par de ovários nas fêmeas controles e 55,8 µg / par de ovários em fêmeas infectadas). Em 48 e 72 horas após o repasto sangüíneo há um acúmulo em torno de 150 µg / par de ovários nas fêmeas do grupo controle, porém nas fêmeas infectadas estes valores estão em torno de 120 µg / par de ovários.

Essa alteração reflete a produção reduzida de ovos pelas fêmeas infectadas, pois, após o repasto sangüíneo todo o acúmulo protéico no ovário está relacionado com a vitelogênese e maturação dos ovócitos. Esse efeito também foi observado por Hogg e colaboradores (1997) em ovários de *Anopheles stephensi* alimentados com sangue de camundongo infectado com *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

Figura 6: Quantificação de proteína total de hemolinfa e ovários de *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum*.

Foram coletadas amostras de hemolinfa e de proteínas solúveis de ovários de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e alimentadas com sangue controle ou infectado. A quantificação de proteína total das amostras foi realizada como descrito em Materiais e Métodos.

4.4. Efeito da infecção por *Plasmodium gallinaceum* na transcrição de *Aedes aegypti*.

Para realização dos experimento de RT-PCR semiquantitativo foi extraído RNA total dos insetos utilizando TRIzol[®] (Life technologies), esse material foi tratado com DNase I (Invitrogen) e usado como molde para a síntese de cDNA, utilizando oligodT. Fêmeas pré-vitelogênicas (mantidas com sacarose), vitelogênicas (24, 48, 72 horas) e pós-vitelogênicas (144, 168 e 192 horas) alimentadas com sangue de pintainhos sadios ou infectados foram usadas nos experimentos.

Foram analisados níveis de mRNA de genes expressos nos corpos gordurosos (vitelogenina, carboxipeptidase e catepsina B vitelogênica, lipoforina, transferrina e do peptídeo antimicrobiano defensina A), de ferritina (expressa principalmente no trato digestivo) e de receptores ovarianos para vitelogenina e lipoforina. O perfil de transcrição do gene da actina foi usado na normalização das análises de densitometria das bandas evidenciadas por brometo de etídeo nos géis de agarose. Todas as seqüências dos fragmentos amplificados nos experimentos de RT-PCR semiquantitativo foram confirmados por seqüenciamento de DNA, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.13.).

A figura 7 mostra os géis de agarose com as bandas evidenciadas por brometo de etídeo correspondentes aos fragmentos amplificados a partir de fitas de cDNA. Na Figura 8 estão apresentados os gráficos de densitometria obtidos a partir das bandas dos géis de agarose. Os resultados demonstrados nessas figuras mostram que nos perfis de vitelogenina, catepsina B e carboxipeptidase há uma redução no acúmulo de transcritos em fêmeas vitelogênicas infectadas (24 horas). Porém, em 48 horas as fêmeas infectadas apresentaram um ligeiro aumento no acúmulo dos transcritos de vitelogenina, catepsina B e carboxipeptidase vitelogênicas. Em 72 horas após o repasto não foram detectados transcritos de genes codificadores para as proteínas vitelogênicas.

A lipoforina, a transferrina e a defensina A apresentaram perfis constitutivos em fêmeas pré-vitelogênicas e vitelogênicas. Porém, no perfil de lipoforina ocorre um aumento expressivo no acúmulo de transcritos em 24 horas após o repasto, esse dado corrobora com dados de estudos anteriores que atribuem esse fenômeno ao aumento da demanda de transporte de lipídeos durante a digestão do sangue (Capurro *et al.*, 1994; van Heusden *et al.* 1998; Marinotti *et al.*, 2006). No entanto, quando comparamos os perfis desses genes em fêmeas pós-vitelogênicas surgem alterações marcantes em 168 e 192 horas após o repasto sangüíneo infectado. Nesse período é possível notar o aumento no acúmulo desses transcritos através da intensidade das bandas nos géis de agarose, também evidenciado nos gráficos normalizados de densitometria.

As análises dos perfis de ferritina e dos receptores de ovários para vitelogenina e lipoforina não demonstraram nenhuma alteração durante o primeiro ciclo gonadotrófico ou em fêmeas pós-vitelogênicas nos grupos controles ou infectados. Resultados obtidos em estudos anteriores, que utilizaram a técnica de *Northern blot* para o monitoramento dos níveis transcricionais desses genes, mostraram que eles apresentam um acúmulo maior de transcritos após a alimentação sangüínea, especialmente no que diz respeito ao acúmulo mRNA de ferritina (Sappington *et al.*, 1996; Dunkov *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2003). No entanto, os aumentos de transcrição desses genes não foram suficientemente expressivos para serem detectados utilizando a técnica de RT-PCR semiquantitativo.

Conforme citado anteriormente, em aproximadamente 24 horas após a ingestão de sangue infectado os oocinetos estão invadindo o epitélio do trato digestivo dos mosquitos. Nesse período observou-se que há um aumento do nível de proteína total em hemolinfa (Figura 4A), porém os níveis de ecdisona estão reduzidos (figura 3), assim como o acúmulo de transcritos de proteínas vitelogênicas (Figura 7 e 8). Por outro lado, quando os oocistos começam a romper e liberar esporozoítas na hemolinfa (168 a 192 horas após o repasto

sangüíneo infectado) há um aumento no acúmulo de mRNA de lipoforina (transportadora de lipídeos na hemolinfa) e de genes envolvidos na resposta imune inata do mosquito (transferrina e defensina A), mas nenhuma alteração marcante pode ser detectada no perfil de proteína total de hemolinfa (Figura 6A).

Figura 7: Análise de abundância de mRNA de genes de *Aedes aegypti* durante infecção por *Plasmodium gallinaceum*.

Nos experimentos de PCR foram utilizadas amostras de cDNA de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e alimentadas com sangue controle (C) ou infectado (I). 24, 48, 72, 144, 168 e 192 correspondem ao número de horas após o repasto sanguíneo.

Figura 8: Perfil de transcrição de genes de *Aedes aegypti* durante infecção por *Plasmodium gallinaceum*.

Os valores de densitometria de bandas de experimentos de RT-PCR semiquantitativo foram determinados com o uso do programa BandLeader v. 3.00. As bandas correspondentes à amplificação do transcrito de actina foram utilizadas como controle de normalização.

4.5. Quantificação absoluta por PCR em tempo real de mRNA de lipoforina, vitelogenina e catepsina B vitelogênica durante a infecção por *Plasmodium gallinaceum*.

RNA total de fêmeas pré-vitelogênicas e alimentadas com sangue controle ou infectado foi extraído e utilizado na síntese de cDNA, para ser usado como molde em reação de PCR em tempo real quantitativo na presença de SYBR® green. Os fragmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram ligados aos braços do plasmídeo pCR 2.1 (Invitrogen). Os plasmídeos contendo os fragmentos clonados foram linearizados após digestão com enzima de restrição e utilizados como molde na construção de curvas padrão que consistiam de diluições seriadas. As quantidades de cópias dos plasmídeos em cada ponto das curvas foram determinadas através da equação mostrada em Materiais e Métodos (item 2.12). As reações contendo cDNA ou plasmídeos linearizados como molde foram submetidas a ciclos de replicação ao mesmo tempo. As quantificações do número de cópias de cDNA de cada amostra foi feita utilizando o programa *Rotor-Gene Real-Time Analysis 6.0*.

Através dessa abordagem experimental foram determinadas as quantidades de mRNA de lipoforina em fêmeas pré-vitelogênicas, vitelogênicas (24, 48 e 72 horas) e pós-vitelogênicas (168 e 192 horas) alimentadas com sangue controle ou infectado, Figura 9.

As fêmeas pré-vitelogênicas apresentaram em média $0,4 \times 10^3$ cópias de mRNA de lipoforina / μg RNA, esse valor aumenta drasticamente 24 horas após o repasto sanguíneo ($34,2 \times 10^3$ cópias / μg RNA - grupo controle - e $35,9 \times 10^3$ cópias / μg RNA - grupo infectado). As quantidades médias de mRNA em 48 horas após o repasto foram de $0,06 \times 10^3$ cópias / μg RNA em fêmeas controle, e de $0,32 \times 10^3$ cópias em fêmeas infectadas. Em 72 horas os valores de quantificação obtidos foram $1,6 \times 10^3$ e $2,7 \times 10^3$ nas fêmeas controles e infectadas, respectivamente. Conforme observado nos dados acima, os valores de

quantificação de mRNA de lipoforina nas fêmeas infectadas são maiores em todos os tempos analisados após o repasto sanguíneo.

Esses dados corroboram com estudos recentes que utilizaram quantificação relativa por PCR em Tempo Real onde foram monitorados os níveis de mRNA de lipoforina, durante o primeiro ciclo gonadotrófico em mosquitos infectados por *Plasmodium gallinaceum*. Os resultados obtidos com as quantificações relativas, no entanto, somente evidenciaram aumento do acúmulo de transcritos de lipoforina 24 horas após o repasto infectado (Cheon *et al.* 2006).

O aumento no acúmulo de mRNA de lipoforina também foi detectado no período de rompimento dos oocistos e liberação dos esporozoítas na hemolinfa (168 e 192 horas após o repasto). Em 168 horas detectou-se $1,5 \times 10^3$ cópias / μg RNA no grupo controle e $5,9 \times 10^3$ cópias / μg RNA no grupo infectado, enquanto em 192 horas os valores obtidos foram $1,3 \times 10^3$ cópias / μg RNA e $3,1 \times 10^3$ μg RNA em fêmeas controles e infectadas, respectivamente.

Na figura 10 estão demonstrados os valores de quantificação de mRNA de vitelogenina durante o primeiro ciclo gonadotrófico de fêmeas alimentadas com sangue controle e infectado por *P. gallinaceum*. Nossos dados mostraram que, assim como observado nos experimentos de RT-PCR semiquantitativo, as fêmeas infectadas apresentam um acúmulo menor de transcritos de vitelogenina durante a infecção por *P. gallinaceum*.

As quantificações realizadas por PCR em tempo real quantitativo mostram que fêmeas vitelogênicas (18 horas) apresentam em média $22,8 \times 10^9$ cópias / μg RNA, enquanto as infectadas apresentam $9,3 \times 10^9$ cópias / μg RNA.

Em 24 horas as fêmeas do grupo controle possuem $11,4 \times 10^9$ cópias / μg RNA e as infectadas $6,3 \times 10^9$ / μg RNA, 30 horas após o repasto sanguíneo detecta-se $13,4 \times 10^9$ e $4,7 \times 10^9$ cópias / μg RNA em fêmeas sadias e infectadas, respectivamente. Por fim, foi quantificada o número de cópias de mRNA de vitelogenina 48 horas após o repasto

sangüíneo, nesse momento foram detectadas $0,10 \times 10^9$ cópias / μg RNA no grupo controle e $0,18 \times 10^9$ cópias / μg RNA no grupo infectado.

Os dados de quantificação dos níveis de mRNA de catepsina B vitelogênica, também demonstraram redução do acúmulo de transcritos desse gene em fêmeas infectadas (Figura 11). As quantificações obtidas mostraram que fêmeas vitelogênicas (18 horas) apresentam em média $1,5 \times 10^9$ cópias / μg RNA e as infectadas apresentam $1,1 \times 10^9$ cópias / μg RNA. Em 24 horas as fêmeas controles possuem $1,4 \times 10^9$ cópias / μg RNA, enquanto as infectadas possuem $1,03 \times 10^9$ / μg RNA. Em 30 horas detecta-se $1,5 \times 10^9$ e $0,5 \times 10^9$ cópias / μg RNA em fêmeas sadias e infectadas, respectivamente. No último ponto analisado (48 horas) as fêmeas tinham em média $0,01 \times 10^9$ cópias / μg RNA no grupo controle e $0,03 \times 10^9$ cópias / μg RNA no grupo infectado.

Em todos os pontos analisados observou-se uma quantidade reduzida de transcritos de vitelogenina e catepsina B nas fêmeas infectadas, com exceção de 48 horas. O sutil aumento no acúmulo desses transcritos em 48 horas também foi refletido no experimento de RT-PCR semiquantitativo (Figura 7 e 8), porém a quantificação relativa obtida pela técnica de RT-PCR evidencia um acúmulo muito maior do que o real.

Estudos em *Anopheles gambiae* infectado por *Plasmodium yoelli nigerienses*, utilizando *Northern blot*, demonstraram que o acúmulo de mRNA de vitelogenina também é reduzido (Ahmed *et al.*, 2001). Os nossos resultados mostram que além da vitelogenina, a catepsina B e a carboxipeptidase vitelogênicas também apresenta redução dos níveis transcricionais durante a infecção, possivelmente, catepsina B e carboxipeptidase vitelogênicas também apresentam esse perfil em anofelinos. As reduções nos níveis transcricionais desses genes refletem a queda das quantidades de ecdisona na hemolinfa (Figura 5), e conseqüentemente de 20-hidroxiecdisona nos corpos gordurosos.

Figura 9: Quantificação por PCR em Tempo Real de mRNA de lipoforina em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

Foram utilizadas amostras de cDNA de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e alimentadas com sangue controle ou infectado. SYBR® green foi utilizado para detecção dos fragmentos amplificados. Os experimentos foram realizados utilizando o termociclador Rotor Gene 2000 (CORBETT) e as análises dos dados foram feitas no programa *Rotor-Gene Real-Time Analysis* 6.0.

Figura 10: Quantificação por PCR em Tempo Real de mRNA de vitelogenina em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

Foram utilizadas amostras de cDNA de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e alimentadas com sangue controle ou infectado. SYBR® green foi utilizado para detecção dos fragmentos amplificados. Os experimentos foram realizados utilizando o termociclador Rotor Gene 2000 (CORBETT) e as análises dos dados foram feitas no programa *Rotor-Gene Real-Time Analysis* 6.0.

* Ponto não analisado.

Figura 11: Quantificação por PCR em Tempo Real de mRNA de catepsina B vitelogênica em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

Foram utilizadas amostras de cDNA de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e alimentadas com sangue controle ou infectado. SYBR® green foi utilizado para detecção dos fragmentos amplificados. Os experimentos foram realizados utilizando o termociclador Rotor Gene 2000 (CORBETT) e as análises dos dados foram feitas no programa *Rotor-Gene Real-Time Analysis* 6.0.

* Ponto não analisado.

4.6. Análise do acúmulo de vitelogenina, catepsina B vitelogênica e lipoforina em hemolinfa e ovários durante a infecção por *Plasmodium gallinaceum*.

As análises dos níveis de lipoforina, vitelogenina e catepsina B vitelogênica na hemolinfa e ovários foram feitas utilizando amostras de fêmeas pré-vitelogênicas, vitelogênicas (24, 48 e 72 horas) e pós-vitelogênicas (168 e 172 horas) controles e infectadas. Esse material foi submetido à eletroforese em SDS-PAGE utilizando diferentes concentrações de acrilamida. Após eletroforese as proteínas hemolinfáticas foram evidenciadas por coloração de nitrato de prata e as proteínas solúveis ovarianas foram coradas com Coomassie Blue R 0,2 %. As proteínas de géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos específicos para realização dos experimentos de *western blot*.

A Figura 12 mostra o perfil do acúmulo de lipoforina na hemolinfa de fêmeas pré-vitelogênicas, vitelogênicas (24, 48 e 72 horas) e pós-vitelogênicas (168 e 192 horas), através de análise eletroforética em SDS-PAGE 8 % (12A) e *western blot* (12B) utilizando anticorpo anti-lipoforina. Os resultados obtidos demonstram que as bandas de *western blot* correspondentes às amostras coletadas durante o primeiro ciclo gonadotrófico (24, 48 e 72 horas após o repasto) não apresentam diferenças visíveis de acúmulo lipoforina até 48 horas. No entanto, 72, 168 e 192 horas após o repasto sangüíneo infectado observa-se um aumento de lipoforina no grupo infectado.

Folly *et al.* (2003) demonstraram que tripanossomatídeos são capazes de captar lipoforina de hemolinfa do seu hospedeiro invertebrado. Por outro lado, estudos com *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* mostraram que os oocistos são capazes de seqüestrar tanto a porção lipídica quanto a protéica da lipoforina circulante na hemolinfa, inclusive apresentando seletividade captando lipoforina e não vitelogenina (Prof^a Giorgia Atella, comunicação pessoal).

Além do aumento observado na transcrição de lipoforina em fêmeas infectadas (Figura 9), que provavelmente reflete numa maior síntese, nessas fêmeas ocorre menos captação de lipoforina pelos ovários devido o menor número de ovócitos em desenvolvimento. A união desses fatores pode ser a causa do aumento dos níveis dessa proteína ao longo da vida de fêmeas infectadas. Ao admitirmos a hipótese de captação de lipoforina pelos oocistos, o mais esperado seria observar um aumento da transcrição e níveis normais de acúmulo, pois o excedente estaria internalizado nos oocistos.

É possível que aumento da síntese de lipoforina também poderia ser estimulada por moléculas produzidas pelo parasita, uma vez que, os nossos dados juntamente com os obtidos pela Dr^a Geórgia Atella indiquem que os parasitas utilizem a lipoforina como fonte nutricional durante o seu desenvolvimento.

Na figura 13 estão demonstrados os perfis eletroforéticos de hemolinfa e ovários em géis SDS-PAGE 10 % (Figura 11A). Os resultados de *western blot*, utilizando anticorpo monoclonal anti-Vg 2 mostram a presença de vitelogenina na hemolinfa 24 e 48 horas após a alimentação com sangue, porém o acúmulo dessa proteína é maior em 24 horas. Ao comparar a banda de vitelogenina em 24 horas é possível detectar um acúmulo menor em fêmeas infectadas. O *western blot* em amostras de ovários também evidencia a diminuição da vitelina em fêmeas vitelogênicas infectadas nas amostras analisadas (24, 48 e 72 horas).

As amostras de hemolinfa e ovários também foram submetidas a SDS-PAGE 12 % (Figura 14A) e *western blot* (Figura 14B) utilizando anticorpo policlonal anti-catepsina B vitelogênica. Os resultados de *western blot* mostraram que em fêmeas infectadas o acúmulo dessa proteína é menor tanto em hemolinfa quanto nos ovários.

Na figura 15 estão representadas as análises de densitometria de bandas de amostras de proteínas solúveis de ovários submetidas a SDS-PAGE 10 % e coradas por Coomassie Blue R. Nessa figura é possível observar o acúmulo reduzido de vitelogenina (pico 1) e catepsina B

(pico 3) nos ovários de fêmeas infectadas, utilizando o pico 2 (subunidade de 55 kDa da vitelina) como normalizador. Esse dado sugere que, além da redução causada pelo menor número de ovócitos em desenvolvimento, as quantidades relativas dessas duas proteínas também estão reduzidas.

Os perfis obtidos em *Aedes aegypti* de transcrição e acúmulo protéico de vitelogenina durante a infecção por *Plasmodium gallinaceum* (Figuras 10 e 13) foram muito similares aos efeitos descritos na literatura em modelos anofelinos (vide Introdução, item 1.5). Isso sugere que em relação a vitelogênese os mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Aedes* apresentam os mesmos mecanismos de resposta à infecção por protozoários do gênero *Plasmodium*.

A redução de expressão de catepsina B vitelogênica somente foi demonstrado no modelo *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*. No entanto, esse fenômeno poderia ocorrer nos modelos anofelinos também. Uma vez que, a expressão do gene da vitelogenina também apresenta redução nesses modelos e os genes codificadores para precursores de vitelo são regulados pela ação do mesmo hormônio (20-hidroxiecdisona).

Figura 12: Perfil protéico de lipoforina em hemolinfa de *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

A) Proteínas de hemolinfa (equivalente a 10 indivíduos) de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e alimentadas com sangue controle (C) ou infectado (I) foram submetidas a SDS-PAGE 10%. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram coradas por nitrato de prata.

B) As proteínas dos géis descritos acima foram transferidas para filtros de nitrocelulose e submetidas a *western blot* com a utilização do anticorpo policlonal anti-lipoforina (1:5000).

C) Análise de densitometria das bandas reativas em *western blot*, os valores foram obtidos através do programa BandLeader v.3.00.

24, 48 e 72 – correspondem a horas após o repasto sangüíneo.

Figura 13: Perfil protéico de vitelogenina em hemolinfa e ovários de *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

A) Proteínas de hemolinfa (equivalente a 10 indivíduos) e ovários (0,1 ovário por canaleta) de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e alimentadas com sangue controle (C) ou infectado (I) foram submetidas a SDS-PAGE 10%. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram coradas por nitrato de prata ou Coomassie Blue R.

B) As proteínas dos géis descritos acima foram transferidas para filtros de nitrocelulose e submetidas a *western blot* com a utilização do anticorpo monoclonal anti-Vg2 (1:10000).

C) Análise de densitometria das bandas reativas em *western blot*, os valores foram obtidos através do programa BandLeader v.3.00.

24, 48 e 72 – correspondem a horas após o repasto sanguíneo.

Vg2 – subunidade de 55 kDa da vitelogenina.

Figura 14: Perfil protéico de catepsina B vitelogênica (VCB) em hemolinfa e ovários de *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

A) Proteínas de hemolinfa (equivalente a 10 indivíduos) e ovários (0,8 ovário por canaleta) de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e alimentadas com sangue controle (C) ou infectado (I) foram submetidas a SDS-PAGE 12%. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram coradas por nitrato de prata ou Coomassie Blue R.

B) As proteínas dos géis descritos acima foram transferidas para filtros de nitrocelulose e submetidas a *western blot* com a utilização do anticorpo policlonal anti-VCB (1:5000).

C) Análise de densitometria das bandas reativas em *western blot*, os valores foram obtidos através do programa BandLeader v.3.00.

24, 48 e 72 – correspondem a horas após o repasto sanguíneo.

Figura 15: Quantificação relativa de vitelogenina e catepsina B vitelogênica em amostras de ovários de *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

Amostras de proteínas solúveis de ovários de fêmeas pré-vitelogênicas e vitelogênicas (24 a 72 horas após repasto sanguíneo) foram submetidas a SDS-PAGE 10% e coradas por Coomassie Blue R. O perfil de densitometria de cada amostra foi obtido com a utilização do programa BandLeader v.3.00. Os picos 1 e 2 correspondem as subunidades 1 e 2 da vitelogenina, o pico 3 corresponde a banda da catepsina B vitelogênica.

4.7. Análise de expressão e identificação por espectrometria de massa de proteínas de hemolinfa.

Nos experimentos de eletroforese bidimensional foram utilizadas amostras de hemolinfa de fêmeas pré-vitelogênicas e 24 horas após alimentação com sangue controle e infectado (Figura 16). As condições de separação dos polipeptídeos foram: gradiente de pH de 4 a 7 durante a focalização isoeletrica, seguida de SDS-PAGE 14 %. Os polipeptídeos foram evidenciados por coloração com nitrato de prata (Shevchenko *et al.* 1996) e os padrões de expressão observados foram confirmados por análise digital dos géis utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum (Amersham), Figura 17. A determinação dos valores teóricos de massa molecular e ponto isoeletrico calculados nos géis bidimensionais, estão demonstrados na Tabela 5.

Para essa análise foram escolhidas 22 proteínas que apresentaram padrões reprodutivos de intensidade e localização nos géis bidimensionais. Dentre elas, sete não modificaram as suas intensidades nos géis e, portanto, foram classificadas como constitutivas (*spots* 1, 2, 7, 24, 25, 26 e 63). As massas moleculares desse polipeptídeos variam de 10,4 a 48,2 kDa e *pI* 4,5 a 5,3.

Na hemolinfa de fêmeas vitelogênicas (24 horas) seis proteínas apresentam maior acúmulo (A, X, 32, 36, 65 e 67) cujas massas moleculares e *pI*s variam entre 34,2 a 78,5 kDa e 4,9 a 6,8, respectivamente. Observou-se também que outras três proteínas (E, 22 e 55) apresentam expressão reduzida, essas proteínas possuem valores entre 18 e 63,7 kDa de massa molecular e 4,5 a 5,2 de *pI*.

Em fêmeas vitelogênicas infectadas há uma dezena de proteínas (X, 8, 9, 13, 14, 18, 36, 55, 56 e 67) que aumentam seus níveis de acúmulo na hemolinfa, elas possuem valores de massa molecular que variam entre 29,9 e 68,8 kDa e os valores de *pI* estão entre 5,1 e 6,5. Sendo que três dessas proteínas (X, 36 e 67) também apresentaram aumento de expressão em

hemolinfa de fêmeas vitelogênicas sadias. O polipeptídeo 22 (58 kDa e pI 4,7) tem a sua expressão reduzida em 12,5 vezes na hemolinfa de fêmeas infectadas. É interessante notar que essa proteína também tem a sua expressão diminuída 2,7 vezes na hemolinfa de fêmeas vitelogênicas sadias.

Na hemolinfa de fêmeas vitelogênicas nota-se que treze proteínas são constitutivas (1, 2, 7, 8, 9, 13, 14, 18, 24, 25, 26, 56 e 63), seis aumentam (A, X, 32, 36, 65 e 67) e três diminuem (E, 22 e 56) a expressão em comparação com hemolinfa de fêmeas pré-vitelogênicas. Quando comparamos o perfil de expressão dessas proteínas com o de fêmeas infectadas observa-se que onze são constitutivas (A, E, 1, 2, 7, 24, 25, 26, 32, 63, 65), dez aumentam (X, 8, 9, 13, 14, 18, 36, 55 e 56) e uma (22) sofre redução de expressão em relação a fêmeas vitelogênicas sadias, Figura 18.

Figura 16: Análise eletroforética bidimensional de proteínas hemolinfáticas.

Amostras de hemolinfa de fêmeas pré-vitelogênicas (FP) e vitelogênicas - 24 horas após repasto com sangue controle (FV) ou infectado (FVI) - foram coletadas, as proteínas foram submetidas a focalização isoeletrica, seguida de SDS-PAGE 14 % e coradas por nitrato de prata. A expressão dos *spots* foi determinada com a utilização do programa ImageMaster™ 2D Platinum (Amersham Biosciences). Os *spots* indicados por setas em FP apresentam expressão constitutiva, os indicados em FV ou FVI apresentam expressão aumentada nessas condições, com exceção para *spots* com numeração circulada, que apresentam expressão diminuída nas respectivas condições onde estão indicados.

Figura 17: Perfis de expressão de proteínas de hemolinfa, 24 horas após alimentação com sangue controle e infectado por *Plasmodium gallinaceum*.

A quantificação foi obtida com uso do programa ImageMaster™ 2D Platinum (Amersham Biosciences), os dados foram normalizados usando o *spot* 1.

A) Perfil das proteínas de hemolinfa de fêmeas vitelogênicas (FV) em relação a fêmeas pré-vitelogênicas (FP).

B) Perfil das proteínas de hemolinfa de fêmeas vitelogênicas infectadas (FVI) em relação a fêmeas vitelogênicas (FV) sadias.

* *Spots* com aumento ou redução de expressão maior de 2,5 vezes

Figura 18: Padrão de expressão de proteínas de hemolinfa após alimentação sangüínea controle e infectada por *Plasmodium gallinaceum*.

Os *spots* selecionados foram recortados dos géis e os polipeptídeos foram submetidos à digestão *in gel* com tripsina. As massas dos peptídeos recuperados dos *spots* foram determinadas em um aparelho MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption – time of flight) modelo Micromass (Waters). Os valores de massas dos peptídeos foram usados para identificação por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) e as análises de PMF foram realizadas com a utilização do programa ALDENTE (<http://www.expasy.org/tools/aldente>).

Albumina bovina e a subunidade de 120 kDa da vitelogenina foram recortadas de géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), submetidas aos processos de digestão *in gel* com tripsina e analisados por espectrometria de massas para serem utilizadas como controles. As identificações obtidas por *Peptide Mass Fingerprinting* dos controles, juntamente com os arquivos de massas dos peptídeos ionizados (*peak lists*) e todos os resultados de identificação obtidos no programa ALDENTE estão demonstrados no Material Suplementar.

Através dessa metodologia foi possível identificar onze das vinte e duas proteínas escolhidas para essa análise. Os resultados de identificação das proteínas de hemolinfa evidenciadas nos géis bidimensionais, assim como a determinação dos valores teóricos de massa molecular e ponto isoeletrico, estão demonstrados na Tabela 5.

As identificações resultaram em proteínas que estão caracterizadas em diferentes insetos. Por exemplo, as proteínas X, 1 e 13 foram identificadas como proteínas anotadas em *Anopheles gambiae*. As proteínas correspondentes aos *spots* 36 e 67 estão anotadas em espécies de lepidópteros (*Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera littoralis*, respectivamente). A proteína correspondente ao *spot* 55 está anotada como pertencente ao gênero *Drosophila* e as demais (2, 9, 22, 24 e 63) foram identificadas como proteínas de *Aedes aegypti*.

Das onze proteínas identificadas, seis não possuem função conhecida (2, 24, 63, X, 9 e 13), três apresentam atividade enzimática (26, 55 e 67), uma (*spot* 36) está envolvida no processo de síntese protéica e outra (*spot* 1) em regulação de transcrição. Análises de

seqüências para predição de localização celular foram feitas no programa WoLF PSORT (www.wolfpsort.org/) e os dados obtidos sugerem que oito são proteínas intracelulares (X, 1, 2, 9, 22, 36, 55, 63) e três (13, 24 e 67) seriam secretadas para o meio extracelular (Figura 19).

A maioria das proteínas identificadas possui predição de localização intracelular, provavelmente, essas proteínas poderiam ser provenientes de células em suspensão na hemolinfa (hemócitos) ou terem sido extraídas acidentalmente de outros tecidos, como por exemplo, o corpo gorduroso. Para tentar esclarecer essa questão as seqüências obtidas foram submetidas à análise de similaridade com o banco de dados de EST (Expressed sequence tags) de *Aedes aegypti*, utilizando a ferramenta de alinhamento tblastn (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=a_aegypti). Os resultados dos alinhamentos mostraram que as proteínas correspondentes aos *spots* 1 e 22 possuem valores de identidade acima de 80 % com seqüências de EST presentes em bibliotecas de corpo gorduroso. Esse dado nos mostra que há grandes chances de algumas das proteínas evidenciadas nos géis bidimensionais pertencerem a outros tecidos, além da hemolinfa.

As proteínas constitutivas identificadas estão numeradas como 1, 2, 24 e 63. O *spot* 1 foi identificado como uma ribonucleoproteína (RNP) pertencente ao complexo protéico que se liga a moléculas precursoras de RNA mensageiro (Lodish *et al.*, 1995). As demais proteínas possuem seqüências de aminoácidos que não permitem inferir uma função molecular. As proteínas correspondentes aos *spots* 2, 24 e 63 estão anotadas no SWISS-PROT como proteínas hipotéticas de *Aedes aegypti*. A proteína 2 possui um domínio conservado presente na enzima álcool desidrogenase que converte etanol em acetaldeído. Enquanto o *spot* 63 possui um domínio protéico presente na enzima DNA polimerase e outro (ERCC4) encontrado em nucleases de *Drosophila melanogaster*, envolvidas em eventos de reparação e recombinação de DNA (Sekelsky *et al.*, 1995). A proteína correspondente ao *spot* 24 também

não possui função nem domínio conservado conhecidos, porém apresenta em sua sequência de aminoácidos um sítio predito de clivagem de peptídeo sinal.

Três proteínas apresentam aumento de expressão na hemolinfa de fêmeas vitelogênicas sadias e infectadas. Essas proteínas estão indicadas nos géis como X, 36 e 67. O *spot* X é uma proteína sem função conhecida que aumenta sua expressão 2,7 vezes em fêmeas vitelogênicas sadias e 9,6 vezes nas infectadas. A identificação obtida para o *spot* 36 foi proteína ribossomal L19, os aumentos de expressão observados para esse polipeptídeo foram de 4 e 2,7 vezes em fêmeas vitelogênicas sadias e infectadas, respectivamente (Figura 17 e Tabela 5).

Como visto, a proteína ribossomal L19 sofre aumento de expressão em fêmeas vitelogênicas infectadas sadias e infectadas. Esse dado sugere que há aumento da síntese de proteínas nesse período, que acabaria por refletir nos aumentos observados de concentração de proteína total em fêmeas vitelogênicas sadias e infectadas (24 horas), Figura 6A.

A proteína 3-dehidroecdisona-3 β redutase, caracterizada na hemolinfa de larvas de *Spodoptera littoralis* (Chen *et al.*, 1999), corresponde ao *spot* 67 e possui atividade óxido redutase, pois, reduz 3-dehidroecdisona em ecdisona na hemolinfa. Os nossos resultados estão mostrando que em *Aedes aegypti* a expressão dessa enzima é aumentada 14,3 vezes em fêmeas vitelogênicas e 3,8 vezes em fêmeas infectadas, Figura 17 e Tabela 5. O aumento observado na expressão dessa enzima é inesperado, pois em 24 horas após o repasto sanguíneo infectado os níveis de ecdisona na hemolinfa estão drasticamente reduzidos (Figura 5). Essa identificação é interessante, pois, a 3-dehidroecdisona-3 β redutase ainda não tinha sido descrita em mosquitos ou insetos adultos. Além disso, estudos mais aprofundados dessa enzima poderão fornecer novas informações sobre a cascata de processamento de ecdisteróides na fase adulta dos mosquitos.

Os *spots* 9 e 13 não possuem função conhecida. Eles aumentam de intensidade 4,1 e 2,6 vezes, respectivamente, na hemolinfa de fêmeas infectadas. As seqüências dessas proteínas também não apresentam domínios conservados conhecidos. No entanto, a proteína correspondente ao *spot* 13 apresenta um sítio predito de clivagem de peptídeo sinal, mostrando que essa proteína também pode ser secretada para o meio extracelular.

A proteína correspondente ao *spot* 22, que apresenta redução de expressão em hemolinfa de fêmeas vitelogênicas controles (2,7 vezes) e infectadas (12,5 vezes), foi identificada como ciclofilina. Essa proteína possui atividade enzimática de catalisar a conformação de proteínas (Fisher & Schmid, 1990). A queda da expressão dessa proteína após uma alimentação sangüínea sugere que a mesma possua um papel mais atuante em processos relacionados com a pré-vitelogênese dos mosquitos.

A 6-fosfogluconato dehidrogenase (*spot* 55) possui um perfil interessante, pois, apresenta redução de expressão de 4,1 vezes em fêmeas vitelogênicas e aumento de 3,7 vezes nas fêmeas infectadas. Essa enzima participa da via da pentose fosfato, formando a molécula de ribose-5-fosfato utilizada na síntese dos nucleotídeos (Lodish *et al.*, 1995). O perfil de expressão dessa enzima fornece algumas evidências do padrão de expressão gênica em 24 horas após o repasto sangüíneo. Pois, essa enzima envolvida no processo de síntese de nucleotídeos está reduzida e o acúmulo de proteína total na hemolinfa é aumentado em 24 horas (Figura 6A), isso sugere maior envolvimento de tecidos nos processos de síntese e secreção protéica; outro dado que reforça essa hipótese é o aumento de expressão de proteína ribossomal (*spot* 36) em fêmeas vitelogênicas.

No entanto, quando o mosquito está infectado o acúmulo protéico na hemolinfa é ainda maior (Figura 6A) e a 6-fosfogluconato dehidrogenase também apresenta aumento de sua expressão nas fêmeas infectadas (Figura 17 e Tabela 5).

Os dados disponíveis na literatura não indicam que células sanguíneas de mosquitos realizem divisão nesse período, que seria uma possível explicação para aumento de síntese de ácidos nucleicos devido à necessidade de duplicação do genoma. Sendo assim, o mais provável é que o aumento da síntese de ácidos nucleicos seja devido à produção de maior quantidade e / ou variedade de transcritos em resposta ao parasita. Esse tipo de alteração provocada pela presença do patógeno poderia ser uma das explicações possíveis para o inseto reduzir seu investimento no processo de produção de ovos.

Conforme os dados obtidos, a maior parte das proteínas não possuem funções moleculares caracterizadas. De fato, somente proteínas mais abundantes ou majoritárias foram caracterizadas em hemolinfa de insetos adultos. Isso ocorre devido a pouca abundância desse material nessa fase da vida do mosquito. Porém, as abordagens experimentais utilizando técnicas proteômicas, como as usadas nesse trabalho, permitem o estudo de proteínas de amostras pouco abundantes.

Com os dados obtidos foi possível fazer uma caracterização proteômica, em pequena escala, de amostras ricas em hemolinfa de fêmeas adultas de *Aedes aegypti*. E além disso, foi possível observar as alterações desse conjunto de proteínas frente à infecção por um patógeno. Acreditamos que o conjunto de dados obtidos nesses experimentos serão úteis no direcionamento de trabalhos futuros de investigação das relações entre parasitas e insetos vetores.

Tabela 5: Caracterização de proteínas de hemolinfa de por Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de massas.

<u>Spot</u>	<u>Mm^a</u> (kDa)	<u>pI^a</u>	<u>Identificação por MALDI-TOF</u> (Número de acesso UNIPROT) ^b	<u>Hits^c</u>	<u>Cobertura^d</u>	<u>Função Predita^e</u>
Constitutivamente expressas						
1	25,6	4,5	ENSANGP00000011832 (Q7PQG7)	4	37 %	Regulação de transcrição
2	10,4	5,3	Proteína hipotética (Q16WI6)	8	16 %	Desconhecida
7	22,3	5,1	-	-	-	-
24	40,1	4,9	Proteína hipotética (Q17BU5)	5	13 %	Desconhecida
25	37,4	5,3	-	-	-	-
26	12,1	4,5	-	-	-	-
63	48,2	4,8	Proteína hipotética (Q16NF1)	9	21 %	Desconhecida
Expressão aumentada em fêmeas vitelogênicas (24 horas)						
A	34,2	5,9	-	-	-	-
X	56,9	6,5	ENSANGP00000012950 (Q7PTP5)	5	14 %	Desconhecida
32	78,5	6,8	-	-	-	-
36	56,9	6,3	Proteína ribossomal L19 (Q8ISR3)	5	36 %	Síntese proteica
65	69,8	4,9	-	-	-	-
67	34,2	5,8	3-dehidroecdisona 3beta-redutase (Q9Y020)	5	18 %	Atividade enzimática
Expressão reduzida em fêmeas vitelogênicas (24 horas)						
E	18	4,5	-	-	-	-
22	58	4,7	Ciclofilina (Q16NE3)	9	14	Atividade enzimática
55	63,7	5,2	6-fosfogluconato dehidrogenase (Q6B3H8)	4	63 %	Atividade enzimática
Expressão aumentada em fêmeas vitelogênicas infectadas (24 horas)						
X	56,9	6,5	ENSANGP00000012950 (Q7PTP5)	5	14 %	Desconhecida
8	29,9	5,4	-	-	-	-
9	33,1	5,3	Proteína hipotética (Q17LN3)	14	10 %	Desconhecida
13	47,2	5,3	ENSANGP00000030655 (A0NG54)	4	64 %	Desconhecida
14	49,3	5,2	-	-	-	-
18	68,8	5,1	-	-	-	-
36	56,9	6,3	Proteína ribossomal L19 (Q8ISR3)	5	36 %	Síntese proteica
55	63,7	5,2	6-fosfogluconato dehidrogenase (Q6B3H8)	4	63 %	Atividade enzimática
56	59,9	5,4	-	-	-	-
67	34,2	5,8	3-dehidroecdisona 3beta-redutase (Q9Y020)	5	18 %	Atividade enzimática
Expressão reduzida em fêmeas vitelogênicas infectadas (24 horas)						
22	58	4,7	Ciclofilina (Q16NE3)	9	14	Atividade enzimática

a) As massas moleculares (Mm) e pontos isoelétricos (pI) teóricos foram calculados conforme as posições dos *spots* nos géis, utilizando marcador de massa molecular *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* cat. 10748-010 (Invitrogen) e o gradiente linear de pH dos IPG *strips* pH 4-7, 7 cm (BIO-RAD).

b) <http://ca.expasy.org/uniprot/>

c) Quantidade de peptídeos do espectro de massas que possuem a mesma massa molecular de peptídeos da proteína identificada, quando digerida *in silico*.

d) Porcentagem de cobertura de *matches* nas seqüências das proteínas.

e) Predição com base nos dados de Ontologia gênica (GO) e domínios conservados descritos no UNIPROT para cada proteína.

Figura 19: Distribuição de categorias quanto à função e localização das proteínas identificadas por espectrometria de massas.

As funções moleculares foram divididas com base nas informações da Tabela 5. O programa WoLF PSORT (www.wolfpsort.org/) foi utilizado na determinação da localização celular das proteínas.

5. CONCLUSÕES

A utilização de *Aedes aegypti* permitiu um amplo estudo da infecção pelo parasita *Plasmodium gallinaceum* devido a grande quantidade de informações biológicas, bioquímicas e moleculares disponíveis para essa espécie de mosquito.

A união dos resultados obtidos com as diferentes técnicas utilizadas desvendou um interessante e dinâmico panorama fisiológico durante a infecção. No qual fica evidente o complexo sistema de adaptação do inseto, envolvendo processos hormonais, transcricionais e traducionais, para sobreviver à espoliação dos parasitas e seguir com o ciclo reprodutivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, AM, Hurd, H. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. *Microbes and Infection*, 2006; 8: 308-315.
- Ahmed, AM, Maingon, R, Taylor, PJ, Hurd, H. The costs of mounting an immune response are reflected in the reproductive of fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Oikos*, 2002; 97: 371-377.
- Ahmed, AM, Maingon, RD, Romans, P, Hurd, H. Effects of malaria infection on vitellogenesis in *Anopheles gambiae* during two gonotrophic cycles. *Insect Mol. Biol.*, 2001; 10 (4): 347-356.
- Ahmed, AM, Maingon, RD, Taylor, P.J, Hurd, H. The effects of infection on the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Invertebr. Repr. Develop.* 1999; 36: 1-3.
- Attardo, GM; Hansen, IA; Raikhel, AS. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2005; 35: 661-675.
- Beerntsen, BT, Severson, DW and Christensen, BM *Aedes aegypti*: Characterization of a hemolymph polypeptide expressed during melanotic encapsulation of filarial worms. *Exp. Parasitol.*, 1994; 79: 312-321.
- Bollenbacher, WE, O'Brien, MA, Katahira, EJ, Gilbert, LI. A kinetic-analysis of the action of the insect prothoracicotropic hormone. *Mol. Cel. Endocr.*, 1983; 32: 27-43.
- Brown, MR, Graf, R, Swiderek, KM, Fendley, D, Stracker, TH, Champagne, DE, Lea, AO. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. 1998; 273(7): 3967-3971.
- Chapman, RF. Circulatory system, blood and immune systems in: *The Insects – Structure and Function*, Cambridge: Cambridge University Press, 1998, pp. 106-114.

- Chen J; Turner PC, Rees, HH. Molecular cloning and characterization of hemolymph 3-dehydroecdysone 3B-reductase from the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. J. Biol. Chem., 1999; 274 (9): 10551-10556.
- Chen, J; Cho, WL; Raikhel, AS. Mosquito vitellogenin cDNA. Sequence similarity with vertebrate vitellogenin and insect larval hemolymph proteins. J. Molec. Biol., 1994; 237: 641-647.
- Cheon, H, Shin, SW, Bian, G, Park, G, Raikhel, AS, Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. J. Biol. Chem., 2006; 281(13): 842-8435.
- Cho, WL, Deitsch, KW, Raikhel, AS. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes in a carboxypeptidase activated in embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991; 88: 10821-10824.
- Clements AN. The Biology of Mosquitoes volume 1 Development, Nutrition and Reproduction. Londres: Chapman & Hall, 1992, pp. 360-405.
- Deitsch, KW, Chen, J, Raikhel, AS. Indirect control of yolk protein genes by 20-hydroxyecdysone in the fat body of the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect. Biochem. Molec. Biol., 1995; 25(4): 449-454.
- Dimopoulos, G, Seeley, D, Wolf, A, Kafatos, FC. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. EMBO J., 1998; 17: 6115-6123.
- Dunkov, BC, Georgieva, T, Yoshiga, T, Hall, M, Law, JH. *Aedes aegypti* ferritin heavy chain homologue: feeding of iron or blood influences message levels, lengths and subunit abundance. J. Insect Science, 2002; 2(7): Não paginado.
- Farnaud, S; Ewans, RW. Lactoferrin – A multifunctional protein with antimicrobial properties. Mol. Immunol., 2003; 40: 395-405.

- Feldlaufer, MF, Hartfelder, KH. Relationship of the neutral sterols and ecdysteroids of the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* to those of the honey bee, *Apis mellifera*. J. Insect Physiol., 1997; 43: 541-545.
- Fischer G, Schmid FX. The mechanism of protein folding. Implications of *in vitro* refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. Biochemistry, 1990; 29: 2205-2212
- Folly, E, Cunha e Silva, NL, Lopes, AHCS, Silva-Neto, MAC, Atella, GC. *Trypanosoma rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host. Biochem. Bioph. Res. Commun. 2003; 310: 555-561.
- Gray, EM, Bradley, TJ. Malarial infection in *Aedes aegypti*: effects on feeding, fecundity and metabolic rate. *Parasitology*, 2005; 132: 1-8.
- Greenwood, B, Mutabingwa, T. Malaria in 2002. *Nature*, 2002; 415: 670-672.
- Hacker, CS The differential effect of *Plasmodium gallinaceum* on the fecundity of several strains of *Aedes aegypti*. J. Invert. Pathol., 1971; 18: 373-377.
- Hacker, CS, Kimala, WL. The Relationship between *Plasmodium gallinaceum* Density and the Fecundity of *Aedes aegypti*. J. Invertebr. Pathol., 1974; 23: 101-105.
- Han, YS, Barillas-Mury, C. Implications of Time Bomb model of ookinete invasion of midgut cells. Insect Biochem. Mol. Biol., 2002; 32: 1311-1316.
- Han, YS, Thompson, J, Kafatos, FC, Barillas-Mury, C. Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. EMBO J., 2000; 19: 6030-6040.
- Harizanova, N, Georgieva, T, Dunkov, BC, Yoshiga, T, Law, JH. *Aedes aegypti* transferring, gene structure, expression pattern, and regulation. Insect Mol. Biol., 2005; 14(1): 79-83.
- Hays, AR, Raikhel, AS. A novel protein produced by the vitellogenic fat body and accumulated in mosquito oocytes. Roux's Arch. Develop. Biol., 1990; 199: 114-121.

- Hillyer, JF, Barreau, C, Vernick, KD. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *Int. J. Parasitol.*, 2007; 37(6): 673-681.
- Hogg, JC, Cawardine, S, Hurd, H. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on ovarian protein accumulation by *Anopheles stephensi*. *Parasitol. Res.*, 1997; 83: 374-379.
- Hogg, JC, Hurd, H. *Plasmodium yoelii nigeriensis*: effect of high and low intensity of infection upon the egg production and blood meal size of *Anopheles stephensi* during three gonotrophic cycles. *Parasitology*, 1995; 111: 555-562.
- Hogg, JC, Hurd, H. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae s.l.* in north east Tanzania. *Parasitology*, 1997; 114: 325-331.
- Hopwood, JA, Ahmed, AM, Polwart, A, Williams, GT, Hurd, H. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: A mechanism to control vector egg production. *J. Exp. Biol.*, 2001; 204: 2773-2780.
- Hurd, H., Taylor, PJ, Adams, D, Underhill, A, Eggleston, P. Evaluating the costs of mosquito resistance to malaria parasites. *Evolution Int. J. Org. Evolution*, 2005; 59(12); 2560-2572.
- Jahan, N, Hurd, H. Effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* on (Haemosporidia: Plasmodiidae) *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) vitellogenesis. *J. Med. Entomol.*, 1998; 35(6): 956-961.
- Kim, W, Koo, H, Richman, AM, Seeley, D, Vizioli, J, Klocko, AD, O'Brochta, DA. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *J. Med. Entomol.*, 2004; 41: 447-455.
- Kokoza, VA; Martin, D; Mienaltowski, MJ; Ahmed, A; Morton, CM; Raikhel, AS. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. *Gene*, 2001; 274: 47-65.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 3. ed., cap.12, p. 494-495. Oxford: Scientific American Books, 1995.

- Luckhart, S, Crampton, AL, Zamora, R, Lieber, MJ, Dos Santos, PC, Peterson, TML, Emmith, N, Lim, J, Wink, DA, Vodovotz, Y. Mammalian transforming growth factor betal activated after ingestion by *Anopheles stephensi* modulates mosquito immunity. Infect. Immun., 2003; 71: 480-486.
- Luckhart, S, Vodovotz, Y, Cui, L, Rosenberg, R. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998; 95: 5700-5705.
- Marinotti, O, Capurro, ML, Nirmala, X, Calvo, E, James, AA, Structure and expression of the lipophorin-encoding gene of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. Comp. Biochem. Physiol., 2006; 144B: 101-109.
- Michel, K, Kafatos, FC. Mosquito immunity against *Plasmodium*. Insect Biochem. Mol. Biol., 2005; 35: 677-689.
- Muller, HM, Dimopoulos, G, Blass, C, Kafatos, FC. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. J. Biol. Chem., 1999; 274: 11727-11735.
- Murphy, M.P. Nitric oxide and cell death. Biochim. Bioph., 1999; 1411: 401-414.
- Raikhel, AS, Dhadialla, TS. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. Annu. Rev. Entomol. 1992; 37: 217-251.
- Raikhel, AS, Kokoza, VA, Zhu, J, Martin, D, Wang, S, Chao, L, Sun, G, Ahmed, A, Dittmer, N, Attardo, G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 2002; 32: 1275-1286.
- Raikhel, AS, Pratt, L, Lea, AO. Monoclonal antibodies as probes for processing of yolk protein in the mosquito; production and characterization. J. Insect Physiol., 1986; 32: 879-890.

- Richman, AM, Dimopoulos, G, Seeley, D, Kafatos, FC. *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. EMBO J., 1997; 16(20): 6114-6119.
- Sappington, TW, Kokoza, VA, Cho, W, Raikhel, AS. Molecular characterization of the homology to the *Drosophila* yolk protein receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996; 93: 8934-8939.
- Sekelsky, JJ, McKim, KS, Chin, G.M., Hawley, RS. The *Drosophila* meiotic recombination gene mei-9 encodes a homologue of the yeast excision repair protein Rad1. Genetics, 1995; 141(2): 619-627.
- Seo, S, Cheon, H, Sun, J, Sappington, TW. Tissue- and stage-specific expression of two lipophorin receptor variants with seven and eight ligand-binding repeats in the adult mosquito. J. Biol. Chem., 2003; 278(43): 41954-41962.
- Sherman, IW. Gametocytes and Sexual Development in: Malaria – Parasite Biology, Pathogenesis and Protection. Estados Unidos da América: ASM PRESS, 1998. pp. 31-33.
- Shevchenko, A., Wilm, M, Vorm, O, Mann, M. Mass spectrometry sequencing of proteins from silver stained polyacrilamde gels. Anal. Chem., 1996; 68: 850-858.
- Spector, T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. Anal. Biochem., 1978; 86: 142-146.
- Warren, JT, Gilbert, LI. Ecdysone metabolism and distribution during the pupal-adult development of *Manduca sexta*. Insect Biochem., 1986; 16: 65-82.
- Whitten, MMA, Shiao, SH, Levashina, EA. Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. Parasite Immun., 2006; 28: 121-130.
- WHO. The World Health Report 2004. World Health Organization; 2004.
- Yoshiga, T, Hernandez, VP, Fallon, AM, Law, JH. Mosquito transferrin, acute-phase protein that is up-regulated upon infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 12337-12342.