

SORAIA DE LIMA OLIVEIRA

**Estudo de genes diferencialmente expressos em
Aedes aegypti após infecção com *Plasmodium
gallinaceum* ou vírus de Dengue**

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

São Paulo
2011

SORAIA DE LIMA OLIVEIRA

**Estudo de genes diferencialmente expressos em
Aedes aegypti após infecção com *Plasmodium
gallinaceum* ou vírus de Dengue**

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

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

Versão original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Oliveira, Soraia de Lima.

Estudo de genes diferencialmente expressos em *Aedes aegypti* após infecção com *Plasmodium gallinaceum* ou vírus de Dengue / Soraia de Lima Oliveira. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Mosquitos geneticamente modificados.

Versão do título para o inglês: Study of genes expressed in *Aedes aegypti* after infection with *Plasmodium gallinaceum* or Dengue viruses

Descritores: 1. *Aedes* 2. Expressão Gênica 3. Dengue 4. *Plasmodium* I. Guimarães, Margareth de Lara Capurro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0190/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Soraia de Lima Oliveira.

Título da Dissertação: Estudo de genes diferencialmente expressos em *Aedes aegypti* após infecção com *Plasmodium gallinaceum* ou vírus de Dengue .

Orientador(a): Margareth de Lara Capurro Guimarães.

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

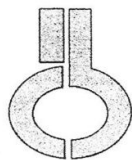
() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

CERTIFICADO

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

São Paulo, 29 de outubro de 2009.

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

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

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

À Deus que é meu refúgio e minha força,
Ao meu marido Luiz Carlos e aos meus
filhos Diego e Natália, por toda dedicação,
paciência, compreensão, amor e carinho
demonstrados diariamente.

Aos meus pais Tiago e Nina por todo o
amor e apoio.

As minhas irmãs Scyla e Michele pelo
amor, carinho e risadas.

Amo muito vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Margareth Capurro pela oportunidade, por ter acreditado em meu trabalho, pelas críticas sempre construtivas e pelos momentos de descontração no laboratório. Por me apresentar esse mundo da ciência, pelo qual me apaixonei. Muito obrigada!!!

Ao Professor Dr. Gerhard Wunderlich pelo maravilhoso exemplo de amor e entusiasmo pela profissão, pelas dicas, conselhos e auxílio no momento em que mais precisei. Por disponibilizar seu laboratório, tempo e reagentes, aprendi muita coisa nova. Muito obrigada pela paciência.

Ao Professor Dr. Carlos Eduardo Winter, pelas sugestões em vários experimentos, por esclarecer tantas dúvidas, por sempre estar pronto a ajudar.

Aos meus estimados amigos do laboratório:

Danilo, quanta orelhada, quantas coisas erradas que no fim deram certo. Como foi bom trabalhar com você, fazíamos tantos experimentos, trabalhávamos como camelos, mas nunca perdíamos o bom humor, sempre cabia uma piada. Muito obrigada por compartilhar comigo tantos momentos bons e difíceis, obrigada por sua amizade que me é muito cara.

Laisinha, obrigada por me ajudar no desenho dos experimentos, no entendimento de várias técnicas, por estar sempre por perto para tirar minhas dúvidas, me ajudar a interpretar meus resultados e me ouvir, mesmo que por Skype. Obrigada por sua amizade.

André, obrigada pela paciência, pelas discussões científicas, por dividir comigo um pouco do seu conhecimento, pelo direcionamento que sempre procurou me dar, por ler meus textos, ouvir meus lamentos, e acima de qualquer coisa, por ser meu amigo. Muito obrigada!!

Bianca, que saudade de você!!! Ter você por perto faz toda a diferença. Obrigada por tudo que você fez por mim nos meus momentos de calouro, obrigada pela amizade que construímos, pelas sugestões científicas, pela alegria que você sempre trouxe para esse laboratório. Você faz muita falta.

André(Picachu) muito obrigada pela preocupação e dicas, por ser tão alegre e positivo, por sempre achar uma forma fácil para a resolução de problemas gigantescos, por ser meu amigo.

Neuzinha, Dih, Izabel pela ajuda na organização e limpeza do laboratório, pelas conversas gostosas no início da manhã. Muito obrigada por tudo que vocês fazem por nós.

Kelly, apesar de você não estar mais no nosso laboratório, sinto como se você ainda fizesse parte do lab MGM, obrigada pela sua amizade e por toda a ajuda e companhia nas revelações dos westerns tarde da noite.

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

À FAPESP e Cnpq, pelo apoio financeiro.

A educação faz com que as pessoas sejam fáceis de guiar, mas difíceis de arrastar; fáceis de governar, mas impossíveis de escravizar.
(Henry Peter)

RESUMO

OLIVEIRA, S. L. **Estudo de genes diferencialmente expressos em *Aedes aegypti* após infecção com *Plasmodium gallinaceum* ou vírus de Dengue.** 2011. XX f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os mosquitos pertencentes à família Culicidae (Diptera) desempenham importante papel como vetores de patógenos causadores de doenças que acometem o homem em várias partes do mundo (MARCONDES, 2001), causando um grande impacto socioeconômico e de saúde pública nas áreas em que ocorrem.

Aspectos biológicos e comportamentais dos mosquitos também contribuem decisivamente para sua atuação como transmissor de patógenos que atingem as populações humanas. O repasto sanguíneo é um processo fisiológico fundamental no ciclo de vida destas espécies. Por outro lado, a alimentação sanguínea infectada causa mudanças no metabolismo das fêmeas recém-ingurgitadas, desencadeando a expressão diferencial de genes envolvidos em respostas imunológicas, como também de genes envolvidos em outros processos fisiológicos. Como um dos interesses de nosso grupo é estudar as alterações sofridas pelo inseto vetor após a infecção por patógeno, nesse trabalho o ponto de partida para esse estudo foi a escolha dos genes DV431431, DV340891 e DV411647 que nas análises *in silico* apresentaram expressão diferencial mediante a infecção por vírus da Dengue ou *Plasmodium gallinaceum*. Após experimentos de RT-PCR em tempo real, foi mostrado que apenas o gene DV411647 apresentou expressão elevada 48 horas após a alimentação sanguínea infectada tanto por *P. gallinaceum* como por vírus dengue. Na busca por uma função predita desse gene em mosquitos, nós utilizamos a ferramenta Editseq através do software DNASTAR para traduzir o peptídeo que apresentou maior número de aminoácidos, e confrontamos através de Blastp com o banco de dados GenBank, obtivemos uma provável desidrogenase/reductase de cadeia curta (AAK55494). Experimentos de *Western blot* evidenciaram que esta proteína está presente no intestino médio das fêmeas 72 horas após a alimentação com sangue infectado por vírus dengue tipo 2.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Intestino médio. Expressão gênica. Dengue.

Plasmodium

ABSTRACT

OLIVEIRA, S. L. **Study of genes differentially expressed in *Aedes aegypti* after infection with *Plasmodium gallinaceum* or Dengue viruses.** 2011. XX f. Master thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Mosquitoes belonging to the family Culicidae (Diptera) play an important role as vectors of disease-causing pathogens that affect humans in various parts of the world (Marcondes, 2001), causing a great socioeconomic impact and public health areas in which they occur.

Biological and behavioral aspects of mosquito also contribute decisively to its role as a transmitter of pathogens that affect human populations. The blood meal is a fundamental physiological process in the life cycle of these species. On the other hand, the infected blood meal causes changes in the metabolism of newly engorged females, triggering the differential expression of genes involved in immune responses, as well as genes involved in other physiological processes. As one of the interests of our group is to study the changes undergone by the insect vector after infection with the pathogen, in this work the starting point for this study was the selection of genes DV431431, DV340891 and DV411647 that the in silico analysis showed differential expression by Dengue virus infection of *Plasmodium gallinaceum*. Após or RT-PCR experiments in real time, it was shown that only the gene DV411647 had high expression 48 hours after the blood meal infected by both *P. gallinaceum* as for dengue virus. In the search for a predicted function of this gene in mosquitoes, we use the tool Editseq by DNASTar software to translate the peptide with the highest number of amino acids, and confronted by blastp with the GenBank database, we obtained a probable dehydrogenase / reductase short chain (AAK55494). Western blot experiments showed that this protein is present in the midgut of females 72 hours after feeding with blood infected with dengue virus type 2.

Key words: *Aedes aegypti*. Midgut. Gene expression. Dengue. *Plasmodium*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diversidade dos insetos em relação aos demais grupos.....	18
Figura 2 – Foto do mosquito adulto <i>Aedes aegypti</i> com destaque da ornamentação em forma de lira.....	21
Figura 3 – Ciclo de vida holometabólico de um mosquito, exemplificado pela espécie <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 4 – Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> durante e após o processo de hematofagia, com marcante alteração morfológica no abdômen.....	24
Figura 5 – Exemplo de mosquitos vetores conhecidos.....	25
Figura 6 – Representação esquemática do algoritmo para busca manual de candidatos gênicos com expressão em banco de dados.....	40
Figura 7 – Amplificação genômica de fragmentos dos 3 genes candidatos de <i>Aedes aegypti</i>	61
Figura 8 – Busca <i>in silico</i> na base de dados VectorBase para o transcrito TC61246... ..	62
Figura 9 – Busca <i>in silico</i> na base de dados NCBI (GenBank) do peptídeo traduzido à partir do transcrito DV431431.....	63
Figura 10 – Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos à partir do cDNA que codifica o transcrito DV431432.....	64
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de RT-PCR em <i>Aedes aegypti</i> durante o ciclo de vida.....	66
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA do plasmídeo com inserto DV431431.....	67

Figura 13 – Análise do perfil de RNAs de DV431431 durante o ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	68
Figura 14 – Análise comparativa do perfil de mRNAs de DV431431 durante a infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	69
Figura 15 – Perfil espacial de transcrição do gene DV431431 durante a infecção por <i>P. gallinaceum</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	70
Figura 16 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene DV431431(Proteína Hipotética) mediante a infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	71
Figura 17 – Perfil espacial de transcrição do gene DV431431.....	72
Figura 18 – Busca in silico na base de dados VectorBase para o transcrito TC52023.....	73
Figura 19 – Busca in silico na base de dados NCBI(GenBank) do peptídeo traduzido à partir do transcrito DV340891.....	74
Figura 20 – Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos à partir do cDNA que codifica o transcrito DV340891.....	75
Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR em <i>Aedes aegypti</i> em diferentes estágios de desenvolvimento.....	76
Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA do plamídeo com inserto DV340891.....	77
Figura 23 – Análise do perfil de RNAs de DV340891 durante o ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	78
Figura 24 – Análise comparativa do perfil de mRNAs de DV340891 durante a infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	79
Figura 25 – Perfil espacial de transcrição do gene DV340891 durante a infecção por <i>P. gallinaceum</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	80

Figura 26 – Perfil espacial de transcrição do gene DV340891 durante a infecção por <i>P. gallinaceum</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	81
Figura 27 – Busca in silico na base de dados VectorBase para o transcrito TC51426.....	82
Figura 28 – Análise in silico na base de dados VectorBase para o transcrito TC51426.....	83
Figura 29 – Anotação in silico do transcrito AAEL010137(AAEL801151).....	83
Figura 30 – Busca in silico na base de dados NCBI(GenBank) do peptídeo traduzido à partir do transcrito DV431647.....	84
Figura 31 – Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos à partir do cDNA que codifica o transcrito DV411467.....	85
Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR em <i>Aedes aegypti</i> em diferentes estágios de desenvolvimento.....	86
Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA do plasmídeo com inserto DV411647.....	87
Figura 34 – Análise do perfil de RNAs de DV411647 durante o ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	88
Figura 35 – Análise comparativa do perfil de mRNAs de DV411647 durante a infecção por <i>Plasmodium gallinaceum</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	89
Figura 36 – Perfil espacial de transcrição do gene DV411647 durante a infecção por <i>P. gallinaceum</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	90
Figura 37 – Perfil espacial de transcrição do gene que codifica para Cetoreductase durante a infecção por <i>P. gallineum</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	91
Figura 38 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR e PCR Nested em cultura celular.....	92

Figura 39 – PCR diagnóstico. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> infectadas e não infectadas por vírus dengue tipo 2.....	92
Figura 40 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> infectadas e não infectadas por vírus dengue tipo 2.....	93
Figura 41 – Análise comparativa do perfil de mRNAs de DV411647 durante a infecção por vírus dengue sorotipo 2 em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	94
Figura 42 – Perfil espacial de transcrição do gene que codifica para Cetoreductase durante a infecção por vírus dengue em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	95
Figura 43 – Western Blot referente a expressão da proteína recombinante cetoreductase fusionada à GST.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados nos experimentos de PCR, RT-PCR e RT-PCR em tempo real para amplificação de fragmentos dos genes candidatos.....59

Tabela 2 – Iniciadores utilizados nos experimentos de PCR, RT-PCR e RT-PCR em tempo real para amplificação de fragmentos dos genes constitutivos.....59

Tabela 3 – Resultado do BLASTN dos ESTs de *Aedes aegypti* do banco da TIGR gene index contra sequências de transcritos depositadas no banco Vectorbase e GenBank.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – micrograma

μL – micro Litro

μM – micromolar

CDC – Centers for disease control and prevention

DEPC – dietil-pirocarbonato

DEN – vírus dengue

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – densidade óptica

dNTP – desoxirribonucleosídeo trifosfato

DTT – dietiltreitol

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

ESTs – expressed sequence tags (etiquetas de sequências expressas)

IPTG – isopropil 2-D-tioalactopiranosídeo

Kb – kilobase

kDa – kilodalton

LB – meio de cultura Luria-Bertani

M – Molar

mL – mililitro

mM – milimolar

nL – nano Litro

pb – pares de bases

PBS – salina tamponada com fosfato

PMSF – fluoreto de fenilmetano sulfonil

PCR – reação em cadeia da polimerase

p/v – porcentagem peso-volume

q – quantitativo

RNA – ácido ribonucleico

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

SDS – duodecil sulfato de sódio

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato-EDTA

TE – Tris-EDTA

TIGR – The institute for genomic research

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

U – unidade

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Artrópodes	23
1.2 Insetos	24
1.3 Aedes aegypti	25
1.4 Alimentação sanguínea e infecção	28
2 OBJETIVOS	38
2.1 Geral	39
2.2 Específicos	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Animais, parasitas e vírus dengue tipo 2	41
3.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	41
3.1.2 <i>Gallus gallus domesticus</i>	42
3.1.3 <i>Plasmodium gallinaceum</i>	42
3.1.4 <i>Vírus Dengue</i>	43
3.1.4.1 Cultura de células e vírus	43
3.1.4.2 Infecção dos mosquitos por vírus dengue (DENV-2)	43
3.2 Análises in silico	44
3.2.1 Busca de candidatos	44
3.2.2 Atualizações das análises in silico nos banco de dados TIGR gene indices e VectorBase	46
3.3 DNA genômico	46
3.3.1 Extração de DNA genômico	46
3.3.2 Eletroforese de DNA	47
3.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	48
3.4 RNA total	49
3.4.1 Extração de RNA total	49
3.4.2 Quantificação de RNA total	49
3.4.3 Eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante	50
3.4.4 Tratamento de RNA total com DNase	50
3.4.5 Síntese da 1ª fita de cDNA	50
3.4.6 PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando moldes de cDNA	51
3.5 Purificação dos produtos da PCR e ligação em vetor de clonagem	52
3.6 RT- PCR quantitativo em tempo real	52
3.6.1 Construção de curva padrão utilizando DNA de plasmídeo	52

3.6.2	<i>Reação de PCR quantitativo em tempo real</i>	53
3.7	Bactérias utilizadas e protocolos de preparação	54
3.7.1	<i>Linhagens de Escherichia coli (E. coli) e genótipos</i>	54
3.7.2	<i>Preparação de bactérias eletrocompetentes</i>	54
3.7.3	<i>Transformação de bactérias eletrocompetentes</i>	55
3.7.4	<i>Preparação de células quimiocompetentes</i>	55
3.7.5	<i>Transformação de bactérias quimiocompetentes</i>	56
3.8	Extração e purificação de DNA de plasmídeo	56
3.8.1	<i>Clivagens de DNA de plasmídeo com endonucleases</i>	57
3.9	Sequenciamento de DNA	57
3.10	Imunização de camundongos da linhagem Balb/c	57
3.11	Obtenção de proteínas solúveis de intestino médio de Aedes aegypti e quantificação das amostras	58
3.11.1	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)</i>	59
3.11.2	<i>Análise por Western Blot</i>	59
3.12	Análise estatística	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	Busca de candidatos gênicos expressos durante a infecção por vírus dengue ou Plasmodium gallinaceum	62
4.1.1	<i>Análises in silico</i>	62
4.1.2	<i>Iniciadores usados nas análises de transcrição</i>	63
4.1.2.1	<i>Iniciadores para os genes candidatos</i>	63
4.1.2.2	<i>Iniciadores para controles endógenos</i>	63
4.1.2.3	<i>Atualizações das anotações</i>	64
4.1.3	<i>PCR de DNA genômico</i>	65
4.2	Análise do transcrito DV431431(Proteína Hipotética)	67
4.2.1	<i>Caracterização do perfil do transcrito DV431431 em Aedes aegypti infectado por Plasmodium gallinaceum</i>	70
4.2.2	<i>Caracterização do transcrito DV431431 em mosquito Aedes aegypti macho</i>	77
4.3	Análise do transcrito DV340891(Proteína Hipotética)	78
4.3.1	<i>Caracterização do perfil do transcrito DV340891 em Aedes aegypti infectado por Plasmodium gallinaceum</i>	81
4.4	Análise do transcrito DV411647 (Cetoreductase)	87
4.4.1	<i>Caracterização do perfil do transcrito DV411647 (Cetoreductase) em Aedes aegypti infectado por Plasmodium gallinaceum</i>	91
4.4.2	<i>Caracterização do transcrito DV411647 em Aedes aegypti infectado por dengue tipo 2</i>	96

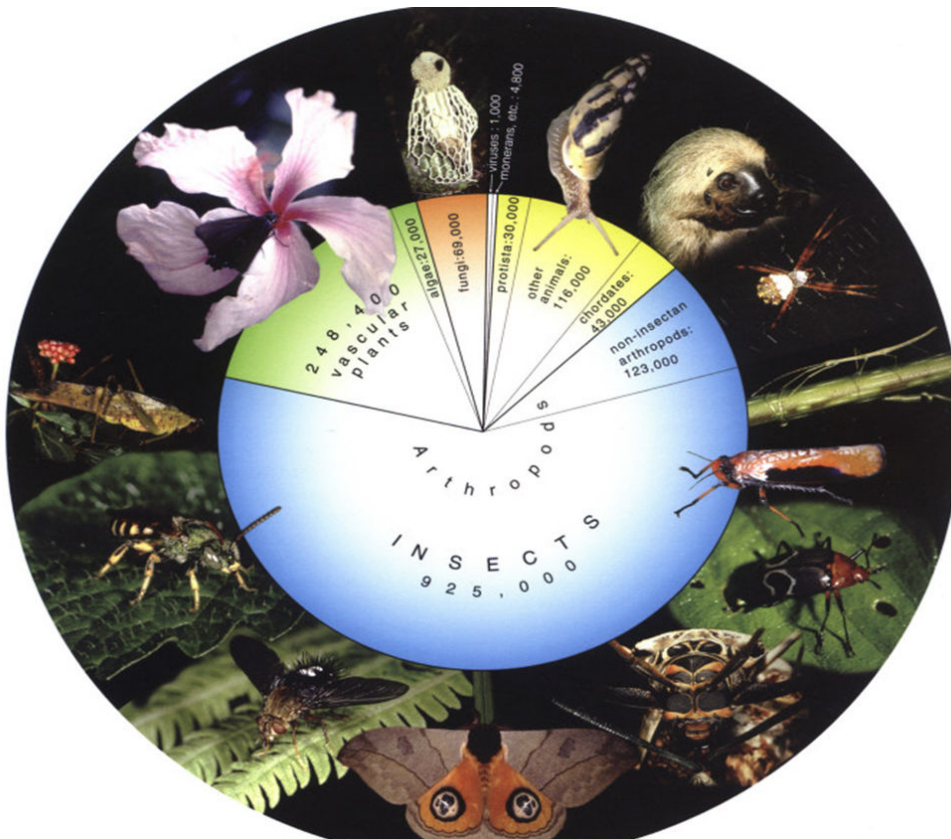
4.5 Expressão de proteína recombinante codificada pelo gene DV411647	100
5 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	107
ANEXOS	114
Anexo A – Mapa do vetor de clonagem comercial pCR [®] 2.1 e sequências nucleotídicas adjacentes ao sítio de clonagem.....	115
Anexo B – Mapa do vetor de clonagem comercial pjet1.2, indicando sítio múltiplo de clonagem e sequências adjacentes ao sítio de clonagem.....	116
Anexo C – Mapa do vetor de expressão comercial pGEX-2T, e sequências adjacentes ao sítio de clonagem.....	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrópodes

Os artrópodes constituem o maior grupo de organismos quanto ao número de espécies. Sua enorme diversidade permitiu uma ampla adaptação, possibilitando a sobrevivência em praticamente todos os ambientes (GRIMALDI, ENGEL, 2005). O filo é composto por mais de 85% das espécies de animais conhecidas. Nesse grupo, os representantes mais numerosos são os insetos (MARCONDES, 2001).

Figura 1 – Diversidade dos insetos em relação aos demais grupos.



FONTE - Grimaldi e Engel, 2005.

1.2 Insetos

Existem mais de 750.000 espécies de insetos descritas, formando um grupo de animais com grande sucesso evolutivo e que ocupam os mais diversos nichos ecológicos do planeta. O sucesso dos insetos pode ser atribuído a vários fatores, mas certamente a evolução do voo concedeu a esses animais uma vantagem distinta sobre os outros invertebrados terrestres. Esse grandioso grupo possui variadas características no que diz respeito tanto a aspectos morfológicos como fisiológicos (BARNES, RUPERT, 1996).

Os insetos distinguem-se dos outros artrópodes por apresentarem três pares de pernas e, usualmente, dois pares de asas ligadas a região média ou torácica do corpo. Além disso, possuem na cabeça um par de antenas e um par de olhos compostos (BARNES, RUPERT, 1996).

Os insetos normalmente são vistos como inimigos da humanidade por serem importantes transmissores de patógenos causadores de doenças aos animais, plantas e seres humanos, além de competirem de forma voraz por comida e outros recursos naturais. Raramente sua grande importância no equilíbrio biológico de outras espécies, e no fornecimento de um grande número de produtos úteis, como, mel, geléia real, seda natural entre outros, são lembrados.

Entretanto, a enorme diversidade de espécies de insetos representa uma fonte inesgotável de material de pesquisa, cujos resultados podem ser altamente benéficos à humanidade.

O estudo da família *Culicidae*, a qual pertence os insetos popularmente conhecidos como mosquitos, é de fundamental importância para a saúde pública, pois seus indivíduos estão envolvidos nas transmissões de diferentes patógenos causadores de diversas doenças.

1.3 *Aedes aegypti*

Originário da África foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos, e hoje ocorre em quase todos os estados brasileiros (FUNASA, 2001).

Devido a sua importância como vetor da febre amarela, foi intensamente combatido em nosso território (CONSOLI et al., 1994). Em 1929 o governo brasileiro em convênio com a Fundação Rockefeller adotou uma técnica focalizando a eliminação do vetor urbano. Em 1940, foi proposta a erradicação do *Aedes aegypti*, através da criação do Serviço Nacional de Febre Amarela (SNFA), que visava à eliminação do vetor assim que infestasse uma cidade (FRANCO, 1961). Em 1947, na tentativa de eliminar o *Aedes aegypti* da região nordeste, o Serviço Nacional de Febre Amarela adotou o método dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) para o combate as formas aquáticas e aladas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA, 2001). Estes programas levaram o governo a considerar o *Aedes aegypti* erradicado no Brasil no ano de 1955. Porém em 1967 houve reintrodução na cidade de Belém, provavelmente por ovos trazidos por tráfico de embarcações entre o Brasil e a Guiana e/ou Venezuela. Esse foco foi prontamente eliminado e em 1973, o vetor foi novamente considerado erradicado do país (SCAFF, GALVÃO, 1968). Em 1976 houve nova introdução do vetor no Brasil, na cidade de Salvador, capital da Bahia, e em 1999 dos 5.507 municípios brasileiros existentes, 3.535 estavam infestados (FUNASA, 2001), e desde então não se obteve sucesso nas tentativas de eliminação.

Atualmente está presente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. É considerado um mosquito cosmopolita com uma distribuição geográfica descontínua, sua disseminação sempre acontece acompanhando a migração do homem e está presente onde encontra condições favoráveis para a sua multiplicação (CONSOLI et al., 1994; MARCONDES, 2001).

Fatores como, processo desordenado de urbanização, infra-estrutura e saneamento básico deficientes fornecem condições adequadas para a infestação do mosquito (TAUIL, 2001).

O *Aedes aegypti* é facilmente identificado pelo escudo ornamentado com escamas branco-prateadas formando um desenho em forma de lira (Figura 2).

Figura 2 – Foto do mosquito adulto *Aedes aegypti* com destaque da ornamentação em forma de lira.

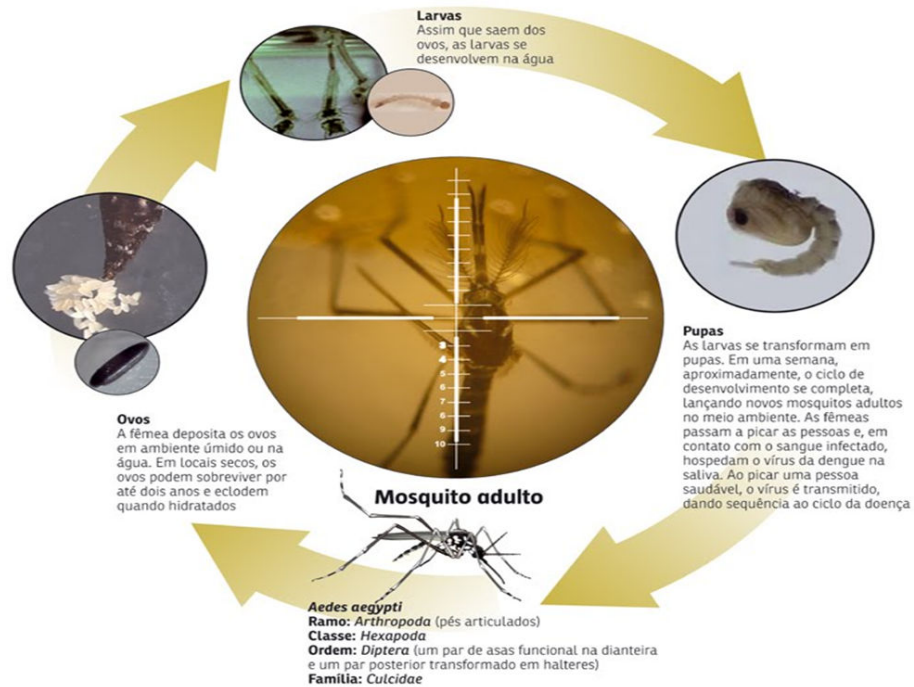


FONTE - © J-P. Heryv/ Orstoom

É um mosquito domiciliado, antropofílico, com atividade hematofágica diurna e está adaptado a viver em ambientes urbanos, principalmente em grandes cidades com aglomerações populacionais. É uma espécie que encontra em ambientes domésticos uma variedade de criadouros artificiais para colocar seus ovos, os quais têm alta capacidade de resistir à dissecação, onde os embriões se mantêm viáveis na ausência de água por até 450 dias (FORATTINI, 2002).

Aliado ao seu destacado papel epidemiológico, o mosquito *Aedes aegypti* também representa um sistema modelo proeminente para o estudo de expressão gênica, devido à base excepcional de conhecimento sobre sua fisiologia, bioquímica e desenvolvimento. Nas últimas décadas, este culicídeo vem sendo extensivamente estudado por muitos grupos de pesquisa, por ser facilmente colonizável em laboratório. Além de ser o principal vetor de dengue, febre amarela urbana e outras arboviroses que causam encefalites ao homem, podendo ainda ser o vetor de *P. gallinaceum*, no ciclo da malária aviária, em condições laboratoriais. São holometabólicos, isto é, realizam metamorfose completa durante o ciclo de vida, o qual é dividido em quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 3).

Figura 3 – Ciclo de vida holometabólico de um mosquito, exemplificado pela espécie *Aedes aegypti*.



(1)As fêmeas colocam os ovos em superfícies internas e recipientes úmidos, ao entrar em contato com a água, esses ovos eclodem e as larvas saem; (2) as larvas se desenvolvem na água, passando por quatro estádios (L1, L2, L3 e L4) e se transformam em pupas; (3) e a metamorfose é iniciada. (4) dessas pupas emergem os adultos.
FONTE - Luciane Evans (2010).

O ciclo de vida tem início com as fêmeas depositando cerca de 50 a 500 ovos na superfície de corpos d'água ou em lugares úmidos potencialmente inundáveis. Ao ter contato com a água, esses ovos eclodem dando origem as larvas de corpo vermiforme, as quais têm desenvolvimento aquático e passam por quatro estádios larvais até atingirem a fase de pupa. Durante esta fase do desenvolvimento, que dura aproximadamente de 7 a 9 dias, a maioria das espécies se alimentam de material orgânico particulado ou microorganismos presentes na água. Na fase de pupa, que dura de 1 a 2 dias, ocorre o processo de metamorfose, no qual o organismo não se alimenta até emergir na forma de adulto alado. É nesse momento do ciclo de vida que ocorre a transição do meio de vida aquático para o terrestre. Os adultos alados são delicados, possuem o corpo afilado, probóscide, antenas e apêndices compridos e escamas que recobrem quase todas as partes do corpo,

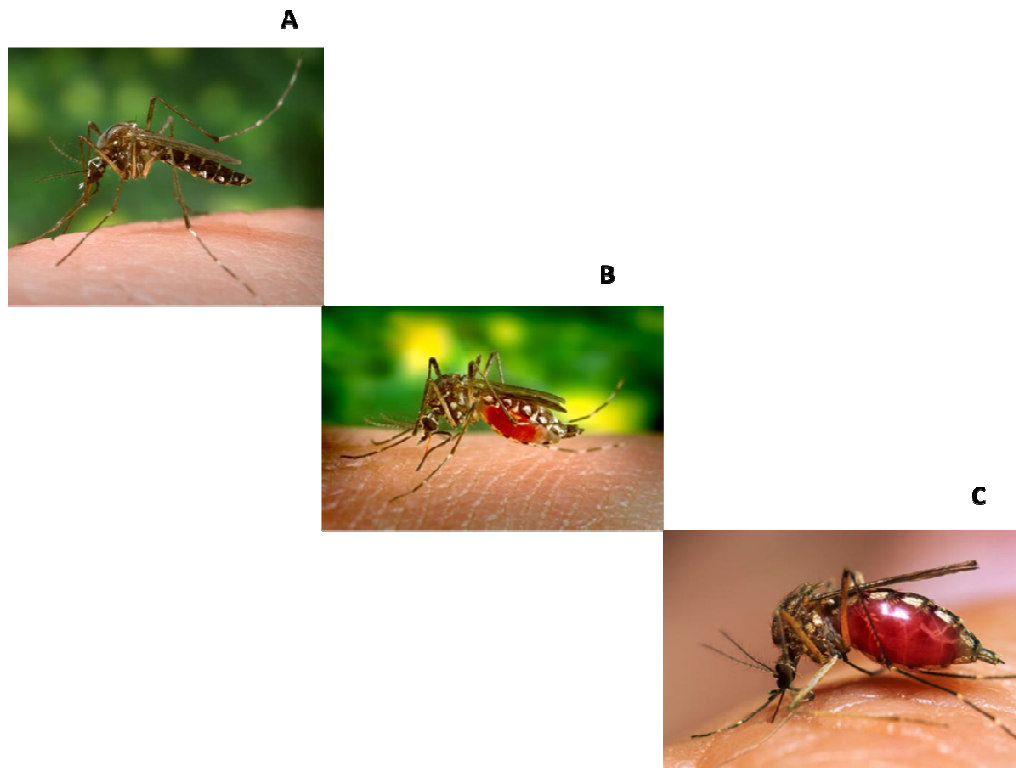
muitas vezes formando ornamentações relevantes à identificação e taxonomia. Na fase adulta, tanto os machos quanto as fêmeas alimentam-se de néctar, entretanto as fêmeas necessitam realizar repasto sanguíneo, o qual é necessário para a produção e maturação dos ovos. As fêmeas têm um tempo de vida de aproximadamente 50 dias, enquanto que os machos vivem de 20 a 30 dias. A cópula pode dar-se tanto antes ou após esta alimentação sanguínea. Os espermatozoides ficam então armazenados na espermateca e fertilizam os oócitos durante a oviposição, recomeçando o ciclo (CLEMENTS, 1992; CONSOLI et al., 1994; HARBARCH, 2007).

1.4 Alimentação sanguínea e infecção

O repasto sanguíneo é um processo fisiológico fundamental no ciclo de vida destas espécies. As fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para obtenção de nutrientes necessários ao desenvolvimento dos ovários e maturação dos ovos. Em contrapartida, a hematofagia confere a essas fêmeas a capacidade de transmissão de arboviroses e outros patógenos, obtidos de um vertebrado infectado (CONSOLI, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1998; BRIEGEL 2003).

Ao procurarem um repasto sanguíneo satisfatório, as fêmeas de *Aedes aegypti*, frequentemente fazem alimentações curtas em mais de um hospedeiro humano até o completo engurgitamento (Figura 4).

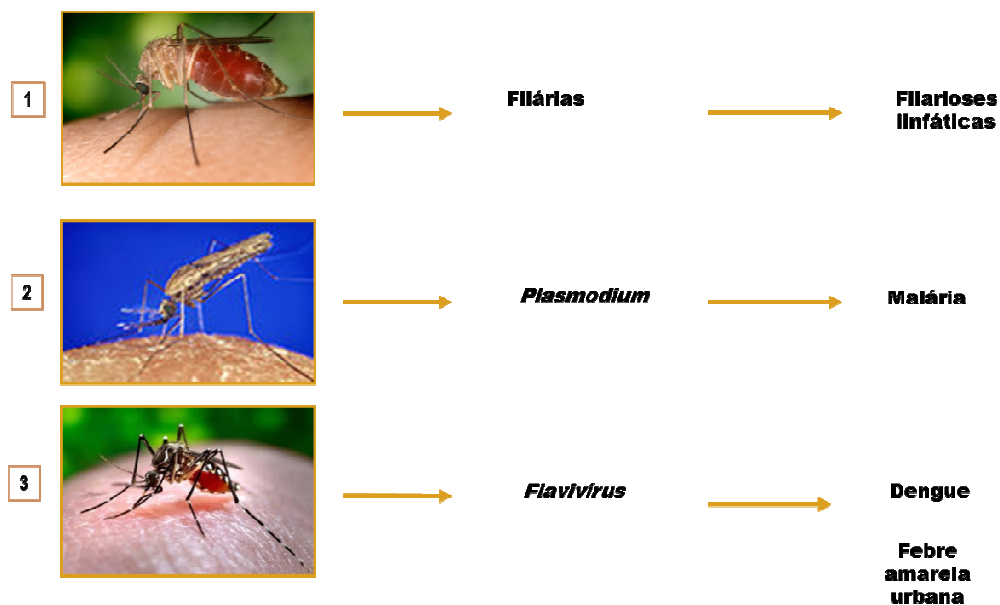
Figura 4 – Fêmea de *Aedes aegypti* durante e após o processo de hematofagia, com marcante alteração morfológica no abdômen.



(A) A fêmea inicia o repasto sanguíneo em vertebrado; (B) Fêmea durante o repasto sanguíneo; (C) Fêmea no final do repasto sanguíneo e completo ingurgitamento.
FONTE - James Gathany, Center for Disease Control Public Health Image Library, 2008.

Encontramos na família *Culicidae* alguns exemplos de mosquitos vetores conhecidos, como: *Culex quinquefasciatus*, o hospedeiro invertebrado e o transmissor de *Wuchereria bancrofti* nas regiões neotropicais, causando filaríose, diversos mosquitos do gênero *Anopheles*, transmissores de protozoários do gênero *Plasmodium spp.*, causadores de malária, e o *Aedes aegypti*, o principal vetor do vírus dengue e do vírus da febre amarela urbana (Figura 5).

Figura 5 – Exemplo de mosquitos vetores conhecidos.



(1) Mosquitos do gênero *Culex*: vetores de filárias causadoras de filaríose linfática; (2) mosquitos do gênero *Anopheles sp.*, vetores de patógenos do gênero *Plasmodium*, agentes causadores da malária; (3) mosquito *Aedes aegypti* que é o vetor de vírus do gênero *Flavivirus*, que são os agentes causadores da dengue e da febre amarela urbana, entre outras.

FONTE - 1. Fiocruz; 2. CDC; 3. National Geographic.

As doenças que acometem o homem em várias partes do mundo, causadas pelos patógenos transmitidos por mosquitos provocam um grande impacto socioeconômico e de saúde pública nas áreas em que ocorrem. De fato, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009) e Pan American Health Organization (PAHO, 2009) somente em 2008 ocorreram aproximadamente um

milhão de mortes causadas pela malária no mundo e 682 mil casos de dengue na América do Sul, sendo 585 mil destes no Brasil.

Cinco espécies do protozoário do gênero *Plasmodium* são capazes de causar a malária humana: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (MARSHALL, TAYLOR, 2009). Além dos humanos, outros vertebrados também podem desenvolver malária causada por outras espécies de *Plasmodium*. Isso torna possível o uso de modelos de pesquisa. Neste contexto, podemos destacar entre eles o sistema *Plasmodium gallinaceum* e *Aedes aegypti* em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) (FEITOSA et al., 2006). Este modelo é relativamente simples do ponto de vista da manutenção em laboratório e também produz um alto índice de parasitemia, fator que é importante nos estudos celular e bioquímico, além de possibilitar o estudo do ciclo *in vivo* do parasita (BRENNAN, KENT et al., 2000; JAMES, 2002; NAGAO, ARIE et al., 2008).

Os agentes etiológicos da malária (*Plasmodium*) necessitam do mosquito para completar seu desenvolvimento, já para os agentes etiológicos da dengue (DENV), os mosquitos tem papel importante na transmissão para um hospedeiro vertebrado, e não em seu desenvolvimento.

O ciclo de vida dos plasmódios compreende fases assexuadas e sexuadas. Durante a tomada de sangue de um hospedeiro infectado, a fêmea de *Anopheles* ingere parasitas na forma de gametócitos, que permanecem por algumas horas no seu trato digestivo, onde ocorre a fertilização. Após a fertilização os parasitas sofrem modificações estruturais resultando em uma forma móvel, o oocineto, que penetra pelo epitélio do trato digestivo alojando-se entre as células epiteliais e a lâmina basal. O oocineto desenvolve-se até a forma de oocisto, que entra em processo de esporogonia, liberando na hemocele dos insetos milhares de esporozoitos. Estas formas livres invadem as glândulas salivares, permanecendo nesse órgão até o mosquito tomar outra alimentação sanguínea, quando infectam um novo hospedeiro vertebrado. No caso do vírus dengue, o mosquito ingere as partículas virais presentes no sangue, e essas infectam as células do trato digestivo, se replicam e mais vírus são liberados na hemolinfa e passam a infectar o corpo gorduroso, trato digestivo, sistema nervoso, ovários e afinal as glândulas salivares, através das quais ocorrerá a transmissão para o hospedeiro vertebrado (SANDERS et al., 2003; FEITOSA et al., 2006; SOUZA-NETO, SIM et al., 2009).

Quanto ao vírus da dengue, este faz parte do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviridae*. O vírus é envelopado e as partículas virais são pequenas, com cerca de 50 nm de diâmetro e um genoma constituído de uma única fita de RNA com polaridade positiva e revestida de proteínas (SANCHEZ-VARGAS, TRAVANTY et al., 2004). São conhecidos quatro sorotipos deste vírus: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. No Brasil circulam com maior frequência, os sorotipos DENV-1, 2 e 3 (de FIGUEIREDO, A. et al., 2010; VILELA, FIGUEIREDO et al., 2010) , porém recentemente foram identificados pacientes infectados com o sorotipo DEN-4 em Roraima, Amazonas, Pará, Piauí , Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo. Isso preocupou os agentes da saúde, pois esse sorotipo havia sido supostamente erradicado no país há 20 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Não existe diferenciação nas partículas do vírus dengue dentro do mosquito. A infecção ocorre a partir de um repasto sanguíneo infectado. As células do trato digestivo são invadidas pelo vírus, onde ocorre a primeira amplificação das partículas virais via replicação. Entre 4 a 7 dias, dependendo das condições, as partículas virais caem na hemolinfa onde invadem praticamente todos os órgãos dos mosquitos, dentre eles os ovários, glândulas salivares, corpos gordurosos e células nervosas (referencia). Nesse período ocorre o segundo ciclo de replicação e novamente liberação das partículas virais na hemolinfa. Essas partículas seguem para ovários, glândulas salivares e células nervosas, não invadindo novamente os corpos gordurosos (aproximadamente 12-14 dias após o repasto sanguíneo infectado). Nesse período os mosquitos estão aptos a transmitir o vírus dengue. As partículas virais ficam armazenadas no cérebro, replicando e fazendo com que a fêmea consiga transmitir o vírus durante toda a sua vida (PUTNAM et al, 1995 e PLATT et al., 1997).

Além da infecção oral pelo vírus da dengue, mosquitos do gênero *Aedes*, podem se infectar por transmissão vertical e transmissão horizontal mantendo desta forma a infecção viral entre as populações de mosquitos. Na transmissão vertical uma fêmea infectada põe ovos infectados por vírus (transmissão transovariana) (Mourya et al., 2001). Na transmissão horizontal, um macho infectado transmite, via cópula, os vírus para as fêmeas (transmissão venérea (TU et al., 1998). É interessante notar que machos só podem ser infectados por transmissão vertical, portanto, a captura de machos infectados no campo é uma indicação segura da ocorrência de transmissão vertical nesta espécie.

No caso de um hospedeiro infectado, a alimentação sanguínea expõe os mosquitos a uma variedade de patógenos. E estes respondem aos ataques desses patógenos através de sucessivos eventos como, reconhecimento, fagocitose, encapsulação, além de produção de peptídeos antimicrobianos e antifúngicos pelas células do corpo gorduroso, que secretam essas moléculas para a hemolinfa, onde os patógenos se encontram (BIRON, AGNEW et al. 2005).

Os insetos possuem uma resposta imune inata regulada por três principais vias de sinalização: a via Toll, a imunodeficiência e a via JAK-STAT (TZOU, REICHHART et al., 2002; SIM, DIMOPOULOS, 2010) que estão envolvidas na defesa desses insetos contra fungos, bactérias gram-positivas, gram-negativas e vírus (XI, RAMIREZ et al., 2008; SOUZA-NETO, SIM et al., 2009; SIM, DIMOPOULOS 2010). Estudos realizados com mosquitos infectados mostraram que esses insetos também apresentam mecanismos efetores de resposta imunológica contra os plasmódios, dentre os quais podemos citar dois considerados os principais: síntese de peptídeos antimicrobianos e melanização (RICHMAN, DIMOPOULOS et al., 1997; DIMOPOULOS, SEELEY et al., 1998).

Gupta et al.(2009) estudando a participação da via STAT na resposta imunológica do mosquito *Anopheles gambiae* contra *Plasmodium*, mostrou que a ação dessa via limita a infecção induzindo a expressão de NOS (óxido nítrico sintetase), que através de uma cascata de eventos age reduzindo drasticamente o número de oocistos, indicando que NOS é uma importante molécula efetora limitando a sobrevivência de oocistos em resposta à ativação da via STAT.

Além dessas alterações imunológicas, há também mudanças fisiológicas no inseto infectado como, por exemplo, a redução da capacidade reprodutiva. Esse fenômeno foi analisado em termos de produção de ovos em mosquitos infectados por plasmódios quando comparados aos mosquitos sadios. Observou-se redução de ovos quando mosquitos da espécie *Aedes aegypti* foram infectados por *P. gallinaceum* (HACKER, 1971), e *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae* foram infectados por *P. yoelii nigeriensis* (HOGG, HURD 1997; AHMED, MAINGON et al., 2001).; ARAUJO, MACIEL et al., 2011).

Utilizando a técnica de microarranjo, foram analisados 4.987 cDNAs obtidos do transcriptoma de *Anopheles stephensi* em sucessivos pontos (6, 20, 40h e 4, 8, 14 e 20 dias) após a ingestão de sangue infectado com *Plasmodium berghei*. Os

autores mostraram que houve a detecção de vários produtos de genes relacionados com a resposta à alimentação infectada, mostrando a interação que ocorre na invasão do parasita pelo epitélio do trato digestivo do mosquito(XU, DONG et al., 2005).

Utilizando a mesma técnica, Chen e colaboradores (2004) analisaram 1200 ESTs de trato digestivo de *Aedes aegypti*, confirmando por PCR em tempo real (qRT-PCR) uma expressão diferencial de 28 genes (2,3%) entre as populações de mosquitos suscetíveis e refratárias a infecção por *P. gallinaceum*(CHEN, MURAMATSU et al., 2004).

Em estudos feitos em nosso grupo de pesquisa, Feitosa e colaboradores (2006), utilizando bibliotecas de cDNA de corpos gordurosos de fêmeas vitelogênicas de *Aedes aegypti*, descreveu 589 ESTs que foram agrupadas em 12 categorias: Metabolismo de carboidratos (0,57%), citoesqueleto (0,57%), metabolismo energético (7,98%) , matriz extracelular (0,28%), sistema imune ou imunidade (2,28%), metabolismo de lipídeos (0,57%), lisossomal (0,28%), regulação nuclear (1,14%), metabolismo de nucleotídeo (0,57), família de proteínas associadas a odor (1,99%), metabolismo oxidativo (0,85%) protease (0,85%) proteassomo (1,14%) exportação de proteínas (0,85%), modificação de proteína (1,14%), síntese protéica (40,46%), transdução de sinal (1,71%), maquinaria de transcrição (0,28%), transporte e estoque (1,71%), ovogênese (15,38%) e desconhecidos (19,37%). O padrão de expressão gênica observado pelo sequenciamento das ESTs revelou o comprometimento deste tecido com a síntese protéica e obviamente a vitelogênese. Porém, 19,37% dessas ESTs foram anotadas como proteínas hipotéticas, sem nenhuma similaridade com sequências conhecidas nos bancos de dados. Dessas sequências desconhecidas foram selecionadas 25 ESTs para serem analisados por macroarray diferencial utilizando *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum* ou vírus dengue (FEITOSA, 2006 (tese de doutorado)). Após as diferentes comparações dos macroarrays, foram escolhidos 4 transcritos que mostraram perfis quantitativos diferenciados durante as infecções (AAEL004342-PA; AAEL012279-RA, DT367277 e DT367323 – genes depositados no NCBI e VectorBase).

A escolha desses transcritos foi baseada na expressão diferencial entre fêmeas de *Aedes aegypti* mantidas em solução de sacarose 10% e 24 horas após o repasto sanguíneo sadio. Dois transcritos (AAEL004342-PA e AAEL012279-RA) tiveram aumento no número de cópias após a alimentação sanguínea (1,7 e 3,1 vezes, respectivamente) em relação aos mosquitos mantidos em solução de sacarose 10%. Já os transcritos DT367277 e DT367323, tiveram redução no número de cópias de seus mensageiros (2,2 e 3,1 vezes reprimido), na alimentação sanguínea quando comparado com as fêmeas mantidas em sacarose 10%.

Utilizado a metodologia de qRT-PCR, FEITOSA (2006) demonstrou que o transcrito AAEL004342-PA estava 1,9 vezes aumentado nos mosquitos 24 horas após a infecção por *Plasmodium gallinaceum* em relação às fêmeas sadias e na infecção pelo vírus dengue esse transcrito apresentou 2,5 vezes mais cópias de RNA mensageiro do que o grupo infectado pelos parasitas. Esse transcrito tem 34% de similaridade com proteínas ligadoras de odor de *Anopheles gambiae*, indicando um possível domínio de ligação a hormônios. O perfil espacial do transcrito AAEL004342-PA mostrou estar presente em corpos gordurosos, ovários e trato digestivo de fêmeas 24 horas após o repasto sanguíneo.

O segundo transcrito estudado por FEITOSA (2006), AAEL012279-RA tem alta similaridade ao fator 3 de início de tradução em eucariotos (eIF-3-alfa) e quando comparados com outros insetos apresentou 73% de similaridade com uma proteína hipotética de *Anopheles gambiae*. Esse transcrito se mostrou específico para corpos gordurosos e trato digestivo de *Aedes aegypti* e os níveis de expressão nos mosquitos infectados foram 6,9 vezes maior nas infecções por *Plasmodium gallinaceum* aumentando em 2,7 vezes nos mosquitos infectados pelo vírus dengue, quando comparado com as infecções pelo parasita.

Os transcritos DT367277 e DT367323, aqueles que tiveram a expressão reprimida após alimentação sanguínea, surpreendentemente tiveram aumento significativo de expressão durante as infecções. DT367277 teve sua expressão aumentada em 2,7 vezes na presença de *Plasmodium gallinaceum* aumentando em 32 vezes a expressão na presença do vírus dengue, quando comparado a expressão nos mosquitos infectados pelo parasita. Para o transcrito DT367323, os resultados foram de 7 vezes de aumento na presença do parasita e 3,3 vezes maior na presença de vírus dengue quando comparado com as infecções por *P.gallinaceum* (FEITOSA, 2006 tese de doutorado).

Após a ingestão e durante a digestão do sangue, ocorre a maturação dos ovócitos e formação dos 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 preparatório 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 influencia do hormônio juvenil III nos três primeiros dias após a emergência das fêmeas adultas. Se os corpos gordurosos e os ovários não forem expostos ao hormônio juvenil III eles não serão responsivos aos hormônios que promovem o período vitelogenico (RAIKHEL ET AL, 2002).

- período vitelogênico – inicia após a ingestão de sangue. Em resposta a alimentação sanguínea ocorre a secreção pelo cérebro, do hormônio ecdisteroidogênico ovariano (OEH) (LEA et al, 1967; BROWN et al., 1998). O OEH estimula os ovários a produzir e secretar ecdisona para a hemolinfa, onde chegando nos corpos gordurosos é convertida a 20-hidroxiecdisona (20HE). A 20HE estimula a síntese das principais proteínas precursoras de vitelo (vitelogenina, carboxipeptidase vitelogenica e catepsina B vitelogenica, entre outras) que serão secretadas para a hemolinfa, endocitadas pelos ovários e armazenadas nos ovócitos. Essa fase ocorre entre 0 a 48 horas após o repasto sanguíneo (RAIKHEL, DHADIALLA, 1992; DEITSH et al., 1995).

- término do período de vitelogênese – representa o fim da síntese de proteínas precursoras de vitelo pelos corpos gordurosos e a produção de córion, camada glicoprotéica que dará origem a cutícula protetora do ovo. Isso ocorre aproximadamente entre 48 a 72 horas após o repasto sanguíneo. Ao final da ovogênese a fêmea deposita seus ovos em superfícies úmidas, finalizando um ciclo gonadotrófico (RAIKEL, DHADIALLA, 1992).

Já foi descrito anteriormente pelo nosso grupo a redução da fertilidade em 26% quando *Aedes aegypti* está infectado por *Plasmodium gallinaceum* (ARAUJO, 2011). Os hormônios ecdisteróides possuem papel fundamental na reprodução de *Aedes aegypti*. Araujo e colaboradores mostraram que os níveis de ecdisona

apresentaram redução da concentração nas fêmeas infectadas por *Plasmodium gallinaceum* 24, 36 e 48 horas após o repasto sanguíneo (em torno de 20%). Devido a essa redução todos os eventos seguintes na cascata de ativação de genes produtores de vitelo tiveram a sua expressão reduzida, refletindo a queda de produção de ovos nas fêmeas infectadas. A lipoforina (proteína transportadora de lipídeos), a transferrina e a defensina A apresentaram perfis constitutivos em fêmeas pré-vitelogênicas e vitelogênicas. Entretanto, nos tempos de 168 e 192 horas após a infecção, momento este onde os oocistos de *P.gallinaceum* estão se rompendo e liberando os esporozoítas, ocorreu um aumento expressivo no acúmulo de mRNA de lipoforina e genes envolvidos na resposta imune dos mosquitos (transferrina e defensina A). Os experimentos de qRT-PCR para vitelogenina, carboxipeptidase e catepsina B vitelogênica mostraram redução em torno de 20% nos mRNAs quando comparado as fêmeas não infectadas, assim como os perfis das proteínas analisadas por imunoblotting foi detectado a redução das proteínas (ARAUJO, 2011).

O estudo da expressão de gênica diferencial durante a infecção nos mosquitos é uma ferramenta eficaz para a caracterização das modificações fisiológicas que ocorrem após o repasto sanguíneo infectado. Essas informações podem trazer a luz no entendimento da resposta e/ou consequência da infecção nesses vetores.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar a expressão gênica diferencial dos genes DV431431, DV340891 e DV411647 em *Aedes aegypti* durante a infecção por vírus dengue ou *Plasmodium gallinaceum*.

2.2 Específicos

1 – Analisar o perfil de transcrição dos genes candidatos ao longo do desenvolvimento do mosquito, após alimentação sanguínea com ou sem infecção por vírus dengue ou *P. gallinaceum*.

2 - Analisar o perfil de transcrição dos candidatos em tecidos específicos, como, ovários, corpo gorduroso e trato digestivo, em fêmeas após alimentação sanguínea com ou sem infecção por vírus dengue ou *P. gallinaceum*.

3 – Confirmar a anotação dos bancos de dados (VectorBase) quanto a expressão diferencial desses genes mediante a infecção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, parasitas e vírus dengue tipo 2

3.1.1 *Aedes aegypti*

A colônia de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (cepa Higgs White-eyes) foi mantida em insetário de segurança do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

Os mosquitos eram mantidos sob a temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de 80% e fotoperíodo de 12h luz - 12h escuro. Diariamente eram alimentados com sacarose 10% (p/v), e semanalmente, para a produção de ovos e manutenção do ciclo de vida, as fêmeas adultas copuladas realizavam o repasto sanguíneo em camundongos da linhagem BALB/c anestesiados com injeção de cloridrato de xilazina 10 ng/Kg e acepromazina 1 ng/Kg. Três dias após a alimentação sanguínea, um recipiente plástico revestido com papel filtro e contendo água era colocado dentro da gaiola para que as fêmeas realizassem a oviposição. A postura era retirada da gaiola após três dias e seca por 24 horas.

As larvas eclodiam de maneira sincronizada em água autoclavada armazenada em frasco fechado hermeticamente. Após a eclosão eram mantidas em recipientes plásticos com água destilada e alimentadas diariamente com ração para peixes moída TETRAMIN[®] (Tetra, Melle, Alemanha).

Através de um separador manual vertical formado por duas placas de vidro alinhadas paralelamente com um espaçamento ajustável, no qual gerava um gradiente de tamanho de estágios imaturos sob fluxo de água. As larvas eram primeiramente separadas das pupas, e posteriormente as pupas eram separadas por critério sexual e colocadas em copos plásticos de 500 mL (~100 pupas/copo) contendo água para emergência dos adultos alados. Os copos eram vedados com tecido filó e os mosquitos adultos emergidos mantidos nos copos plásticos (grupos experimentais), sendo a água descartada, ou eram transferidos para gaiola (colônia) em proporção sexual aproximada de 3 fêmeas: 1 macho.

Para isolamento dos tecidos, fêmeas adultas foram anestesiadas com CO₂ 24h e 48h após realizarem repasto sanguíneo em pintainhos e mantidas no gelo. Os órgãos foram então dissecados sob lupa estereoscópica, em solução de cloreto de sódio 0,15M com uso de pinças e agulhas entomológicas. O material foi utilizado imediatamente ou armazenado de acordo com os experimentos seguintes.

3.1.2. *Gallus gallus domesticus*

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

3.1.3. *Plasmodium gallinaceum*

O *P. gallinaceum* teve seu ciclo de vida mantido *in vivo* com a cepa 8A proveniente do isolado original de Brumpt (1937), que foi gentilmente fornecida pela Dra. Antoniana Krettli (Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, MG, Brasil). Esta amostra foi utilizada para a inoculação intravenosa de pintainhos de dois dias de idade. A partir do 7º dia após a inoculação, foram feitas lâminas de esfregaço sanguíneo coradas com Giemsa, e a parasitemia foi determinada através da contagem do número de células parasitadas/total de células contadas, por microscopia óptica usando aumento de 1000x. Pintainhos com 2-8% de parasitemia foram anestesiados com injeção de cloridrato de xilazina 10 ng/Kg e acepromazina 1 ng/Kg e utilizados no repasto sanguíneo de fêmeas de *Aedes aegypti*, por 30 minutos. O pintainho infectado utilizado na alimentação dos mosquitos foi sacrificado em câmara de CO₂. Os

mosquitos foram anestesiados com CO₂ e mantidos no gelo para a separação das fêmeas ingurgitadas, sendo mantidas em copos fechados com tecido filó e alimentadas com solução de sacarose 10% (p/v) sob a temperatura de 28 °C ± 1 °C e umidade relativa do ar de 80% ± 10%. O trato digestivo dissecado foi analisado por microscopia de contraste de fase entre o 5º e 6º dia após o repasto sanguíneo infectado para a determinação do número de oocistos. No 14º dia após a infecção dos mosquitos, pintainhos de dois dias de idade foram anestesiados e expostos aos mosquitos infectados para a manutenção do ciclo de *P. gallinaceum in vivo*.

3.1.4. *Vírus Dengue*

3.1.4.1 Cultura de células e vírus

Linhagem celular intestinal de *Aedes albopictus* (C6/36) foi mantida em meio de cultura Leibowitz – 15 (L15), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). O vírus dengue sorotipo 2 (DENV-2) foi obtido em colaboração com o Profº Dr. José Eduardo Levi, do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. As culturas de vírus dengue foram mantidas em células (C6/36) com repiques a cada 7 dias. A cada repique, 10µL do sobrenadante de cultura foram utilizados para a próxima infecção, 800 µL foram congelados a – 80° C e 100µL foram utilizados para a extração de RNA viral com o reagente Trizol® (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante.

3.1.4.2 Infecção dos mosquitos por vírus dengue (DENV-2)

As fêmeas de *Aedes aegypti* foram alimentadas artificialmente, utilizando o sistema (Hemotek™ 5W1 Membrane Feeding System) contendo 1mL de sangue de camundongo sadio ou 1 mL de sangue de camundongo adicionado de 100µL de suspensão da cultura viral de dengue sorotipo 2.

Após o repasto sanguíneo infectado, os mosquitos foram mantidos em copos plásticos em incubadoras B.O.D. a uma temperatura de 28 °C e umidade relativa do ar de 80% no Biotério de Artrópodes, nível de segurança 2, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

Para o controle do experimento, foram realizadas as PCRs Nested, como descrito em LANCIOTTI et al. (1992). O tamanho estimado do fragmento correspondente ao vírus dengue-2 é 119 pb. Foram feitas as PCRs da suspensão da cultura viral após 7 dias de infecção, dos mosquitos 48 h, 5 dias, 7 dias e 10 dias após alimentação sanguínea contendo sangue de camundongos e suspensão da cultura viral e mosquitos 48 h, 5 dias, 7 dias e 10 dias após alimentação sanguínea artificial contendo somente sangue de camundongos.

Iniciadores para a PCR NESTED:

D1 (5'TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3')

D2 (5'TTGCACCAACGATCAATGTCTTCAGGTTC-3')

TS2 (5'CGCCACAAGGGCCATGAACAG -3')

3.2 Análises in silico

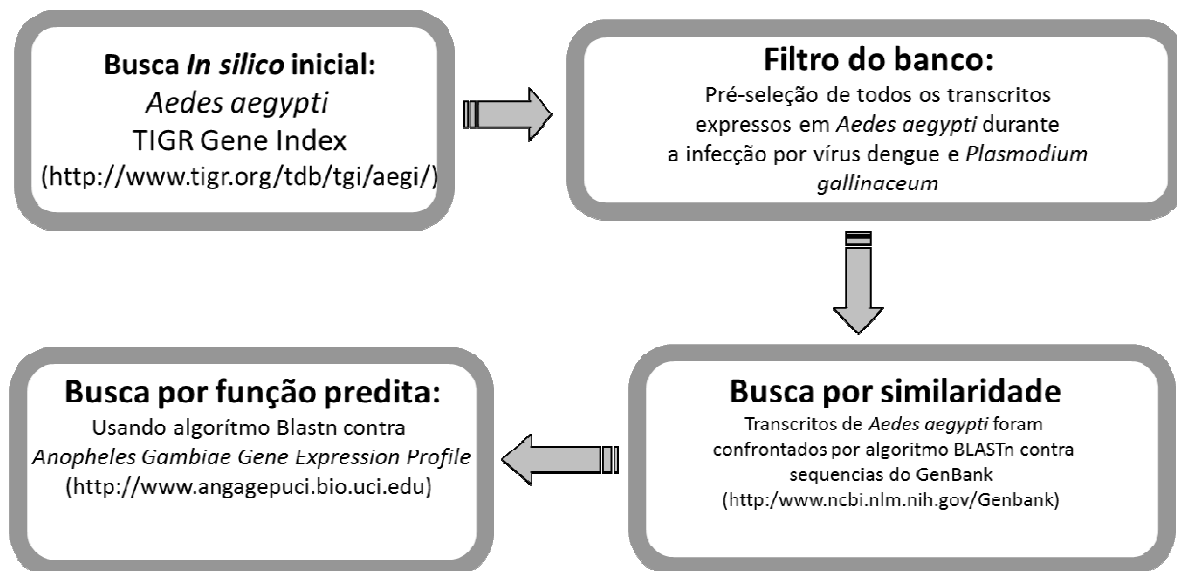
3.2.1 Busca de candidatos

Através do banco de dados da TIGR *gene indices* - <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tqipage.html> (QUACKENBUSH et al., 2000; LEE et al., 2005), e usando uma abordagem de comparação de bibliotecas de ESTs (TC-Tentative Consensus e Singleton) (em detalhes na figura 6), foram selecionados candidatos gênicos de *A. aegypti* com possível transcrição ativada após infecção por vírus dengue ou *P. gallinaceum*. As sequências de transcritos selecionadas foram submetidas à análise de similaridade contra o banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), através do algoritmo BLASTn. Os genes candidatos foram submetidos a teste e comparativo contra o banco de dados de *Anopheles gambiae* (*An. gambiae* Gene Expression Profile -

<http://www.angagepuci.bio.uci.edu>), na tentativa de análise de função fisiológica similar entre as duas espécies para os candidatos selecionados.

As sequências que apresentaram máxima semelhança entre as duas espécies tiveram sua função predita analisada. Dessa forma, para cada candidato foram geradas sequências de oligonucleotídeos específicos.

Figura 6 – Representação esquemática do algoritmo para busca manual de candidatos gênicos com expressão em banco de dados.



O processo foi elaborado para a seleção in silico de transcritos de *Aedes aegypti* com expressão diferencial durante a infecção por vírus dengue ou *Plasmodium gallinaceum*, e busca por similaridade funcional em *Anopheles gambiae* no banco de dados *Anopheles gambiae Gene Expression Profile*.

3.2.2 Atualizações das análises *in silico* nos banco de dados TIGR *gene indices* e VectorBase

Com o sequenciamento, anotação, depósito e disponibilização pública do genoma completo do *Aedes aegypti* (NENE et al., 2007) no banco de dados VectorBase (LAWSON et al., 2007, 2009) e a integração deste com o banco de *Aedes aegypti* da TIGR *gene indices*, foram feitas novas buscas para atualização das informações sobre a anotação dos genes candidatos. Para isso, as sequências dos ESTs candidatos de *Aedes aegypti* selecionadas do banco da TIGR *gene indices* (versão 4.0, 2004) foram utilizadas em buscas por similaridade com o uso do algoritmo BLASTn, contra os bancos VectorBase e TIGR *gene indices* atualizado (versão 5.0, 2008).

3.3 DNA genômico

3.3.1 Extração de DNA genômico

Foram realizadas extrações de DNA genômico dos mosquitos para padronização das reações da PCR com os oligonucleotídeos sintetizados. As extrações foram realizadas através do método de feno-clorofórmio descrito em Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), com algumas modificações.

Para cada experimento de extração de DNA genômico, foram utilizados 6 mosquitos machos e 6 fêmeas mantidas com sacarose 10%. Em tubo de microcentrifuga utilizando um pistilo de plástico, os mosquitos foram macerados em 300 µL de tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 M EDTA pH 8, 0,5% SDS) até total homogeneização. Em seguida foram adicionados 20µg/ml de RNase (Sigma, Aldrich, Steinhein, Alemanha), misturou-se suavemente e incubou-se a 37 °C por 45 minutos. Posteriormente, adicionou-se 20 mg/mL de proteinase K (Sigma), misturando suavemente, sendo incubado a 65 °C por 3 horas. A amostra foi rapidamente resfriada, adicionou-se 600 µL de fenol equilibrado (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e o microtubo

foi agitado com suave inversão em temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida a amostra foi centrifugada a 6800 x g a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1) ao sobrenadante, a mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e novamente foi centrifugado a 6800 x g a 4 °C por 5 minutos. Ao sobrenadante coletado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga foram adicionados 400 µL de clorofórmio, a mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. Mais uma vez o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga contendo 30 µL de acetato de sódio 3 M. À mistura foram adicionados 600 µL de etanol 100% (gelado), incubou-se a -20 °C por 16 horas. Após período de incubação, a mistura foi centrifugada a 6800 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo o DNA foi lavado com 1 mL de etanol 100% (gelado). O material foi centrifugado como feito em etapas anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% (gelado) por duas vezes. O sobrenadante da segunda centrifugação também foi descartado e o precipitado contendo o DNA foi seco a 50 °C. O DNA foi solubilizado em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8).

3.3.2 Eletroforese de DNA

Amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Life Technologies) contendo 1% de agarose (p/v) dissolvida em tampão TBE 1x (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0). A mistura de agarose e tampão foi aquecida em forno microondas até completa solubilização da agarose, sendo posteriormente adicionado 1 µL (0,02 mg) de brometo de etídeo. Foi utilizado o marcador de pares de bases 1 Kb plus (Life Technologies). Nas amostras de DNA foi misturado o equivalente a 1/5 do volume de tampão de amostra (glicerol 50 % e xilenocianol/ou orange G 0,25 %) e então aplicadas no gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por 1 hora. O DNA foi visualizado em transluminador ultravioleta e fotografado sob luz ultravioleta em câmera digital Olympus SP350 (Tóquio, Japão).

3.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA genômico utilizadas como molde foram amplificadas através da PCR. Todos os reagentes empregados foram adquiridos da empresa Life Technologies. As concentrações finais na reação foram (reação de 25 µl): MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, oligonucleotídeos iniciadores (oligos) 10 µM (Tabela 2), dNTPs 0,4 mM, DNA molde 10 ng, Taq Polimerase 0,2 U e água ultra pura. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores da reação de acordo com o especificado para cada experimento. As amplificações foram realizadas no termociclador Biometra® (Biometra, Göttingen, Alemanha), programado para as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 50 segundos, hibridação a 55 °C por 50 segundos e extensão a 72 °C por 50 segundos.

Todos os experimentos efetuados foram providos de controle negativo (C-), consistindo de uma reação de PCR com o mesmo par de iniciador da reação experimental, porém sem um DNA molde (substituído por água ultrapura q.s.p.). A ausência de bandas nos resultados da eletroforese do produto das reações C- validava o resultado das outras amostras amplificadas. Além disso, um controle positivo (C+) também foi realizado. Para isso, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores de Actina 1 (Tabela 3), e o programa configurado no termociclador foi : desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguidos de 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, hibridação a 55 °C por 20 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos, de acordo com (ARAUJO et al., 2010).

3.4 RNA total

3.4.1 Extração de RNA total

As amostras para os diversos experimentos foram homogeneizadas em 500µL de TRIZOL®(Life Technologies) e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Ao homogeneizado adicionou-se 100 µL de clorofórmio, seguido de agitação suave e centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos. 200 µL do sobrenadante foi transferido a um novo microtubo e a ele adicionou-se 250 µL de isopropanol, seguido de agitação suave. A mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e submetida à centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não haver perturbação do precipitado e a este se adicionou 500 µL de etanol 75%. A mistura foi submetida à centrifugação a 7500rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi seco a uma temperatura de 50-65 °C.

3.4.2 Quantificação de RNA total

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

3.4.3 Eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante

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

3.4.4 Tratamento de RNA total com DNase

A 2 µg de RNA total extraído foram adicionados 1 U/µL de enzima DNase I Amplification Grade (Life Technologies) e tampão próprio para a enzima de acordo com instruções do fabricante. A mistura foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e transferida para o gelo. Foi adicionado EDTA 25 mM, e incubou-se por 10 minutos a 65 °C para inativar a enzima DNase .

3.4.5 Síntese da 1ª fita de cDNA

A 1ª fita de cDNA foi produzida com o sistema SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante.

Ao RNA total tratado adicionou-se 1 µL de dNTPs 10 mM e 250 ng de oligo(dt)12-18® (Invitrogen) (utilizado como iniciador da reação) ou iniciador reverso

específico (concentração final de 0,5 μM) quando necessário. As reações foram incubadas por 5 minutos a 65 °C e posteriormente resfriadas em gelo. Foram, então, adicionados 4 μL de tampão de síntese de primeira fita 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl_2 15 mM) e 2 μL de DTT 0,1M, a reação foi incubada 2 minutos a 42 °C. Finalizada a incubação, adicionou-se 200 U/ μL da enzima SuperScript™II RT e as reações foram aquecidas por 50 minutos a 42 °C. A enzima foi inativada a 70 °C por 15 minutos.

O produto sintetizado foi mantido a -20 °C até a utilização ou foi diretamente usado nas reações de PCR.

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

Os fragmentos foram amplificados em reações com volume final de 25 μL contendo 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, Mg^{++} 2,0 mM, dNTPs 0,2 mM, 04 μM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2 μL de cDNA como molde e água ultrapura q.s.p.

O equipamento utilizado para a realização dos ciclos de amplificação foi o termociclador Biometra® (Biometra, Göttingen, Alemanha), programado para as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 50 segundos, hibridação a 55 °C por 50 segundos e extensão a 72 °C por 50 segundos. Para os controles endógenos foram realizadas amplificações do gene 18S (Tabela 2), o programa utilizado foi: desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguidos de 20 ciclos de 94 °C por 1 minuto, hibridação a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Também foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores de Actina 1 (Tabela 2), as condições de amplificação foram: desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguidos de 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, hibridação a 55 °C por 20 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos.

Para todos os experimentos de RT-PCR foram realizados controle negativo (C-), consistindo de uma reação sem molde de cDNA.

3.5 Purificação dos produtos da PCR e ligação em vetor de clonagem

Para confirmarmos as sequências amplificadas prosseguimos com a clonagem para posterior sequenciamento. Após a visualização em gel de agarose, os produtos foram purificados utilizando QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA), conforme instruções do fabricante, para remover nucleotídeos livres que possam dificultar as reações seguintes.

As proporções molares de inserto 1:1, 3:1 foram utilizadas para cada etapa da clonagem. Os produtos de PCR já purificados foram ligados, dependendo do experimento, em um dos seguintes vetores comerciais: pCR[®] 2.1 (ANEXO A) com TA Cloning[®] kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ou em vetor pjet (ANEXO B) com CloneJET[™] PCR Cloning Kit (Fermentas, Burlington, Ontario, Canadá) seguindo instruções do fabricante. A enzima T4 Ligase (Invitrogen) foi adicionada (1U) nas reações de ligação com o TA Cloning[®] kit.

3.6 RT- PCR quantitativo em tempo real

3.6.1 Construção de curva padrão utilizando DNA de plasmídeo

Os produtos amplificados e clonados em pJET1.2/blunt Cloning Vector (Fermentas, Burlington, ON,CA) foram utilizados para construção das curvas padrão de número de cópias para PCR quantitativo em tempo real. Para obtenção das curvas padrão dos ensaios, 100 ng de cada DNA de plasmídeo foram digeridos 10U da enzima de restrição *Xba*I ou *Xho*I para a linearização dos mesmos. Após linearização, os DNAs de plasmídeos foram purificados e em seguida quantificados em Nanodrop 2000 (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA). A concentração de cada amostra foi utilizada no cálculo do número de cópias de acordo com a seguinte fórmula:

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

Para cada gene estudado (DV340891, DV411647, DV431431) foi gerado uma curva padrão através de 5 diluições do DNA de plasmídeo contendo o inserto específico com concentrações entre 1 ng/ μ L até 0,1 fg/ μ L e cada amostra foi medida em triplicata.

3.6.2 Reação de PCR quantitativo em tempo real

O RNA total extraído de *Aedes aegypti* em vários pontos amostrais foi usado para análise quantitativa de expressão. Para isso, amostras de RNA de 3 replicatas biológicas para cada ponto amostral foram reversamente transcritas para síntese da primeira fita de cDNA usando oligo(dt)12-18® (Invitrogen).

As reações foram realizadas em um volume final de 20 μ L, contendo 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo (Tabela 2), 10 μ L de SYBR® Green I (Quantimix Easy Syg Kit Biotools, Madri, Espanha) e 1 μ L de cDNA. Cada reação foi feita em triplicata, incluindo a curva padrão e controle negativo (reação sem o molde de DNA). A reação foi iniciada pela ativação da enzima a 95 °C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação consistindo de 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 15 segundos de hibridação a 55 °C e 20 segundos de extensão a 68 °C. Foi adicionada uma etapa ao final de cada reação consistindo de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C e 15 segundos a 95 °C para construção da curva de desnaturação (melting curve) para certificação da especificidade dos fragmentos amplificados, e somente houve validação das análises quando as amostras apresentaram pico único no gráfico. Além disso, nenhum sinal fluorescente foi detectado nos controles negativos (reação sem molde de DNA) dos ensaios utilizados para a análise quantitativa de acúmulo de transcritos.

Também foram realizadas amplificações para os transcritos de actina e 18S para confirmação da integridade das amostras de cDNA.

As reações foram realizadas no equipamento Mastercycler® Eppendorf Realplex (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), em placa de 96 poços ABgene Thermo Scientific (Surrey, Inglaterra). As análises dos dados foram feitas no programa Realplex. Foram obtidos, as médias e os desvios padrões para cada transcrito analisado.

3.7 Bactérias utilizadas e protocolos de preparação

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

As linhagens de *E. coli* utilizadas e seus respectivos genótipos foram: DH10B: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG tonA.

BL21(DE3)pLysS:F⁻ omp T hsdSB (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)pLysS (Cam^R).

3.7.2 Preparação de bactérias eletrocompetentes

Um inóculo do estoque de bactéria *E. coli* cepa DH10B foi plaqueado em meio de cultura LB/ágar (triptona 10 g, extrato de levedura 5 g e NaCl 5 g e 1,5% de ágar bacteriológico para 1L) e incubado a 37 °C por 16 horas. Uma colônia individualizada de bactérias foi semeada em 5 mL de meio LB líquido (triptona 10 g, extrato de levedura 5 g e NaCl 5 g para 1 L) e incubada sob agitação a 37 °C por 16 horas. A cultura saturada de bactérias foi diluída em 500 ml de meio LB líquido e mantida sob agitação a 37 °C até atingir a D.O. _{600nm} de 0,6. A cultura de bactérias foi mantida no gelo por 30 minutos e em seguida centrifugada a 7000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 500 mL de água gelada, sendo em seguida centrifugado com descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuscitado em 250 mL de água gelada e a mistura

novamente centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 10 mL de água gelada contendo glicerol 10%. Foi realizada a última centrifugação e o sedimento, após o descarte do sobrenadante, foi ressuscitado em 1,5 mL de água gelada contendo glicerol 10%. A mistura contendo bactérias competentes foi alíquotada (40 µL/tubo), congelada em banho de gelo seco e armazenada à -80 °C.

3.7.3 Transformação de bactérias eletrocompetentes

Um volume de 5 µL de cada reação de ligação foi adicionado a uma alíquota de bactéria eletrocompetente, a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e eletroporada a 2500 V utilizando o eletroporador Cellject Hybaid (Bioscience Technology, Rockaway, NJ, EUA). As bactérias eletroporadas foram transferidas para 1 mL de LB líquido e incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação. Após a incubação, as bactérias foram semeadas em meio LB/ágar contendo IPTG 1 mM, ampicilina 100 µg/mL e X-Gal 30 µg/mL, ou em placas somente com ampicilina ou outro antibiótico apropriado, dependendo das condições indicadas para o DNA de plasmídeo transformado.

3.7.4 Preparação de células quimiocompetentes

Um pré-inóculo foi semeado em 3 mL de meio LB líquido, e a mistura foi incubada sob agitação a 37 °C por 16 horas. Da cultura saturada, 100 µL foram utilizados como inóculo para semear-se 100 mL de meio LB. A cultura foi incubada sob agitação a 37 °C até atingir uma D.O._{600nm} de 0,6. A cultura foi centrifugada por 5 minutos a 7000 x g a 4 °C. Após a centrifugação, o meio de cultura líquido foi descartado e as bactérias sedimentadas foram ressuscitadas em 20 mL de solução de acetato de sódio 10 mM, pH 7,5, MgCl₂ 50 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 100 mM e glicerol 15% (v/v). A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e o passo de centrifugação foi repetido como descrito. A solução foi descartada e as bactérias sedimentadas foram ressuscitadas em 2,0 mL de solução de MOPS 10 mM, pH 7,0,

KCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM e glicerol 15% (v/v). A mistura contendo bactérias competentes foi alíquotada (25 µl/tubo), congelada em banho de gelo seco e armazenada à -80 °C.

3.7.5 Transformação de bactérias quimiocompetentes

Um volume de 5 µL do produto da reação de ligação foi adicionado à alíquota de bactéria quimiocompetente cepa BL21 e mantida no gelo por 30 minutos. Em seguida foi transferida para 42 °C por 45 segundos para sofrer um choque térmico. Imediatamente após o choque térmico as bactérias transformadas foram transferidas para o gelo, inoculadas em 250 µL de LB líquido e incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação e 100 a 200 µL da mistura foram plaqueados em meio LB/ágar contendo antibiótico(s) de acordo com a resistência conferida pelo plasmídeo transformado, em concentração adequada (ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 34 µg/mL).

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

3.8 Extração e purificação de DNA de plasmídeo

Após transformação do DNA de plasmídeo e plaqueamento das bactérias, as colônias contendo o inserto de interesse foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo antibiótico em concentração adequada e a mistura foi incubada a 37 °C sob agitação por 16 horas. Após este período a suspensão de bactérias foi centrifugada a 12.100 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as bactérias foi utilizado para a extração de DNA de plasmídeos utilizando QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

3.8.1 Clivagens de DNA de plasmídeo com endonucleases

Amostras de DNA contendo cerca de 1 µg do vetor pJET1. 2/blunt Cloning Vector foram digeridas com 10 U das enzimas *Bgl*II, *Not*I ou *Xho*I por 1 hora a 37 °C. Todas as enzimas foram fornecidas pela empresa New England Biolabs (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

3.9 Sequenciamento de DNA

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

3.10 Imunização de camundongos da linhagem Balb/c

Para imunização dos camundongos e tentativa de produção de anti-soro policlonal, 300 µL da proteína recombinante eluída foi misturado a 300 µL de adjuvante

completo de Freund (Freund's Adjuvant, Complete – Sigma-Aldrich), e a mistura foi emulsificada.

Dois camundongos com 35 dias de vida foram inoculados com 03 injeções subcutâneas com intervalos de 15 dias entre a 1ª e 2ª inoculações e 7 dias entre a 2ª e a 3ª inoculações. Na 1ª inoculação, os camundongos foram injetados com 150 µL da mistura emulsificada (aproximadamente 10 µg por camundongo). O mesmo protocolo foi realizado para as inoculações subsequentes, porém o adjuvante incompleto de Freund (Freund's Adjuvant, Incomplete – Sigma-Aldrich) foi utilizado.

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

3.11 Obtenção de proteínas solúveis de intestino médio de *Aedes aegypti* e quantificação das amostras

Fêmeas 48, 72 e 96 horas após o repasto sanguíneo infectado e não infectado por *P. gallinaceum* ou vírus dengue 2 foram utilizadas para obtenção de proteínas solúveis de intestino médio (30 para cada condição amostral e em cada intervalo) foram dissecados e homogeneizados com pistilo apropriado para microtubo em tampão PBS 1X (NaHPO₄ 7 mM, NaH₂ PO₄ 2 mM, pH 7,0, contendo NaCl 140 mM) e 1 µL/mL de coquetel de inibidores de proteases (50 µL/mL de leupeptina, 5 µL/mL de pepstatina, 5 µL/mL quimiostatina, 5 µL/mL antipaína, 5 µL/mL PMSF e 5 µM E-64). O material foi centrifugado a 12.100 x g por 10 minutos e o sobrenadante correspondente à fração solúvel foi coletado. As amostras mantidas em gelo foram quantificadas e em seguida armazenadas a -20 °C.

As amostras de proteínas solúveis de tecidos foram quantificadas através do método descrito por Bradford (1976) e com o uso do reagente Bio-Rad Protein Assay

Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para elaboração da curva padrão, diluições seriadas de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram utilizadas e a leitura de absorvância (comprimento de onda de 595 nm) foi realizada em aparelho Nanodrop 2000 (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA). Os valores gerados pela leitura foram utilizados para obtenção da equação da reta.

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

O fracionamento das proteínas foi realizado em SDS-PAGE descontínuo (LAEMMLI, 1970), e os géis de separação (com concentração de acrilamida de 15%) e empacotamento foram preparados de acordo com o protocolo descrito em (SAMBROOK, FRITSCH E MANIATS, 1989). Os géis foram polimerizados em sistema de mini-gel da Bio-Rad (mini protean III), usando espaçadores de 1,0 mm ou 1,5 mm de espessura, dependendo do experimento.

As amostras, previamente misturadas em tampão de amostra composto de Tris 50 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), DTT 100 mM, glicerol 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,01% (p/v) foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos e aplicadas no gel. O marcador de massa molecular utilizado nas eletroforeses foi o Page Ruler™ Prestained Protein ladder da Fermentas (Burlington, Ontario, Canadá). A eletroforese foi realizada com voltagem constante igual a 20 V/cm e em temperatura ambiente. Após eletroforese, o gel foi retirado das placas de vidro e os polipeptídeos fracionados foram corados com solução Coomassie blue R 0,2% dissolvido em metanol:ácido acético:água (50:10:40, v/v/v) por um período de 1 hora. Em seguida o gel foi repetidamente lavado com solução de descoloração composta de etanol:ácido acético:água (25:8:65, v/v/v) e o mesmo foi submetido à última lavagem com água destilada.

3.11.2 Análise por Western Blot

Extratos de proteína total de intestinos médio dissecados 48, 72 e 96 horas após repasto sanguíneo infectado e não infectado por *P. gallinaceum* ou vírus dengue tipo 2

(10 µg para cada amostra) foram aplicados em duplicata em gel SDS-PAGE 15% sob condições desnaturantes. Após eletroforese, um gel foi corado com soluções de coloração e o outro gel foi utilizado para eletro-transferência em membrana (Bio-Rad), através do sistema semi-seco *Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) em presença de tampão Tris 48 mM, glicina 39 mM, 0,037% SDS e metanol 20%, como descrito por (HARLOW, LANE, 1988).

Após a transferência, o bloqueio das membranas, incubações com antissoros e procedimentos de detecção foram realizados seguindo-se instruções descritas no manual do kit *ECL Plus Western Blotting Reagent* (GE Healthcare, Little Chalfont, Duckinghamshire, England). A membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado 5% por 16 horas e incubada com antissoro primário Anti-AaegKeto (1:250) ou Anti-GST (1:1000). O anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo (Sigma) conjugado com peroxidase foi usado em diluição de 1:2000. A detecção das bandas imunorreativas foi realizada com kit detecção quimioluminescente usando o reagente *ECL Plus Western Blotting Reagent* (GE Healthcare).

3.12 Análise estatística

Para análise dos experimentos de real time foram utilizados o teste t (Student) e ANOVA. A comparação entre os dados experimentais foi considerada significativa quando a probabilidade de igualdade foi menor que 5% ($p \leq 0,05$) no intervalo de confiança (IC) de 95%. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego California USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Busca de candidatos gênicos expressos durante a infecção por vírus dengue ou *Plasmodium gallinaceum*

4.1.1 Análises *in silico*

Com o intuito de identificar candidatos gênicos de *Aedes aegypti* expressos durante a infecção por vírus dengue ou *P. gallinaceum*, foi elaborada uma estratégia comparativa em bancos de dados.

O trabalho foi iniciado com a execução de uma busca *in silico* no banco de dados da TIGR *gene indices* - <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html> (LEE et al., 2005; QUACKENBUSH et al., 2000), através do algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) para identificar possíveis etiquetas de sequências expressas (ESTs) de *Aedes aegypti* diferencialmente expressas durante a infecção por vírus dengue ou por *P. gallinaceum*, onde foram selecionados 366 transcritos. Os transcritos selecionados foram então confrontados, através do algoritmo BLASTn, com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). O critério adotado para a seleção de transcritos possivelmente associados à infecção foi sua ausência no GenBank, uma vez que na época esse banco possuía apenas sequências ESTs de *Aedes aegypti* não infectados. Assim, chegou-se a um total de 156 candidatos prováveis para expressão diferencial durante a infecção. As 156 sequências selecionadas foram novamente submetidas ao teste de BLASTn contra o banco de dados de *Anopheles gambiae* (*An. gambiae* Gene Expression Profile – <http://www.angagepuci.bio.uci.edu>), com a finalidade de uma nova análise de possível função fisiológica para estas proteínas. É importante ressaltar que quando este projeto foi iniciado o único banco de expressão existente para mosquitos Culicídeos era o angaGEDUCI de *Anopheles gambiae*.

Os resultados da análise dos 156 transcritos mostrou que alguns transcritos estavam anotados como proteínas envolvidas com sistema imune, como por exemplo, defensina, cecropina, gambicina. Como o nosso interesse era caracterização de proteínas novas com possível função na infecção, nos detivemos nas anotações de proteínas hipotéticas, sem indicação da possível função.

Foram encontrados nessa análise, muitos transcritos sem nenhuma similaridade. Após uma análise manual baseada no tamanho das sequências depositadas (acima de 300 pares de bases), anotação e similaridade, foram selecionados 32 transcritos candidatos com função desconhecida (proteínas hipotéticas, mas com indicação de expressão diferencial durante a infecção) que possivelmente seriam mais informativos.

4.1.2 Iniciadores usados nas análises de transcrição

4.1.2.1 Iniciadores para os genes candidatos

As sequências de ESTs de *Aedes aegypti* depositadas no banco TIGR *gene indices* (versão 4.0 – 2004) que apresentaram maior identidade (best- matched) com os transcritos de *Aedes aegypti* selecionados no banco de dados VectorBase foram utilizadas como molde para desenho de oligonucleotídeos iniciadores forward (senso) e reverse (reverso), sendo um par de oligonucleotídeos iniciadores para cada cDNA candidato (Tabela 1). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados usando o programa Primer3 (ROZEN, SKALETSKY, 2000).

4.1.2.2 Iniciadores para controles endógenos

Dois genes constitutivos de *Aedes aegypti* (housekeeping genes) – Actina 1 (Aaeact – 1) e RNA ribossômico18S (RNAr 18S), já validados anteriormente como genes de referência (SANDERS et al., 2003; ARAUJO, 2010;) foram utilizados como controles endógenos nos experimentos de RT-PCR. Estes controles forneceram parâmetros importantes para certificação de que variações associadas com integridade do RNA, quantidade variável de tecido inicial e tratamento experimental fossem removidas e não afetassem os resultados finais de quantificação de expressão. Para isso, foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2) com as mesmas sequências previamente utilizadas nos trabalhos de Sanders et al. (2003) para RNAr 18S, e Araujo et al. (2010) para Aaeact – 1.

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

Código no banco TIGR versão 4.0 2004 (sigla usada)	Código no banco GenBank	Sequência dos iniciadores orientação 5'-3'	Tamanho esperado dos fragmentos pb
TC61246(888)	DV431431	5' CAGCCTGTGAAGATCAACGA 3' F 5' TTA CTCTCGCCAACGGTTTC 3' R	200
TC51426(697)	DV411647	5' CACAACGCAATGGATTTCAC 3' F 5' CATT CGGCTCCACATTTCTT 3' R	160
TC52023(494)	DV340891	5' GAGGAAGAGCGTTCAACTCG 3' F 5' TTGCTCGTCTGAGTCCAATG 3' R	215

F: Iniciador forward

R: Iniciador reverse

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

Gene Constitutivo	Código no banco GenBank	Sequência dos iniciadores orientação 5'-3'	Tamanho esperado dos fragmentos pb
Actina - 1 (Aaeact - 1)	U20287	5' GAGCGTGGCTACTCCTTCAC 3' F 5' AGTTTCGTGGATACCGCAAG 3' R	250
RNAr 18S	AY988440	5' CCTTCAACAAGGATCAAGTGG3' F 5' GGAGTAGCACCCGTGTTGG 3' R	132

F: Iniciador forward

R: Iniciador reverse

4.1.2.3 Atualizações das anotações

Com o sequenciamento completo do genoma de *Aedes aegypti* (NENE et al., 2007) no banco de dados VectorBase (LAWSON et al., 2007, 2009) e a integração deste com o banco de *Aedes aegypti* da TIGR *gene indices* e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), disponibilizou-se publicamente uma quantidade enorme de novas anotações *in silico* de genes, ESTs, contigs e supercontigs de sequências deste mosquito. Desta forma foi possível utilizar tais ferramentas para a atualização

das análises feitas anteriormente para os candidatos selecionados. As anotações foram atualizadas com as informações disponíveis, e os códigos dos genes estão descritos na tabela 3.

Foram identificados 3 transcritos com alta identidade (99-100%) às ESTs, e os códigos dos respectivos genes, assim como anotações preditas foram obtidos. Os códigos dos genes no banco GenBank foram adotados para substituírem os códigos da TIGR *gene indices*. Desta forma, a anotação foi atualizada e os genes foram denominados neste trabalho em conformidade com os códigos fornecidos pelo GenBank (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado do BLASTN dos ESTs de *Aedes aegypti* do banco da TIGR gene index contra sequências de transcritos depositadas no banco Vectorbase e GenBank

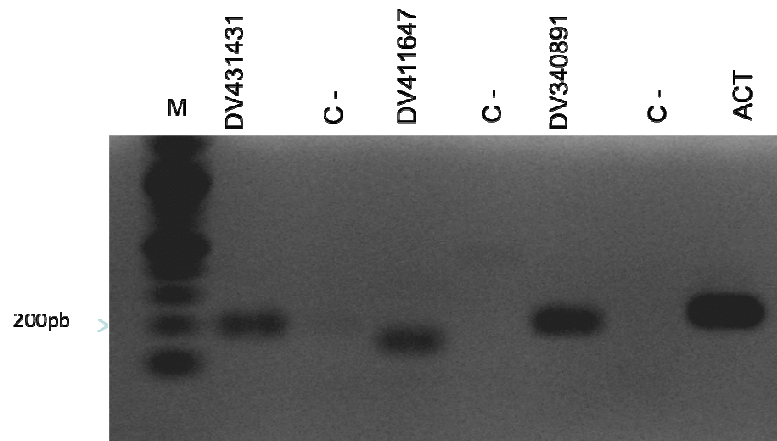
TIGR <i>Aedes aegypti</i> EST	Biblioteca	HIT Sequence (NCBI)	VectorBase Length	Best Mach (Blastn) Identidade	e - value	Score	Descrição
TC61246(888)	Dengue	DV431431	693	100%	0.0	689	Proteína Hipotética
TC51426(697)	Dengue	DV411647	878	100%	0.0	874	Cetoreductase
TC52023(494)	<i>P. gallinaceum</i>	DV340891	880	99.09%	0.0	856	proteína hipotética

4.1.3 PCR de DNA genômico

Dos 32 transcritos localizados, 8 foram selecionados para a tentativas de caracterização.

Oligonucleotídeos foram sintetizados e PCRs de DNA genômico foram feitas (resultados não mostrados). Estes oligonucleotídeos tiveram sua especificidade testada através da técnica de PCR e material genômico de mosquito *Aedes aegypti* como molde, 03 candidatos apresentaram amplificação específica de tamanho esperado: DV431431, DV411647 e DV340891. (Figura 7). O transcrito de actina foi utilizado como controle positivo da amplificação gênica.

Figura 7 – Amplificação genômica de fragmentos dos 3 genes candidatos de *Aedes aegypti*.



Iniciadores foram desenhados usando as sequências de ESTs obtidas no banco da TIGR *gene indices*. A amplificação foi padronizada inicialmente usando DNA genômico de *Aedes aegypti* como molde. Os fragmentos amplificados dos genes DV431431, DV411647 e DV340891 foram do tamanho esperado. C-: controle negativo (reações sem DNA genômico de *Aedes aegypti*). ACT: controle positivo com DNA genômico e oligonucleotídeos para Actina. Os produtos de PCR foram amplificados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo. M: marcador molecular de pares de bases 1Kb plus (Invitrogen).

Os produtos amplificados mostraram que os três fragmentos possuem tamanhos observados compatíveis com os tamanhos esperados. Para o gene DV431431, o esperado seria um fragmento de 200 pb, para o gene DV411647 o tamanho do fragmento esperado seria de 160 pb e para o gene DV340891 o tamanho do fragmento esperado seria de 215 pb.

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

Em 2007 o genoma de *Aedes aegypti* foi depositado no banco de dados VectorBase e nova anotação foi disponibilizada. As sequências dos nossos transcritos selecionados foram então submetidas a novas análises, resultando em duas proteínas hipotéticas (DV431431 e DV340891) e em uma proteína com alta identidade com Cetoreductase (DV411647) (Tabela 3).

4.2 Análise do transcrito DV431431(Proteína Hipotética)

Realizando buscas por similaridade no banco de dados VectorBase (<http://vectorbase.org>) utilizando a ferramenta BlastN, o transcrito DV431431 apresentou 100% de identidade com o transcrito TC61246. O transcrito DV431431 está anotado como proveniente das bibliotecas de *Aedes aegypti* infectado por vírus dengue (Figura 8).

Figura 8 – Busca *in silico* na base de dados VectorBase para o transcrito TC61246.

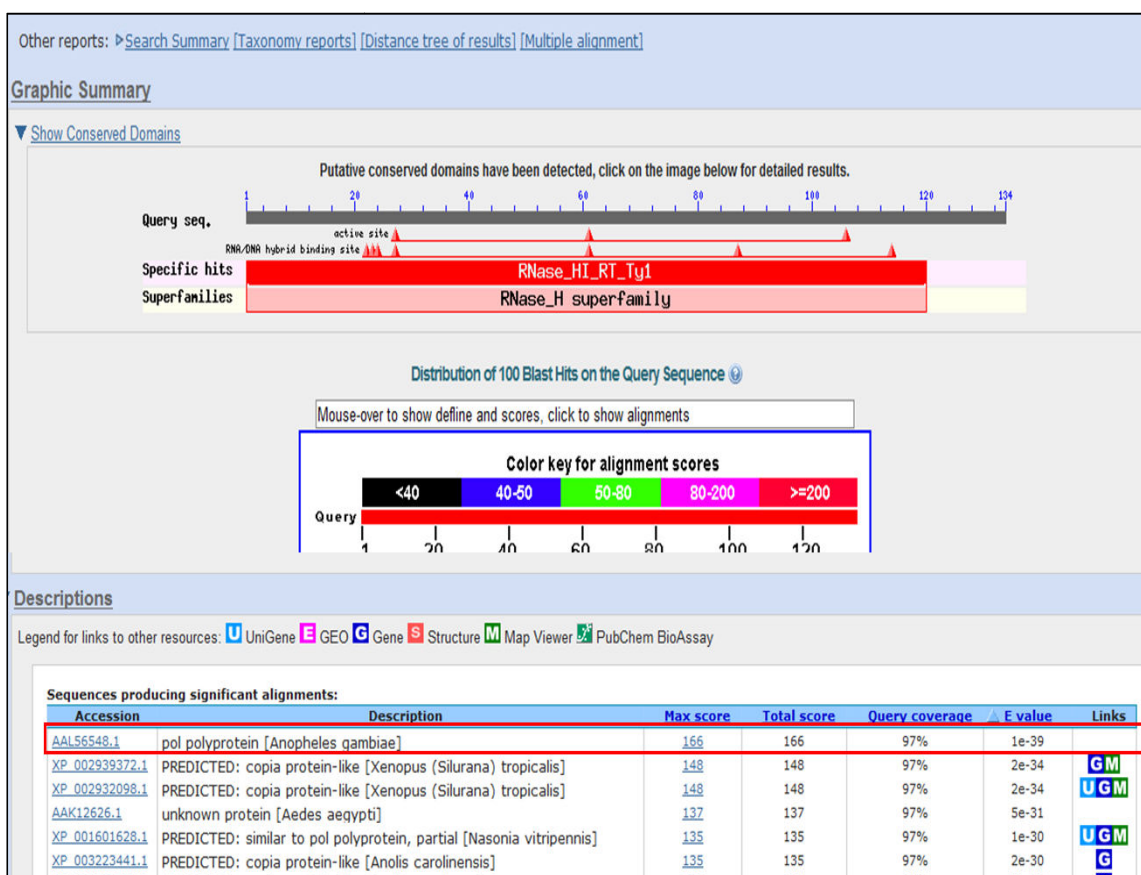
Hit Sequence	E-Value	Length	Score	Identity	Query Start	Query End	Hit Start	Hit End
<input type="checkbox"/> DV431431.1	0.0	689	689	100.00%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV403587.1	0.0	689	689	100.00%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV437342.1	0.0	689	689	100.00%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV425212.1	0.0	689	689	100.00%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV431430.1	0.0	689	689	100.00%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV425213.1	0.0	689	689	100.00%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV405891.1	0.0	689	685	99.85%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV427412.1	0.0	689	685	99.85%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV400234.1	0.0	689	685	99.85%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV435203.1	0.0	689	685	99.85%	5	693	1	689
<input type="checkbox"/> DV430638.1	0.0	682	682	100.00%	12	693	1	682

De acordo com a base de dados o transcrito TC61246 apresenta 100% de identidade com o transcrito DV431431 de *Aedes aegypti* infectado por vírus dengue.
 FONTE - Adaptado da base de dados VectorBase.

Na busca por uma função predita desse gene em mosquitos, nós utilizamos a ferramenta Editseq através do software DNASTAR para traduzir o peptídeo, e confrontamos através de Blastp com o banco de dados GenBank. Os resultados dessa análise mostraram uma identidade 97% com uma poliproteína de *Anopheles*

gambiae(AAL56548)(Figura 7). Foram identificados domínios conservados da superfamília de enzimas RNase H. Essas enzimas clivam o RNA do híbrido RNA/DNA que se forma durante a replicação e reparação e que podem conduzir a instabilidade do DNA se não forem processados (Cerritelli and Crouch 2009). Frente a esses resultados, podemos sugerir que DV431431 codifica uma proteína que talvez esteja envolvida com a replicação/reparação do DNA.

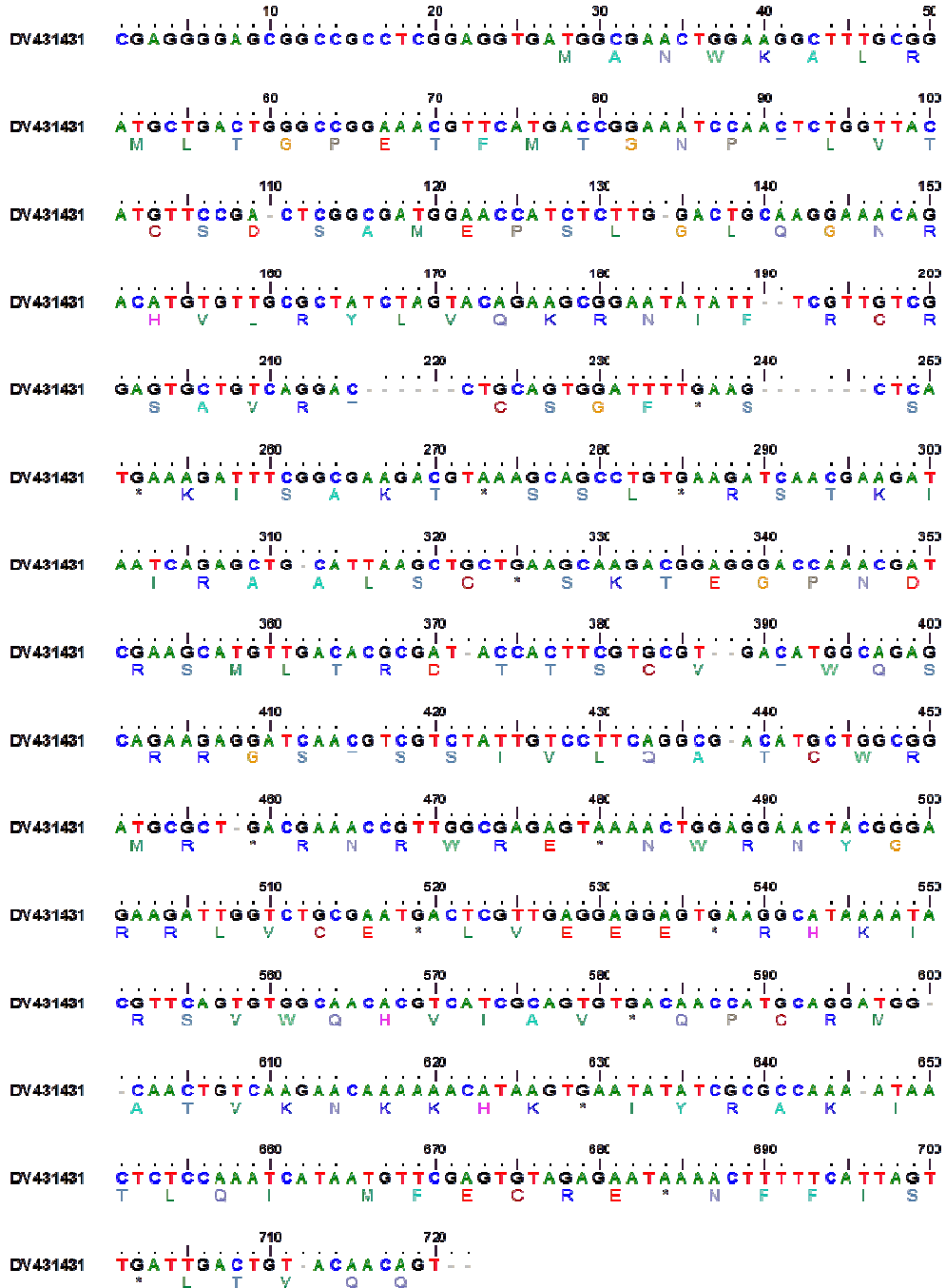
Figura 9 – Busca *in silico* na base de dados NCBI (GenBank) do peptídeo traduzido à partir do transcrito DV431431



De acordo com a base de dados o peptídeo apresenta 97% de identidade com uma poliproteína de *Anopheles gambiae* (AAL56548). O resultado da busca também identificou domínios conservados da superfamília de enzimas RNase H.
 FONTE - Adaptado da base de dados NCBI(GenBank).

A figura 10 mostra a sequência de nucleotídeos, assim como a sequência deduzida dos aminoácidos do cDNA predito de DV431431.

Figura 10 – Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos à partir do cDNA que codifica o transcrito DV431432.

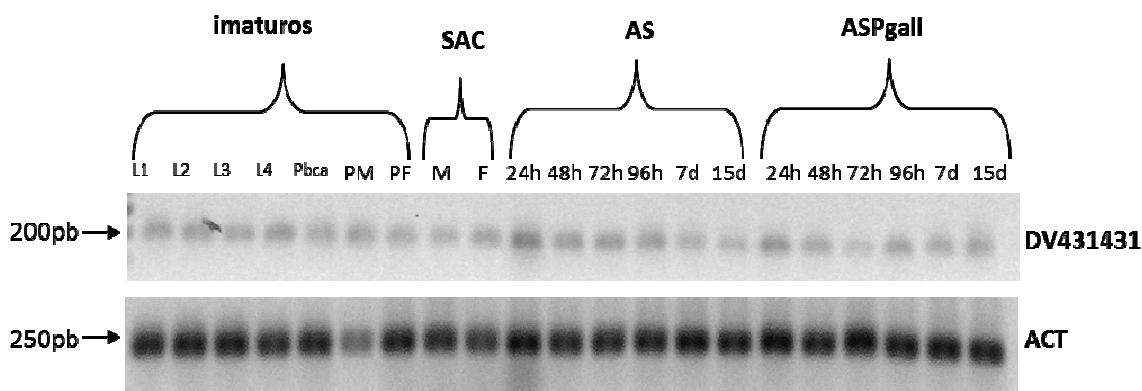


O asterisco indica o nucleotídeo que codifica o stop códon.

4.2.1 Caracterização do perfil do transcrito DV431431 em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*

Para caracterizar o perfil desse transcrito ao longo do desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* e mediante a infecção por *P. gallinaceum*, foram utilizados os seguintes animais: 100 larvas L1, 100 larvas L2, 30 larvas L3, 10 larvas L4, 10 pupas machos, 10 pupas fêmeas e mosquitos adultos, sendo 5 animais nas diferentes condições alimentares. Os machos adultos foram mantidos em solução de sacarose 10%. As fêmeas foram mantidas em solução de sacarose 10% até 5 dias após a emergência. A solução de sacarose 10% foi retirada dos potes 24 horas antes do repasto sanguíneo infectado e não infectado (grupo controle). As fêmeas do grupo sadio realizaram repasto sanguíneo em pintainho sadio e as fêmeas do grupo experimental foram alimentadas através de repasto sanguíneo em pintainho infectado com *Plasmodium gallinaceum*. As fêmeas completamente ingurgitadas de ambos os grupos foram separadas e mantidas novamente com solução de sacarose 10%. Precisamente 24, 48, 72 horas, 7 e 15 dias após o repasto sanguíneo, 10 fêmeas de cada grupo foram coletadas para extração de RNA total (pool de 10 fêmeas sadias e pool de 10 fêmeas infectadas), síntese de cDNA, RT-PCR para avaliação das amostras. A figura 11 mostra os géis de agarose com as bandas evidenciadas por brometo de etídeo correspondentes aos fragmentos amplificados a partir de fitas de cDNA. A amplificação de actina(ACT) foi utilizada como padrão de normalização das amostras. Como podemos notar na figura 11, não ocorreu nenhum acúmulo diferencial dos transcritos que codificam o gene DV431431.

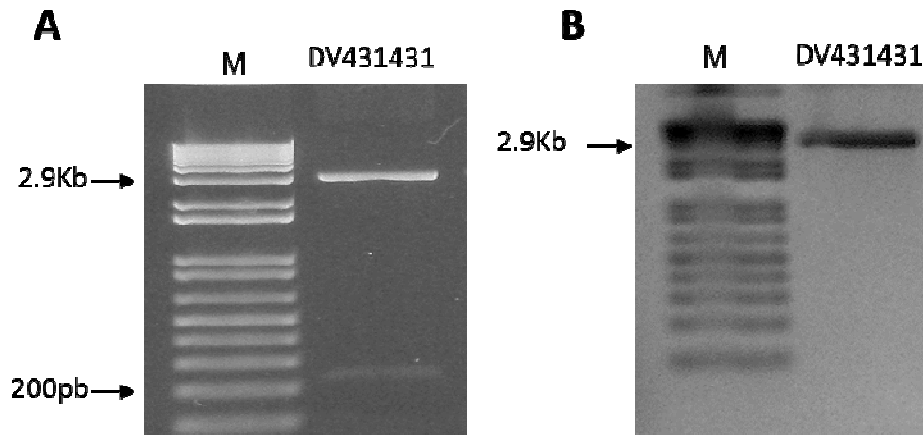
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de RT-PCR em *Aedes aegypti* durante o ciclo de vida.



L1-L4: larvas de estágio 1-4; **Pbca:** pupa recém-mudada; **PM:** pupa macho; **PF:** pupa fêmea; **M:** macho; **F:** fêmea adulta mantidos com sacarose 10%; **AS:** fêmeas adultas 24, 48, 72, 96 horas, 7 e 15 dias após a alimentação sanguínea; **ASgall:** fêmeas adultas 24, 48, 72, 96 horas, 7 e 15 dias após a alimentação sanguínea infectada com *Plasmodium gallinaceum*.

As amostras de RNA descritas para as RT-PCRs sem-quantitativas foram usadas como molde nas RT-PCRs em tempo real quantitativa na presença de SYBR® Green. Os fragmentos de DNA amplificados nas PCRs foram clonados no plasmídeo pJET 1.2/blunt como descrito em Material e Métodos (item 3.6.1). O DNA do plasmídeo foi purificado e digerido com a enzima de restrição *Bgl*II para visualização do clone positivo (Figura 12 A), a sequência foi confirmada pela reação e análise por sequenciamento (dados não mostrados). Os plasmídeos contendo os fragmentos clonados foram linearizados após a digestão com a enzima de restrição *Xho*I (figura 12B) e utilizados como molde na construção de curvas padrão que consistiam de diluições seriadas. As quantidades de cópias do DNA de plasmídeo em cada ponto da curva foram determinadas através da equação mostrada em Material e Métodos (item 3.6.1). 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*. As quantificações foram feitas em triplicata. A especificidade da reação foi analisada através da curva de dissociação (melting curve).

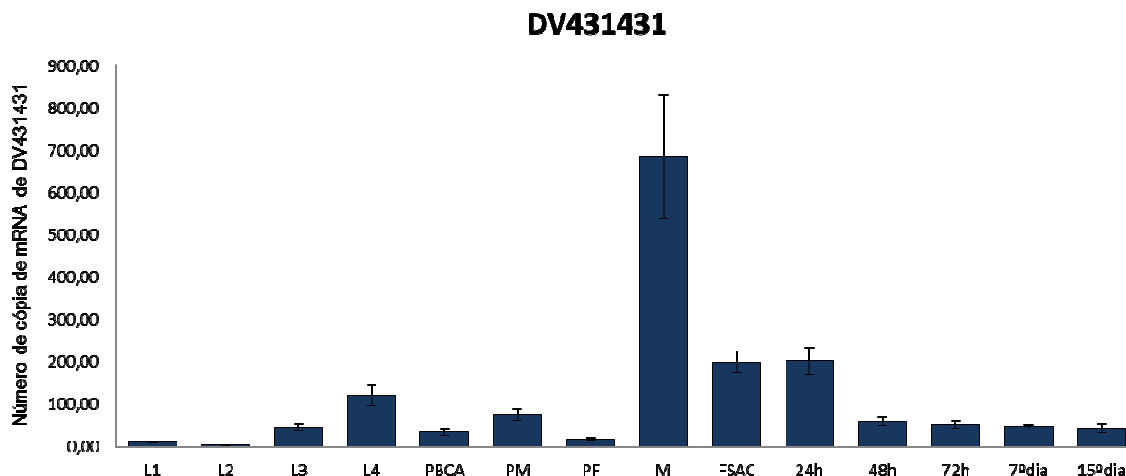
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA do plasmídeo com inserto DV431431.



M: marcador de pares de bases. **A-** DNA de plasmídeo submetido à digestão com enzima de restrição *Bgl*II. **B-** DNA de plasmídeo submetido à digestão com enzima de restrição *Xho*I.

Através dessa abordagem experimental foram determinadas primeiramente as quantidades de mRNA de DV431431 durante o ciclo de vida dos mosquitos *Aedes aegypti* (figura 13).

Figura 13 – Análise do perfil de RNAs de DV431431 durante o ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

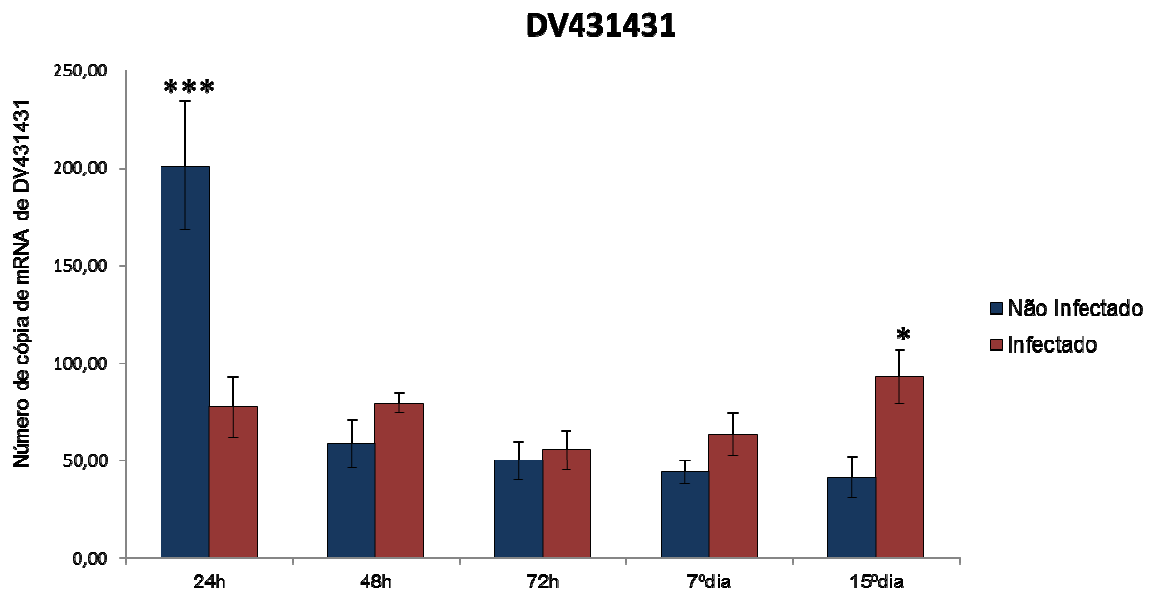


Foram utilizadas amostras de cDNA de larvas, pupas, e mosquitos adultos como molde das qRT-PCR. **L1-L4**: larvas de estágio 1-4; **PBCA**: pupa recém mudada; **PM**: pupa macho; **PF**: pupa fêmea; **M**: macho adulto; **FSAC**: fêmeas adultas mantidas com sacarose 10%; **24h-15d**: fêmeas adultas de 24 horas a 15 dias após a ingestão sanguínea. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. O número de cópias de mRNA é dado por indivíduo.

Os resultados mostraram que as larvas L1 apresentaram em média 2,29 cópias/indivíduo, decrescendo para 0,35 cópias/indivíduo em larvas L2, aumentando para 8,49 e 24,85 em larvas L3 e L4, respectivamente. Em pupas recém mudadas houve um ligeiro decréscimo para 8,60 cópias/indivíduo, diminuindo ainda mais nas pupas fêmeas (2,63 cópias/indivíduo). Entretanto, nas pupas machos, no final da fase de pupa, houve um aumento discreto para 13,11 cópias/indivíduo. Já nos insetos adultos, as fêmeas mantidas em sacarose e 24 horas após o repasto sanguíneo, o número foi de 24,02 e 32,97 cópias/indivíduo respectivamente, diminuindo para 12,13, e 9,44 cópias/indivíduo nas amostras 48 e 72 horas após a alimentação e mantendo em torno de 5,73 e 10,81 nas fêmeas 7 e 15 dias após a alimentação sanguínea. É interessante notar o aumento expressivo no número de cópias do mRNA de DV431431 nos mosquitos machos (148,24 cópias/indivíduo), sendo 6,17 vezes maior que nas fêmeas mantidas em sacarose.

Em relação a quantidade de mRNA dos transcritos de DV431431 durante a infecção por *Plasmodium gallinaceum* obtidas nas RT-PCRs em tempo real (figura 14). Podemos notar que em fêmeas 24 horas após o repasto sanguíneo infectado houve uma redução de 2,60 vezes em relação às fêmeas não infectadas (201,02 e 77,28 cópias/indivíduo respectivamente). As análises estatísticas mostram que essa redução é significativa ($p < 0,001$). Nas fêmeas 48, 72 horas e 7 dias após a infecção não ocorre modificação no acúmulo de mRNA do gene DV431431 (79,12, 55,37, 63,40 cópias/indivíduo). Entretanto, 15 dias após a infecção a quantidade de mRNA nas fêmeas infectadas foi 92,82 cópias/indivíduo enquanto nas fêmeas sadias foi 41,29 cópias/indivíduo. As análises estatísticas mostraram significância moderada nessas amostras ($p < 0,05$).

Figura 14 – Análise comparativa do perfil de mRNAs de DV431431 durante a infecção por *Plasmodium gallinaceum* em fêmeas de *Aedes aegypti*.

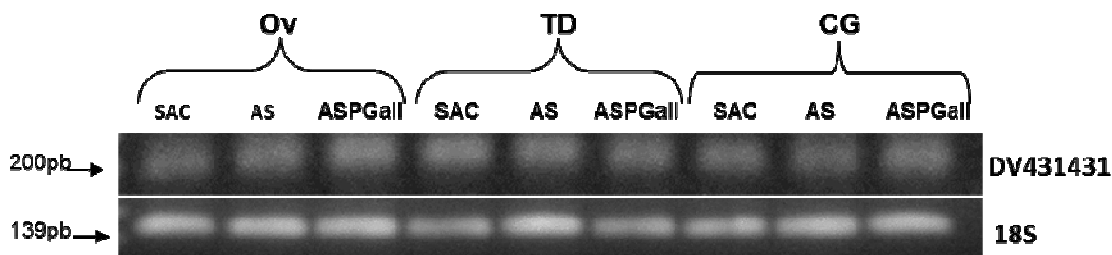


Foram utilizadas amostras de cDNA de fêmeas adultas infectadas (barras vermelhas) ou não (barras azuis) por *P.gallinaceum* como molde das qRT-PCR. **24h-15d**: fêmeas adultas de 24 horas a 15 dias após a ingestão sanguínea. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. O número de cópias de mRNA é dado por indivíduo. Os dados representam valores médios e as barras de erros indicam o desvio padrão. A análise estatística foi realizada através dos testes t (Student) e ANOVA. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

Para melhor caracterizarmos o perfil da transcrição de DV431431 nos tecidos do mosquito e durante a infecção por *P. gallinaceum*, foi realizado RT-PCR (figura 15) e RT-PCR em tempo real (figura 16). Para isso foram utilizados tecidos específicos de fêmeas após a alimentação com e sem infecção. Foram utilizados 30 corpos gordurosos, 30 intestinos médios e 20 pares de ovários dos pontos 24h e 48h.

Os resultados apresentados na figura 15 mostraram que o transcrito DV431431, presente em células do corpo gorduroso, ovários e trato digestivo, tanto de fêmeas 24 horas após repasto sanguíneo, como também em fêmeas mantidas com solução de sacarose 10% estão íntegros. Como controle foi realizado RT-PCR com iniciadores para o transcrito 18S RNA ribossômico (gene constitutivo).

Figura 15 – Perfil espacial de transcrição do gene DV431431 durante a infecção por *P. gallinaceum* em fêmeas de *Aedes aegypti*.



Os tecidos foram dissecados em fêmeas mantidas em sacarose e 24 horas após o repasto sanguíneo. Ov: ovário; **TD:** trato digestivo; **CG:** corpo gorduroso; **SAC:** fêmea adulta mantida com sacarose 10%; **AS:** 24 horas após alimentação sanguínea; **ASPGall:** 24 horas após a ingestão sanguínea infectada com *P. gallinaceum*. Cada cDNA foi testado anteriormente por ausência de gDNA contaminante (dados não mostrados)

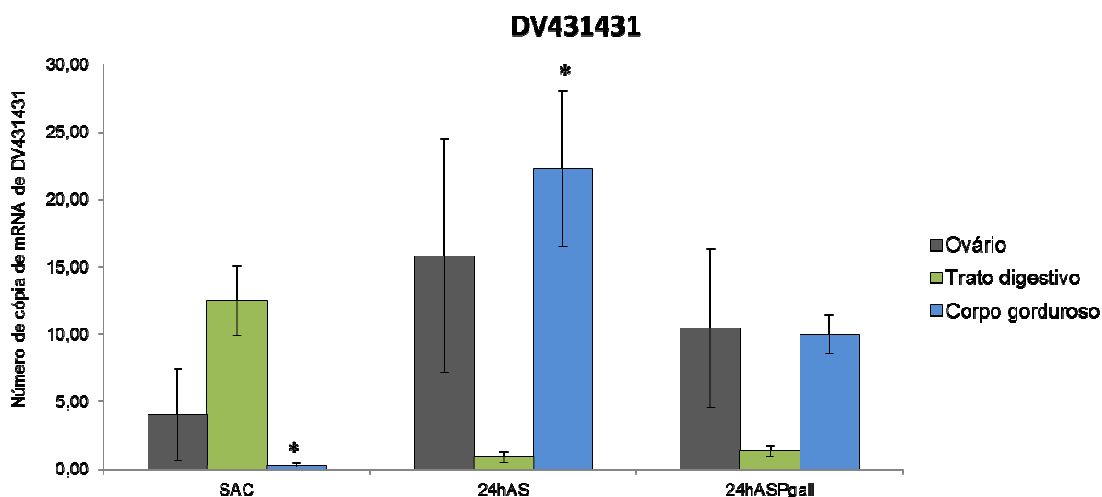
As mesmas amostras descritas acima foram utilizadas para a quantificação de mRNA do gene DV431431 dos tecidos específicos (Figura 16).

Nos ovários (barras cinza) a quantidade de mRNA do transcrito DV431431 foi de 4,03 cópias/indivíduo nas fêmeas mantidas em sacarose 10% aumentando para 15,83 cópias/indivíduo nas fêmeas após 24 horas de alimentação sanguínea. Nas fêmeas infectadas por *P.gallinaceum* ocorreu uma ligeira diminuição para 10,43 cópias/indivíduo, mas sem significância estatística (p 0.2007). Nas amostras de trato digestivo (barras verde) as fêmeas mantidas em sacarose tiveram 12,50

cópias/indivíduo, e tanto nas amostras 24 horas após repasto sanguíneo sadio quanto infectado houve uma queda significativa nas quantidades de mRNA do gene DV431231 (0,87 e 1,30 cópias/indivíduo) respectivamente. Entretanto, não houve nenhuma mudança no acúmulo desses mRNAs na presença da infecção.

Já nas amostras de corpos gordurosos, podemos notar uma aumento expressivo no número de cópias por indivíduo nas fêmeas 24 horas após a alimentação em relação as fêmeas mantidas em sacarose (0,30 e 22,27 cópias por indivíduo, respectivamente). A diminuição da quantidade de mRNA nos corpos gordurosos das fêmeas infectadas (9,97 cópias) é significativa estatisticamente ($p < 0,05$) e corrobora com os dados obtidos nas quantificações de mosquitos inteiros obtida anteriormente.

Figura 16 – Quantificação do acúmulo de transcritos do gene DV431431 (Proteína Hipotética) mediante a infecção por *Plasmodium gallinaceum*.

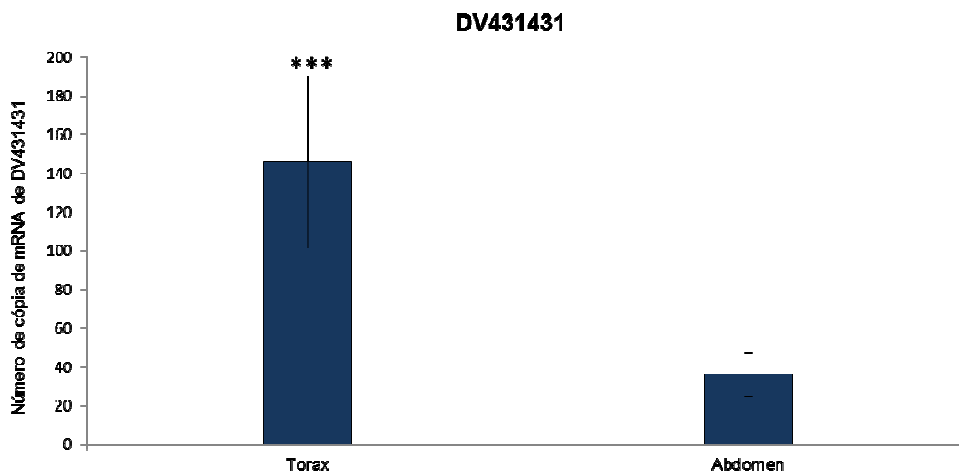


Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. **SAC**: fêmeas adultas mantidas com solução de sacarose 10%; **AS**: 24 horas após alimentação sanguínea; **ASPgall**: 24 horas após a ingestão sanguínea infectada com *P. gallinaceum*. * $P < 0.05$. Para as análises estatísticas foram utilizados o teste t (Student) e ANOVA.

4.2.2 Caracterização do transcrito DV431431 em mosquito *Aedes aegypti* macho

Frente aos resultados de grande quantidade de mRNA do gene DV431431 em machos, a caracterização inicial da localização dos transcritos de DV431431, foi obtida. Para esses experimentos, os indivíduos foram divididos em dois agrupamentos de tecidos representados por tórax e abdômen (figura 17). Os resultados obtidos em triplicatas biológicas indicam que a presença do transcrito do gene DV431431 no tórax é significativamente maior ($p < 0,0001$) quando comparado à quantidade apresentada no abdômen (446 e 116 cópias/indivíduo, respectivamente).

Figura 17 – Perfil espacial de transcrição do gene DV431431.



Os mosquitos machos foram separados em tórax e abdômen, o RNA total purificado e experimentos de qRT-PCR foram executados de acordo com o descrito em Materiais e Métodos (item X). Os dados representam valores médios e as barras de erros indicam o desvio padrão. A análise estatística foi realizada através dos testes t (Student) e ANOVA. *** $p < 0,001$.

4.3 Análise do transcrito DV340891(Proteína Hipotética)

Utilizando os mesmos parâmetros de busca por similaridade em bancos públicos de sequências, como descrito para o transcrito anterior, nós encontramos na base de dados VectorBase, para o contig TC52023, 99.09% de identidade com o transcrito DV340891(Figura 18). No banco de dados Genbank esse transcrito esta anotado como proveniente de biblioteca de *Aedes aegypti* infectado com *P. gallinaceum*.

Figura 18 – Busca in silico na base de dados VectorBase para o transcrito TC52023.

VectorBase: *Ae. aegypti* Homepage Anopheles Aedes Ixodes Culex Pediculus Rhodnius Get VectorBase Help

Sequence Data Expression Data Images Documents More... Tools Get Data Forum Search User

BLAST ClustalW HMMER

BLAST @ VectorBase.org »

vs. A. aegypti ESTs December 2010 GenBank »

<input type="checkbox"/> Hit Sequence	E-Value	Length	Score	Identity	Query Start	Query End	Hit Start	Hit End
<input type="checkbox"/> DV340891.1	0.0	880	856	99.09%	16	895	22	901
<input type="checkbox"/> DV326725.1	0.0	876	848	98.97%	20	895	10	885
<input type="checkbox"/> DV371545.1	0.0	869	845	99.08%	27	895	17	885
<input type="checkbox"/> DV372307.1	0.0	869	845	99.08%	27	895	18	886
<input type="checkbox"/> DV336773.1	0.0	860	836	99.07%	1	860	1	860
<input type="checkbox"/> DV376460.1	0.0	843	819	99.05%	53	895	19	861
<input type="checkbox"/> DV324497.1	0.0	866	808	97.81%	74	939	1	866
<input type="checkbox"/> DV324499.1	0.0	829	801	98.91%	11	839	1	829
<input type="checkbox"/> DV336130.1	0.0	823	799	99.03%	38	860	1	823
<input type="checkbox"/> DV330754.1	0.0	834	780	97.84%	106	939	1	834
<input type="checkbox"/> DV340890.1	0.0	802	748	97.76%	138	939	1	802
<input type="checkbox"/> DV330755.1	0.0	766	742	98.96%	130	895	17	782

Results Display

Sorting by: E-Value, ascending
[View Raw Results »](#)

Group Results By Hit Sequence

Display Results

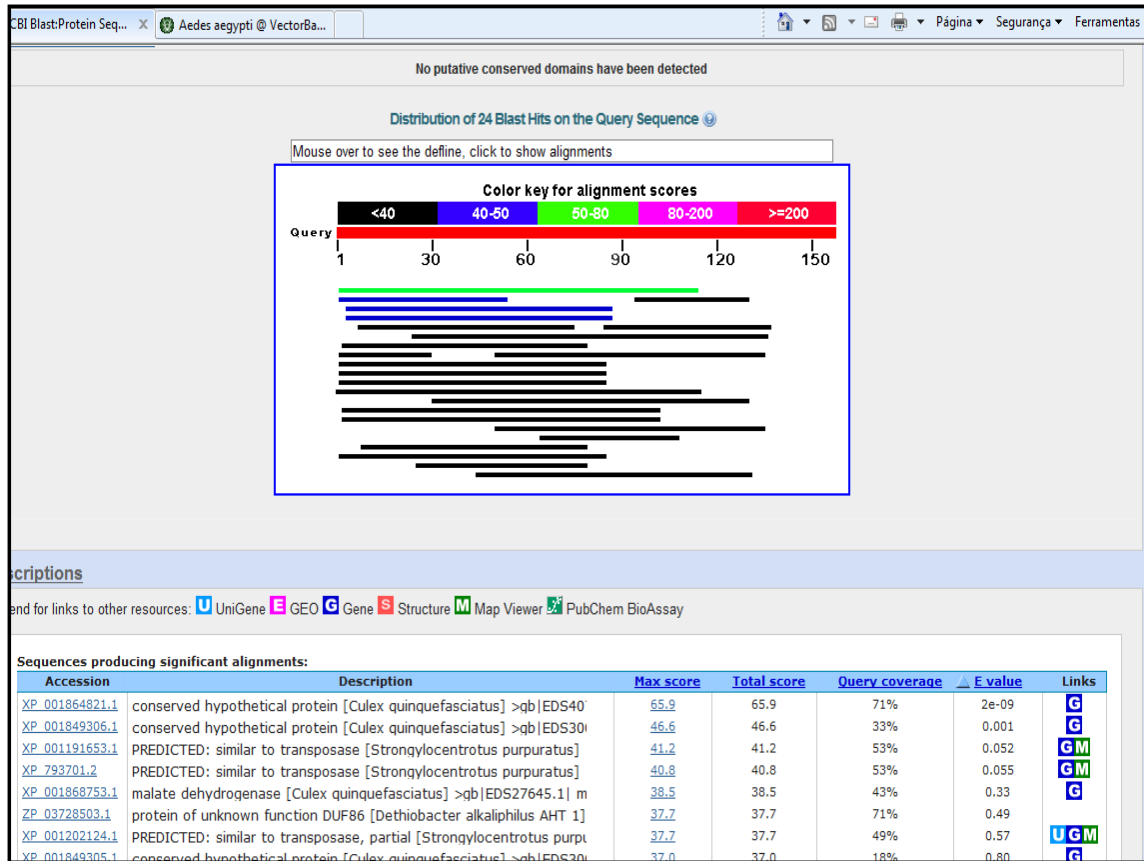
--Select Action--

Busca *in silico* na base de dados VectorBase para o transcrito TC52023. De acordo com a base de dados o transcrito TC52023 apresenta 99.09% de identidade com o transcrito DV340891 de *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.
 FONTE - Adaptado da base de dados VectorBase.

Na busca por uma função predita desse gene em mosquitos, nós utilizamos os mesmos padrões já descritos anteriormente para a tradução de peptídeo e busca no banco de dados Genbank. O resultado obtido mostrou 71% de identidade com uma proteína hipotética conservada (XP001864821) de *Culex quinquefasciatus* (figura 98). Essa proteína não tem domínios descritos até o momento.

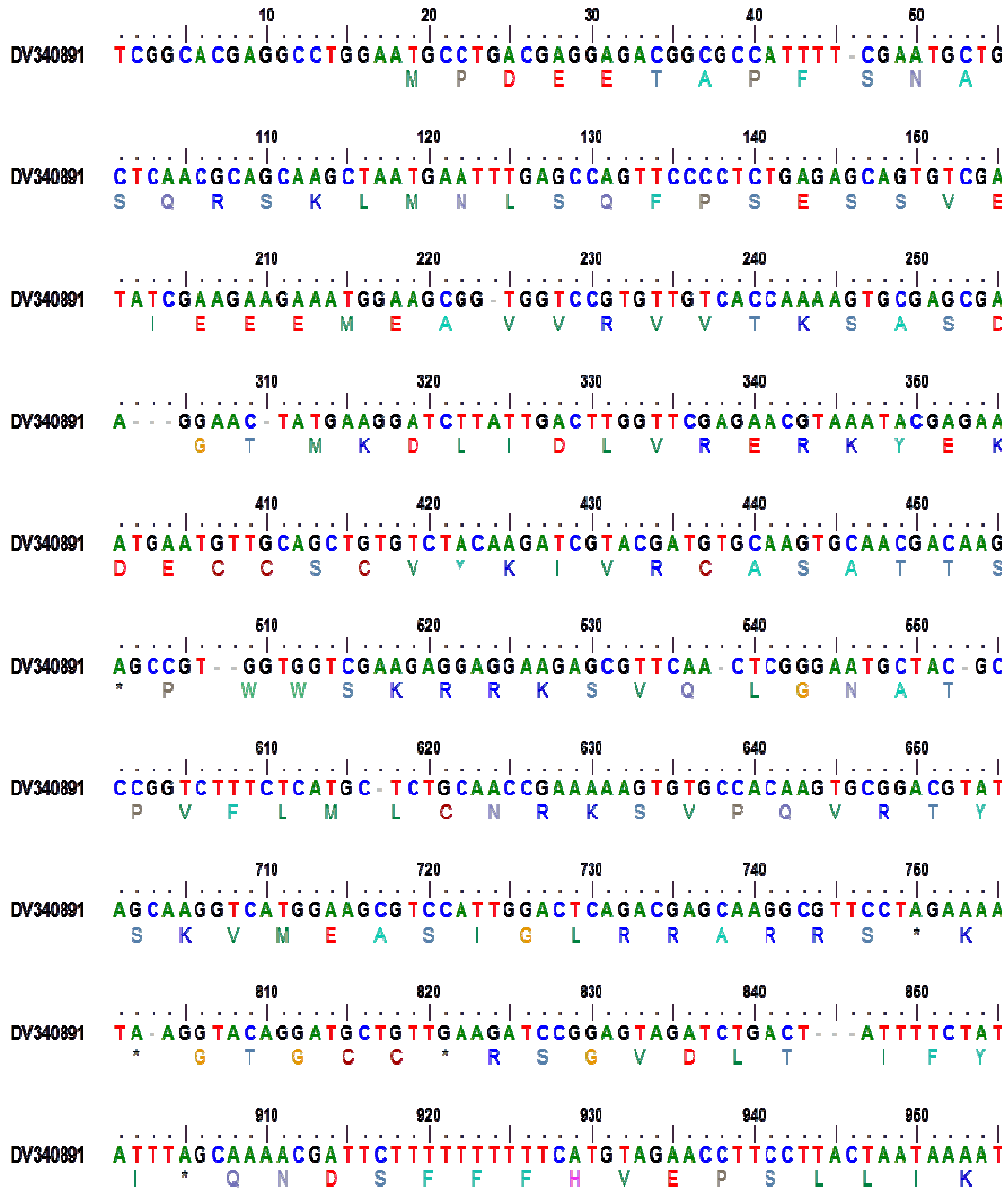
A figura 20 mostra a sequência de nucleotídeos assim como a sequência deduzida dos aminoácidos do cDNA predito de DV340891.

Figura 19 – Busca in silico na base de dados NCBI(GenBank) do peptídeo traduzido à partir do transcrito DV340891.



De acordo com a base de dados o peptídeo apresenta 71% de identidade com uma proteína hipotética conservada de *Culex quinquefasciatus* (XP001864821).
 FONTE - Adaptado da base de dados NCBI (GenBank).

Figura 20 – Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos à partir do cDNA que codifica o transcrito DV340891.

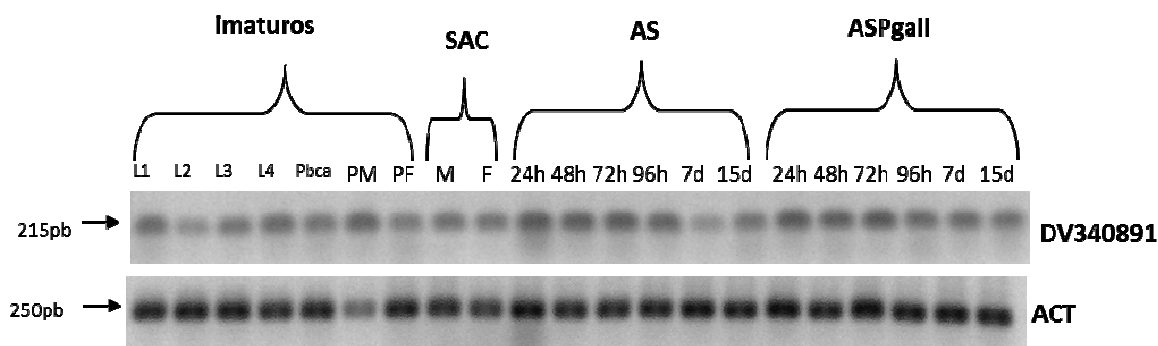


O asterisco indica o nucleotídeo que codifica o stop códon.

4.3.1 Caracterização do perfil do transcrito DV340891 em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*

Para analisar esse gene ao longo do desenvolvimento, os parâmetros utilizados foram os mesmos descritos para o gene anterior (item 4.2.1). Para analisar a qualidade das amostras, nós realizamos experimentos de RT-PCR, (Figura 21). O controle positivo foi feito com oligonucleotídeos iniciadores para a actina.

Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR em *Aedes aegypti* em diferentes estágios de desenvolvimento.

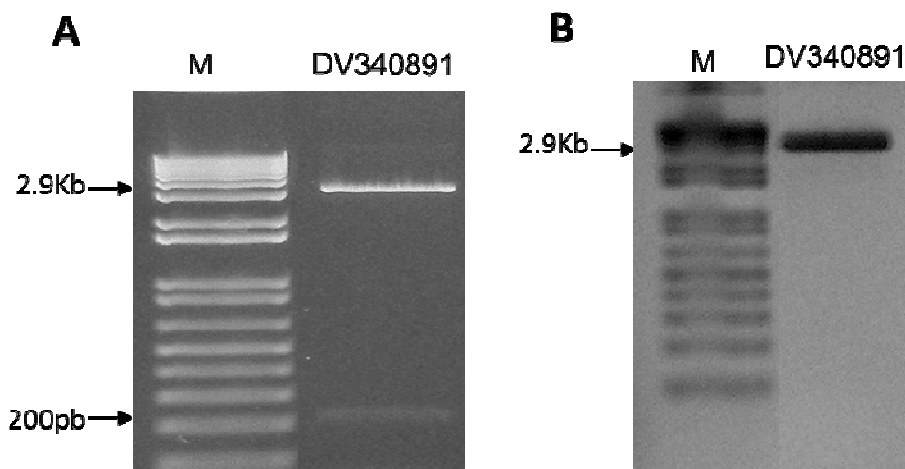


cDNA sintetizado a partir de mRNAs mosquitos durante o ciclo de vida foram submetidos à PCR para a amplificação dos transcritos dos genes DV340891 e actina (ACT). Os produtos da reação foram analisados na eletroforese e corados com brometo de etídeo. **L1-L4**: larvas de estágio 1-4; **Pbc**: pupa recém mudada; **PM**: pupa macho; **PF**: pupa fêmea; **M**: macho; **F**: fêmea adulta mantidos com sacarose 10%; **AS**: fêmeas adultas 24, 48, 72, 96 horas, 7 e 15 dias após a alimentação sanguínea; **ASgall**: fêmeas adultas 24, 48, 72, 96 horas, 7 e 15 dias após a alimentação sanguínea infectada com *Plasmodium gallinaceum*.

Com o objetivo de quantificar o transcrito DV340891, foram realizados experimentos de RT-PCR em tempo real, para isso, conforme descrito anteriormente, para a construção da curva padrão, o produto da amplificação do gene DV340891 foi submetido à ligação em vetor de clonagem, conforme descrito em material e métodos 3.6.1, as sequências foram confirmadas por sequenciamento e depois linearizadas (Figura 22). As diluições seriadas do plasmídeo contendo o inserto parcial de DV340891 (215 pb) foram utilizadas para a obtenção de valores absolutos do número de cópias de RNA mensageiro das amostras analisadas. As

quantificações foram feitas em triplicata. A especificidade da reação foi analisada através da curva de dissociação (melting curve).

Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA do plasmídeo com inserto DV340891.



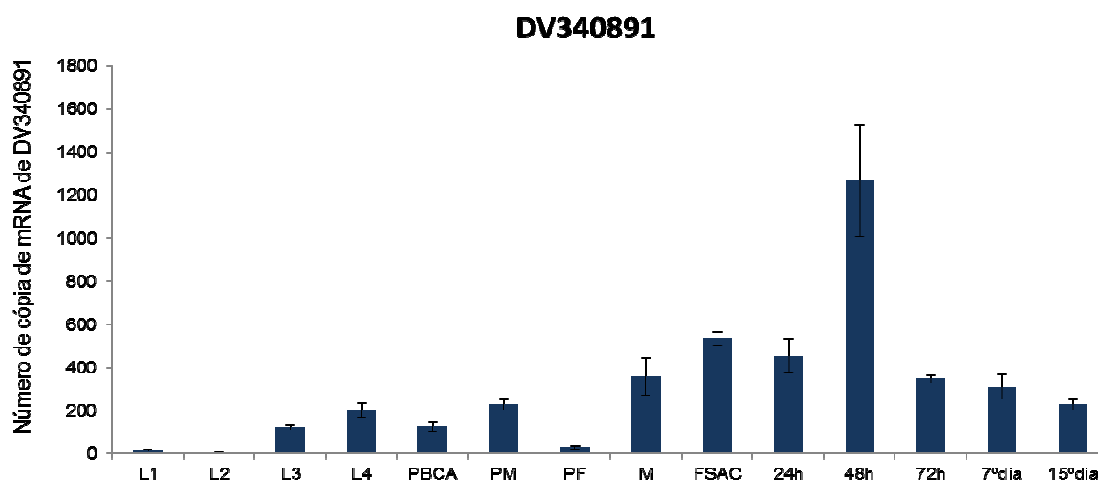
M: marcador de pares de bases (1 Kb plus, Invitrogen). **A-** DNA de plasmídeo submetido à digestão com enzima de restrição *Bgl*II. **B-** DNA de plasmídeo submetido à digestão com enzima de restrição *Xho*I.

As quantificações dos mRNAs do transcrito do gene DV340891 foram obtidas primeiramente durante o ciclo de vida dos mosquitos *Aedes aegypti* (figura 23). Os resultados mostram que o perfil nas larvas se inicia com 14 cópias/indivíduo em L1, diminuindo para 3 cópias/indivíduo em L2, sofrendo um ligeiro aumento para 121 e 201 cópias/indivíduo nas L3 e L4 respectivamente. Nas pupas recém mudadas ocorre uma diminuição para 123 cópias/indivíduo, ocorrendo uma redução maior nas pupas fêmeas no final de desenvolvimento pupal (26 cópias/indivíduo). Nas pupas macho em final de desenvolvimento ocorre um pequeno aumento (227 cópias/indivíduo) quando comparado as pupas fêmeas e início de desenvolvimento. Nos mosquitos adultos o número de mRNAs nos machos foi de 357 cópias/indivíduo. Nas fêmeas mantidas em sacarose 10% foi de 534 cópias/indivíduo, fêmeas alimentadas após 24 horas de 451 cópias/indivíduo. Nas fêmeas 48 horas após o repasto sanguíneo o número de mRNA aumentou 2,81 vezes (1269 cópias/indivíduo) em relação a numero de mRNAs obtido para as

fêmeas 24 horas após o repasto sanguíneo, seguido de diminuição nas fêmeas 72 horas, 7 e 15 dias após o repasto sanguíneo.

Esses resultados mostram que apesar desse transcrito ser expresso durante todo o ciclo de vida de *Aedes aegypti*, o acúmulo significativo de mRNA 48 horas após o repasto sanguíneo pode ser uma informação nova no processo fisiológico dos mosquitos. A maioria dos trabalhos ou artigos científicos se atém a caracterizar expressão gênica durante as primeiras 24 horas após o repasto sanguíneo. Muito pouco se sabe sobre expressão gênica nos mosquitos nos estágios tardios da vitelogênese.

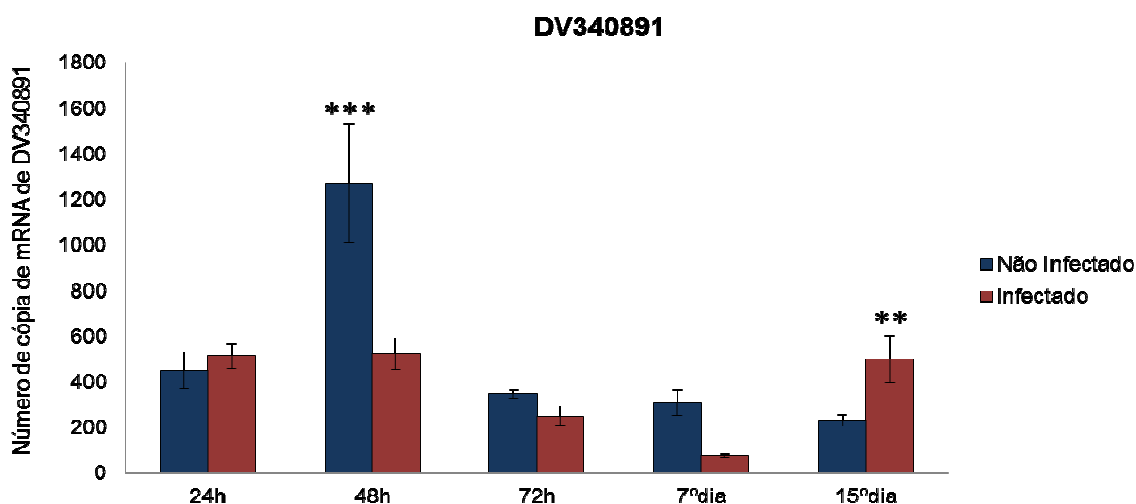
Figura 23 – Análise do perfil de RNAs de DV340891 durante o ciclo de vida de *Aedes aegypti*.



Foram utilizadas amostras de cDNA de larvas, pupas, e mosquitos adultos como molde das qRT-PCR. **L1-L4**: larvas de estágio 1-4; **PBCA**: pupa recém mudada; **PM**: pupa macho; **PF**: pupa fêmea; **M**: macho adulto; **FSAC**: fêmeas adultas mantidas com sacarose 10%; **24h-15d**: fêmeas adultas de 24 horas a 15 dias após a ingestão sanguínea. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. O número de cópias de mRNA é dado por indivíduo.

Em relação a quantidade dos mRNAs do gene DV340891 durante a infecção por *Plasmodium gallinaceum*, obtidas nas RT-PCRs em tempo real (figura 24), podemos notar que ocorre uma redução significativa na quantidade de mRNA 48 horas após o repasto sanguíneo infectado, de 1269 cópias/indivíduo nas fêmeas sadias para 521 cópias/indivíduo nas fêmeas infectadas. Esses resultados são estatisticamente significantes ($p < 0,001$). Nas outras amostras, as quantidades de mRNA do transcrito do gene DV340891, não foi modificada significativamente, mantendo o perfil de transcrição igual ou semelhante ao encontrado para os mosquitos não infectados.

Figura 24 – Análise comparativa do perfil de mRNAs de DV340891 durante a infecção por *Plasmodium gallinaceum* em fêmeas de *Aedes aegypti*.



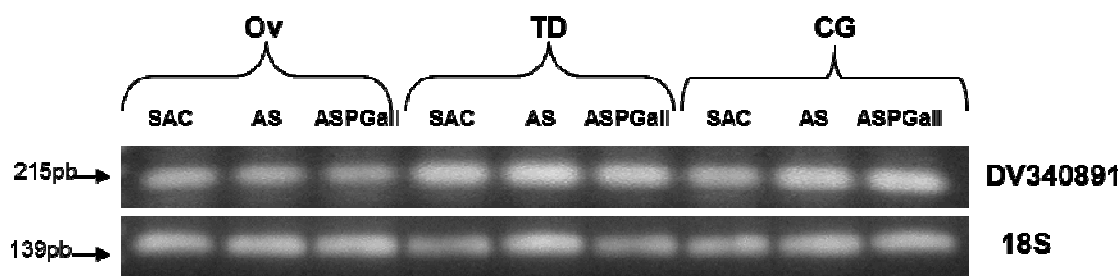
Foram utilizadas amostras de cDNA de fêmeas adultas infectadas (barras vermelhas) ou não (barras azuis) por *P.gallinaceum* como molde das qRT-PCR. **24h-15d**: fêmeas adultas de 24 horas a 15 dias após a ingestão sanguínea. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. O número de cópias de mRNA é dado por indivíduo. Os dados representam valores médios e as barras de erros indicam o desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do testes t (Student) e ANOVA. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Para a caracterização tecidual da transcrição desse gene, foram realizados RT-PCR em tempo real utilizando tecidos específicos, como descrito para o transcrito acima. Como controle de qualidade das amostras foi realizado RT-PCR com os iniciadores específicos para cada gene candidato e para controle dos experimentos foram utilizados oligonucleotídeos para o transcrito 18S ribossômico

(gene constitutivo).

O resultado da figura 25 mostra a integridade do material para o transcrito presente em células do corpo gorduroso, ovários e trato digestivo de fêmeas mantidas com solução de sacarose 10%, em fêmeas 24 horas após repasto sanguíneo e em fêmeas 24 horas após repasto sanguíneo infectado por *P. gallinaceum*, utilizando os mesmos padrões já descritos.

Figura 25 – Perfil espacial de transcrição do gene DV340891 durante a infecção por *P. gallinaceum* em fêmeas de *Aedes aegypti*.



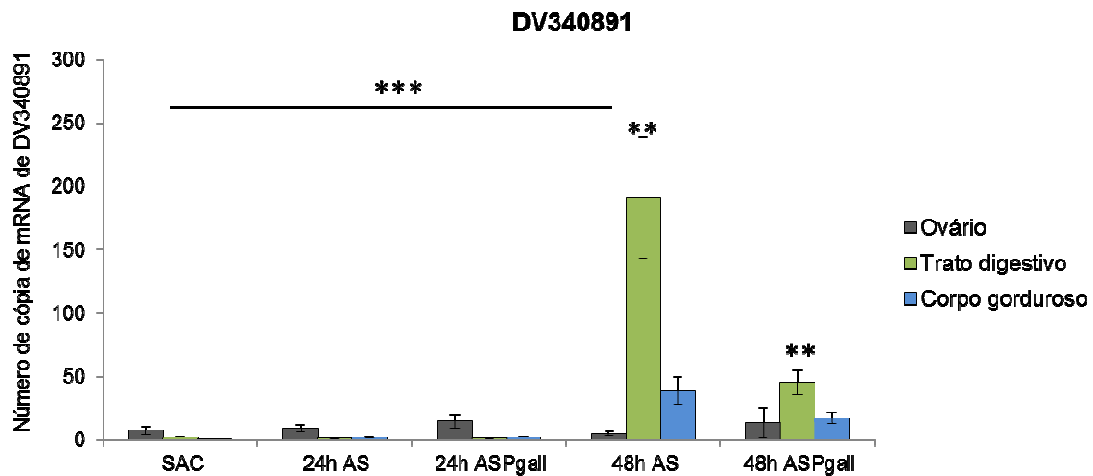
Os tecidos foram dissecados em fêmeas mantidas em sacarose e 24 horas após o repasto sanguíneo. **Ov**: ovário; **TD**: trato digestivo; **CG**: corpo gorduroso; **SAC**: fêmea adulta mantida com sacarose 10%; **AS**: 24 horas após alimentação sanguínea; **ASPGall**: 24 horas após a ingestão sanguínea infectada com *P. gallinaceum*. Cada cDNA foi testado anteriormente por ausência de gDNA contaminante (dados não mostrados).

Os resultados apresentados na figura 25 mostraram que o transcrito DV340891 está presente nos ovários, corpos gordurosos e trato digestivos das amostras de fêmeas sadias e infectadas sem nenhuma modificação.

Nos experimentos de qRT-PCR tecidual, foram adicionados os tempos de 48 horas após o repasto sanguíneo para uma melhor caracterização da expressão diferencial durante a infecção (figura 26). Podemos notar na figura 26 que a expressão dos mRNAs do gene DV340891 é praticamente específica nos tratos digestivos (barras verdes) sendo que nos corpos gordurosos (barras azuis) aparece um número muito baixo de cópias desse mRNA (0,5 cópias/indivíduo, 2 cópias/indivíduo, 2 cópias/indivíduo, 39 cópias/indivíduo e 17 cópias/indivíduo respectivamente). Nos ovários (barras cinza) esse mRNA é pouquíssimo expresso (7 cópias/indivíduo, 9 cópias/indivíduo, 14 cópias/indivíduo, 5 cópias/indivíduo e 13 cópias/indivíduo). Podemos notar também a significativa redução do número de

copias desse mensageiro nos trato digestivos infectados (1 cópias/indivíduo, 45 cópias/indivíduo) quando comparado aos mosquitos não infectados (2 cópias/indivíduo, 2 cópias/indivíduo, 191 cópias/indivíduo). Esses resultados corroboram com os resultados obtidos na quantificação dos mosquitos infectados.

Figura 26 – Perfil espacial de transcrição do gene DV340891 durante a infecção por *P. gallinaceum* em fêmeas de *Aedes aegypti*.



Os tecidos foram dissecados em fêmeas mantidas em sacarose e 24 horas após o repasto sanguíneo sadio ou infectado por *P. gallinaceum*. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. **SAC**: fêmeas adultas mantidas com solução de sacarose 10%; **AS**: 24 horas após alimentação sanguínea; **ASPgall**: 24 horas após a ingestão sanguínea infectada com *P. gallinaceum*. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ Para as análises estatísticas foram utilizados o teste t (Student) e ANOVA.

É interessante ressaltar a redução desse transcrito durante o momento final da invasão dos oocinetos nas células epiteliais do trato digestivo. Essa redução pode significar que essa proteína tenha uma função no impedimento da infecção. Uma super expressão dessa proteína poderia influenciar na redução da infecção dos mosquitos. Acreditamos que esses estudos possam trazer informações adicionais da função dessa proteína hipotética.

4.4 Análise do transcrito DV411647 (Cetoredutase)

Realizando buscas por similaridade no banco de dados VectorBase (<http://vectorbase.org>), conforme descrito anteriormente, o transcrito DV411647 apresentou 100% de identidade com o transcrito TC51426 (Figura 27). O transcrito DV411647 (Genbank) está anotado como proveniente das bibliotecas de *Aedes aegypti* infectado por vírus dengue. A análise da sequência do transcrito TC51426 no banco de dados VectorBase mostrou 97.77% de identidade com o transcrito AAEL010137-RA (AAEL801151)(Figura 28). No VectorBase esse transcrito pode ser encontrado no SuperContig 1.456, sendo produto do gene AAEL010137(AAEL801151). O início da transcrição está localizado no contig_18050 (Figura 29). E o transcrito apresenta um tamanho de 861 pb e 2 éxons e a proteína traduzida predita possui 221 resíduos de aminoácidos. A descrição da anotação do produto gênico no banco de dados VectorBase para esse transcrito é uma provável Cetoredutase.

Figura 27 – Busca in silico na base de dados VectorBase para o transcrito TC51426.

Hit Sequence	E-Value	Length	Score	Identity	Query Start	Query End	Hit Start	Hit End
AY033621.1	0.0	971	963	99.79%	16	986	2	972
AY033626.1	0.0	971	943	99.28%	16	986	2	972
AY064123.1	0.0	910	902	99.78%	32	941	1	910
AY064122.1	0.0	910	882	99.23%	32	941	1	910
DV411647.1	0.0	874	874	100.00%	106	979	5	878
DV372635.1	0.0	858	834	99.30%	77	934	1	858
DV411648.1	0.0	839	827	99.76%	36	873	2	840
DV429919.1	0.0	835	819	99.52%	40	874	1	835
DV368122.1	0.0	835	819	99.52%	40	874	1	835

De acordo com a base de dados o transcrito DV411647 apresenta 100% de identidade com o transcrito TC51246 de *Aedes aegypti* infectado por vírus dengue.
 FONTE - Adaptado da base de dados VectorBase.

Figura 28 – Análise in silico na base de dados VectorBase para o transcrito TC51426.

VectorBase: *Ae. aegypti* | Homepage | Anopheles | Aedes | Ixodes | Culex | Pediculus | Rhodnius | Get VectorBase Help

Sequence Data | Expression Data | Images | Documents | More... | Tools | Get Data | Forum | Search | User

BLAST | ClustalW | HMMER

BLAST @ VectorBase.org »

TC51426 vs. *A. aegypti* Transcripts AaegL1.2 Gene Build »

<input type="checkbox"/> Hit Sequence	E-Value	Length	Score	Identity	Query Start	Query End	Hit Start	Hit End
<input type="checkbox"/> AAEL010137-RA	0.0	852	775	97.77%	123	970	10	861
<input type="checkbox"/> AAEL008159-RA	6e-06	70	26	84.29%	175	244	179	248
<input type="checkbox"/> AAEL008152-RA	9e-05	80	24	82.50%	534	613	535	614
<input type="checkbox"/> AAEL007893-RA	0.001	54	22	85.19%	374	427	485	538
<input type="checkbox"/> AAEL008152-RA	0.022	72	20	81.94%	23	94	18	89
<input type="checkbox"/> AAEL008159-RA	0.35	62	18	82.26%	375	436	379	440
<input type="checkbox"/> AAEL009932-RA	0.35	18	18	100.00%	633	650	2838	2855

Results Display

Sorting by: E-Value, ascending

• View Raw Results »

Group Results By Hit Sequence

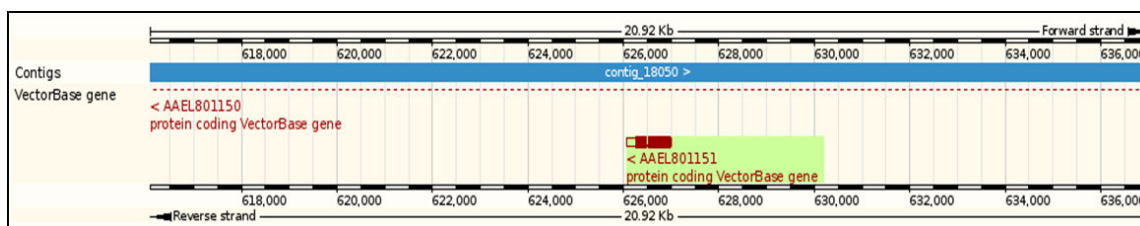
Display All (7) Results

--Select Action--

De acordo com a base de dados o transcrito TC51246 apresenta 97.77% de identidade com o transcrito AAEL010137 de *Aedes aegypti*, anotado como sendo uma provável Ketoreductase.

FONTE - Adaptado da base de dados VectorBase.

Figura 29 – Anotação in silico do transcrito AAEL010137(AAEL801151)



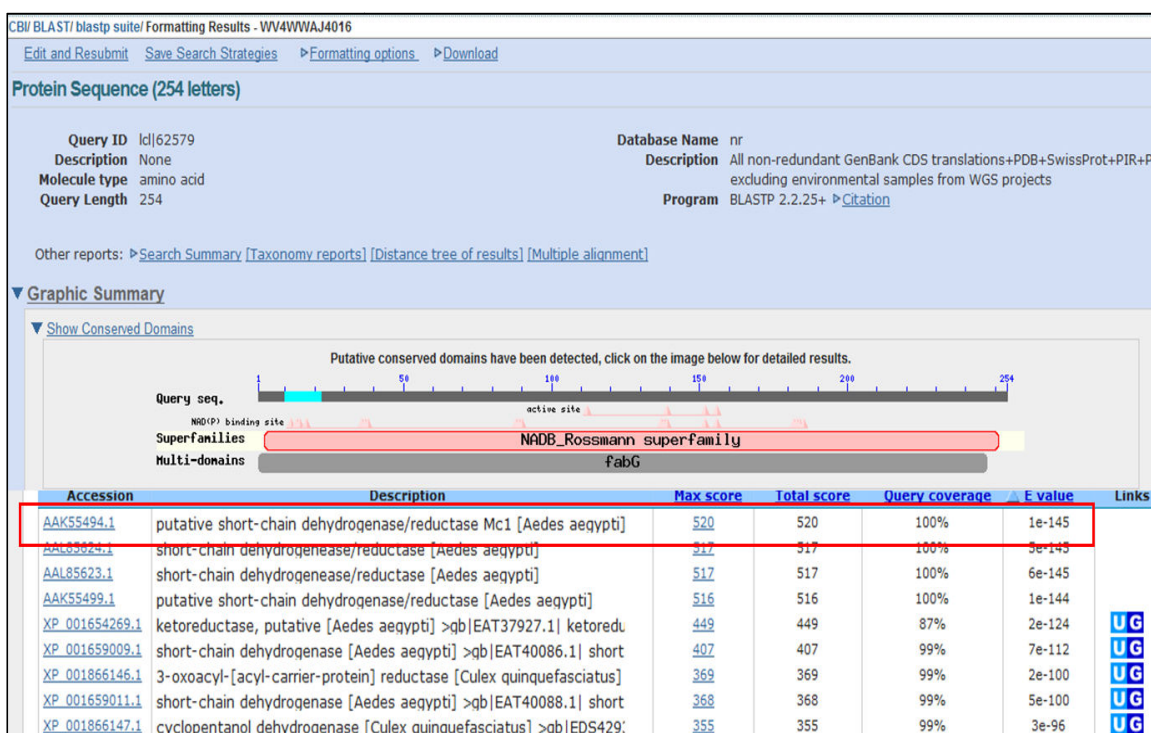
Anotação *in silico* do transcrito AAEL010137(AAEL801151) no genoma de *Aedes aegypti*. Representação das regiões flangeadoras.

FONTE - Adaptado da base de dados VectorBase.

Na busca por uma função predita desse gene em mosquitos, utilizando os mesmos padrões descritos anteriormente para a tradução de peptídeo e busca no banco de dados Genbank, o resultado obtido foi uma provável desidrogenase/redutase de cadeia curta (AAK55494) (Figura 30).

As desidrogenases/reduases de cadeia curta fazem parte de uma superfamília de enzimas, a maioria é conhecida por serem oxidoreduases NAD (P) (H) dependentes. O conceito dessa família foi criado em 1981, quando os únicos membros conhecidos eram, uma desidrogenase ribitol procariótica e uma álcool desidrogenase em *Drosophila*. Essa superfamília é constituída por pelo menos 3000 membros, a maioria de aproximadamente 250-300 resíduos de aminoácidos, que metabolizam vários substratos, como, álcoois, açúcares, esteróides, compostos aromáticos e xenobióticos (KALLBERG *et al.*, 2002; B. PERSON *et al.*, 2003).

Figura 30 – Busca in silico na base de dados NCBI(GenBank) do peptídeo traduzido à partir do transcrito DV431647.

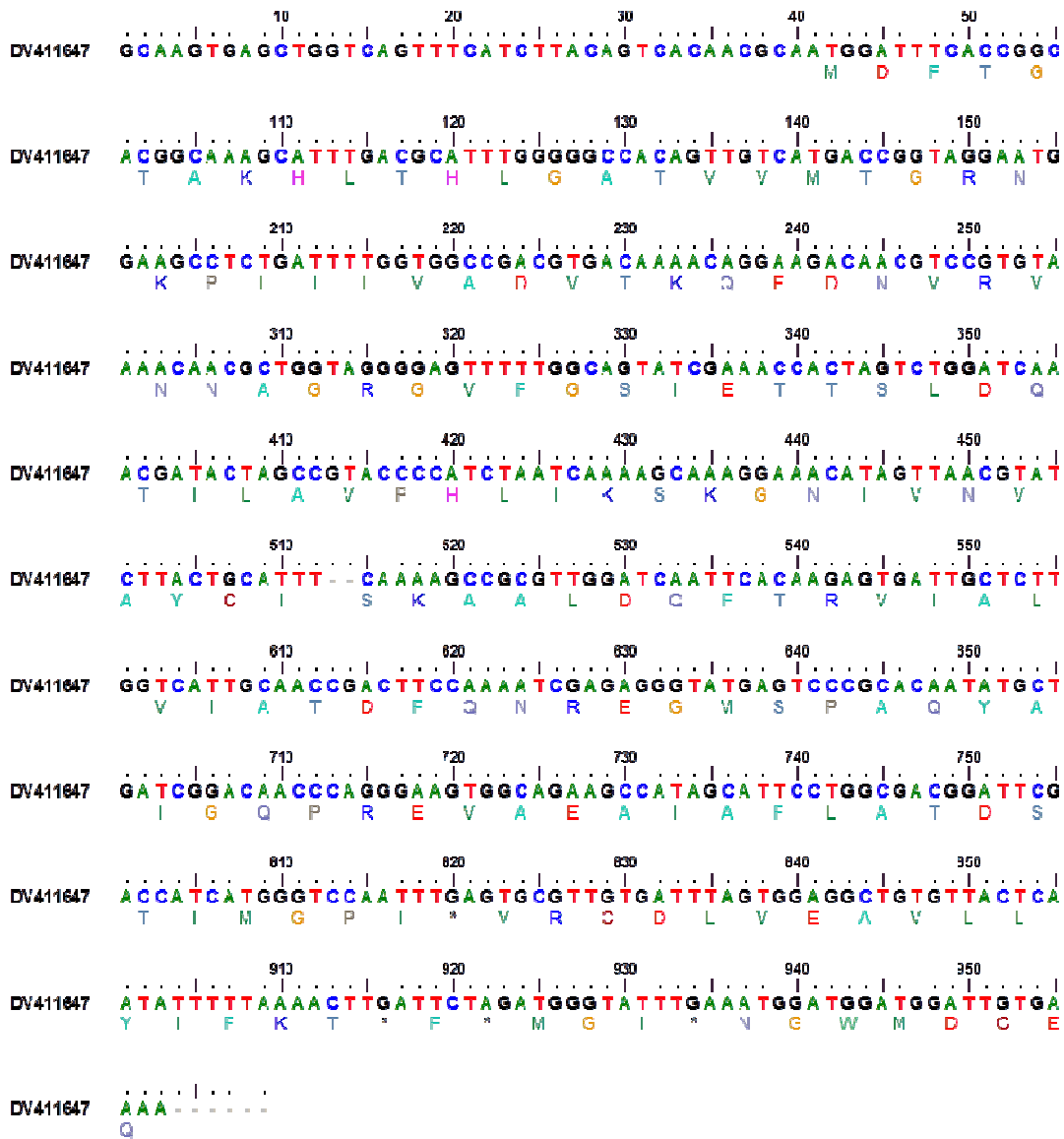


De acordo com a base de dados o peptídeo apresenta 100% de identidade com uma desidrogenase reductase de cadeia curta de *Aedes aegypti* (AAK55494).

FONTE - Adaptado da base de dados NCBI (GenBank).

A figura 31 mostra a sequência predita completa do cDNA da cetoreductase, assim como os resíduos de aminoácidos deduzidos através do programa DNASTar.

Figura 31 – Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos à partir do cDNA que codifica o transcrito DV411467.

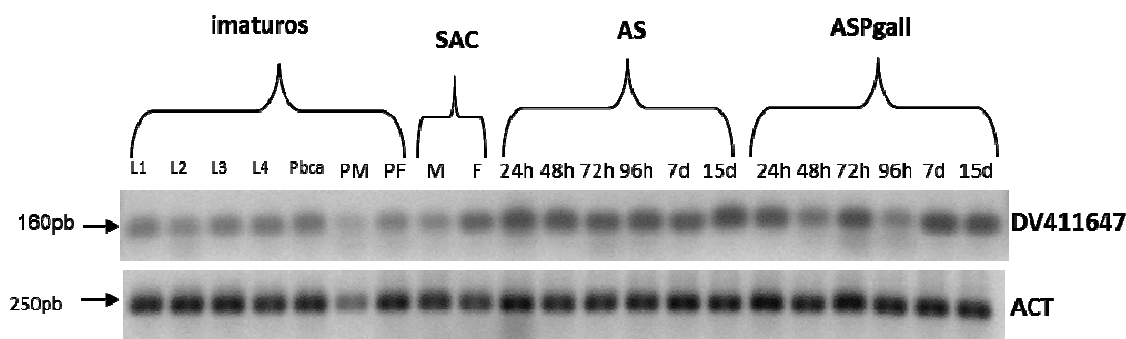


O asterisco indica o nucleotídeo que codifica o stop códon.

4.4.1 Caracterização do perfil do transcrito DV411647 (Cetoreductase) em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*

A análise semi-quantitativa do transcrito DV411647 (Cetoreductase) ao longo do desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*, foi realizado através de RT-PCR para o controle da qualidade das amostras, conforme descrito anteriormente (Figura 32). Para o controle do experimento foi realizado RT-PCR com iniciadores para o transcrito actina (gene constitutivo).

Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR em *Aedes aegypti* em diferentes estágios de desenvolvimento.

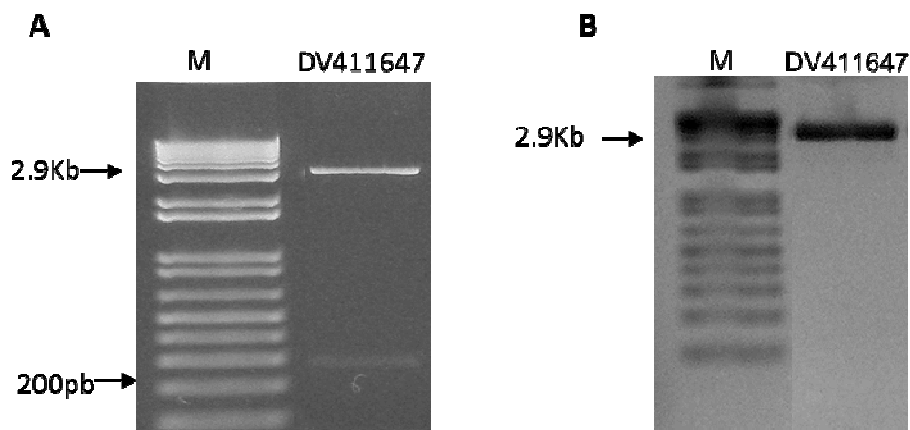


cDNA sintetizado a partir de mRNAs mosquitos durante o ciclo de vida foram submetidos à PCR para a amplificação dos transcritos dos genes DV411647 e actina (ACT). Os produtos da reação foram analisados na eletroforese e corados com brometo de etídeo. **L1-L4**: larvas de estágio 1-4; **Pbc**: pupa recém mudada; **PM**: pupa macho; **PF**: pupa fêmea; **M**: macho; **F**: fêmea adulta mantidos com sacarose 10%; **AS**: fêmeas adultas 24, 48, 72, 96 horas, 7 e 15 dias após a alimentação sanguínea; **AS_{Pgall}**: fêmeas adultas 24, 48, 72, 96 horas, 7 e 15 dias após a alimentação sanguínea infectada com *Plasmodium gallinaceum*.

Para quantificar o transcrito DV411647 em diferentes condições fisiológicas dos mosquitos, foram realizados experimentos de RT-PCR em tempo real. Diluições seriadas do plasmídeo contendo o inserto parcial de DV411647 (Cetoreductase) (160 pb) foram utilizadas para a obtenção de valores absolutos do número de cópias de RNA mensageiro das amostras analisadas. A curva padrão foi construída a partir da ligação do produto da amplificação do gene DV411647 em vetor de clonagem, conforme descrito em material e métodos 3.6.1, as sequências foram confirmadas por sequenciamento e depois linearizadas (Figura 33). As quantificações foram feitas em

triplicata. A especificidade da reação foi analisada através da curva de dissociação (melting curve).

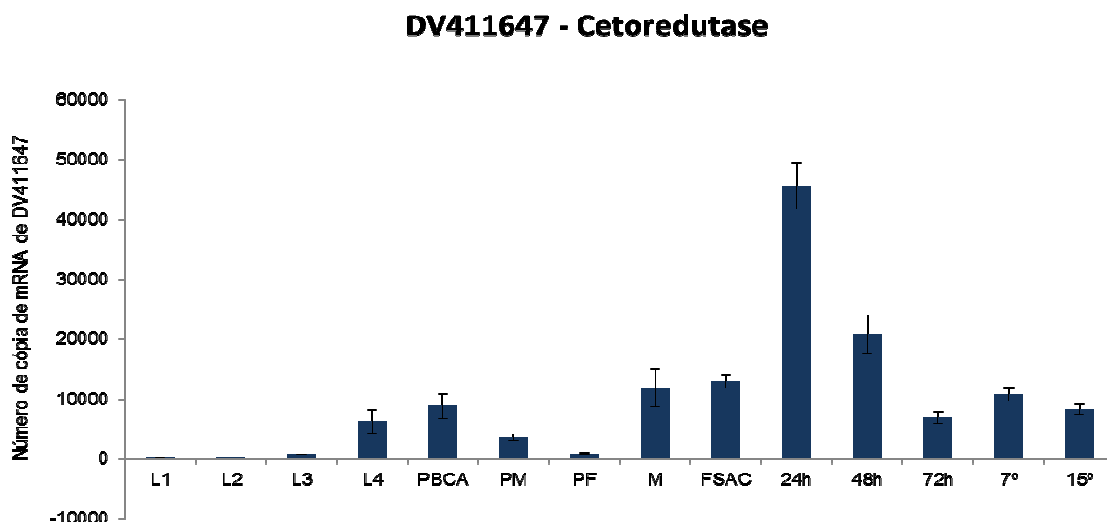
Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão de DNA do plasmídeo com inserto DV411647.



M: marcador de pares de bases (1 Kb plus, Invitrogen). **A-** DNA de plasmídeo submetido à digestão com enzima de restrição *Bgl*II. **B-** DNA de plasmídeo submetido à digestão com enzima de restrição *Xho*I..

Os resultados do perfil de transcrição do gene que codifica para a cetoreductase durante o ciclo de vida de *Aedes aegypti* mostram que nas larvas L1 e L2, praticamente os mRNAs não existem ou são muito pouco expressos. Nas larvas L3 e L4 o número de cópias dos mensageiros foi de 2648 cópias/indivíduo e 19.299 cópias/indivíduo, respectivamente. Nas pupas recém mudadas o número de mensageiro foi de 21.200 cópias/indivíduo, ocorrendo uma redução para 5006 cópias/indivíduo e 1744 cópias/indivíduo nas pupas machos e fêmeas. Nos mosquitos adultos o número de transcrito para cetoreductase é 31.503 cópias/indivíduo e 11.643 cópias/indivíduo em mosquitos machos e fêmeas mantidas em sacarose 10%. Entretanto, podemos notar um aumento expressivo nas fêmeas 24 horas após a alimentação sanguínea (39.454 cópias/indivíduo), uma ligeira diminuição nas fêmeas 48 horas após o repasto sanguíneo (31.352 cópias/indivíduo), e voltando para os níveis iniciais de acúmulo desse mensageiro, ou seja, antes da alimentação sanguínea, nos pontos 72 horas, 7 e 15 dias após o repasto.

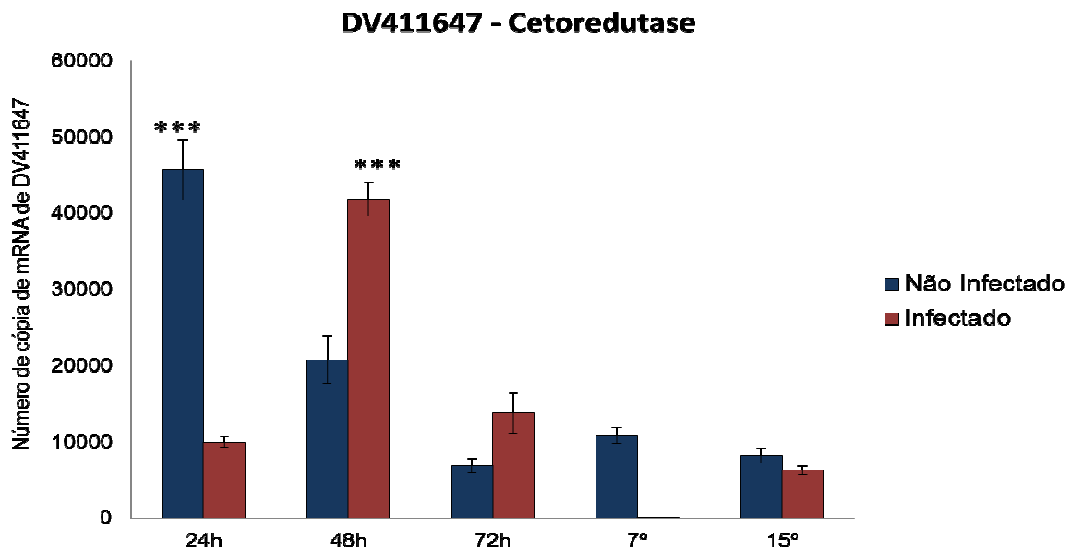
Figura 34 – Análise do perfil de RNAs de DV411647 durante o ciclo de vida de *Aedes aegypti*.



Foram utilizadas amostras de cDNA de larvas, pupas, e mosquitos adultos como molde das qRT-PCR. **L1-L4**: larvas de estágio 1-4; **PBCA**: pupa recém mudada; **PM**: pupa macho; **PF**: pupa fêmea; **M**: macho adulto; **FSAC**: fêmeas adultas mantidas com sacarose 10%; **24h-15d**: fêmeas adultas de 24 horas a 15 dias após a ingestão sanguínea. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. O número de cópias de mRNA é dado por indivíduo.

Nos experimentos comparativos entre fêmeas alimentadas com sangue de pintainhos saudáveis ou sangue infectado por *Plasmodium gallinaceum* (figura 35), os resultados mostraram que 24 horas após o repasto sanguíneo houve uma redução de 4,58 vezes no número de transcritos nas fêmeas infectadas em relação às não infectadas (45.667 cópias/indivíduo, 9950 cópias/indivíduo respectivamente). Por outro lado, 48 horas após a infecção houve uma inversão no acúmulo do transcrito do gene que codifica a cetoreductase (20.779 cópias/indivíduo e 41.822 cópias/indivíduo). 72 horas, 7 e 15 dias após a infecção não ocorreram modificações significativas (6898 cópias/indivíduo, 13.793 cópias/indivíduo, 10.851 cópias/indivíduo, 120 cópias/indivíduo, 8187 cópias/indivíduo e 6308 cópias/indivíduo). É interessante notar que a deslocação do pico de expressão dessa proteína segue o mesmo tipo de modificação da expressão de vitelogenina e outras proteínas formadoras de vitelo (Araujo et al., 2011). Talvez o sistema de regulação da expressão gênica dessas proteínas seja o mesmo, e, portanto na presença do parasita a sinalização seja a mesma.

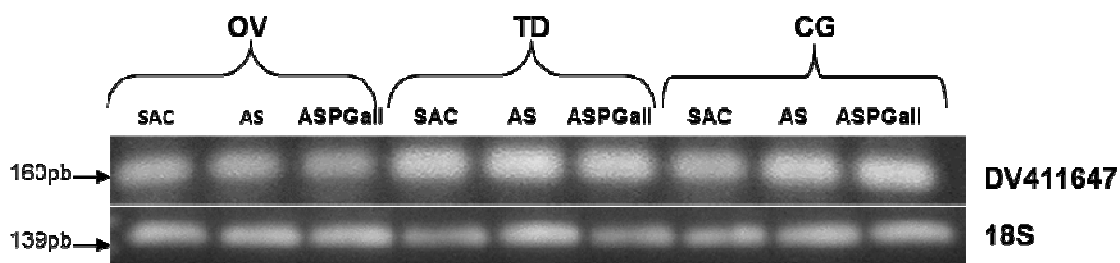
Figura 35 – Análise comparativa do perfil de mRNAs de DV411647 durante a infecção por *Plasmodium gallinaceum* em fêmeas de *Aedes aegypti*.



Foram utilizadas amostras de cDNA de fêmeas adultas infectadas (barras vermelhas) ou não (barras azuis) por *P.gallinaceum* como molde das qRT-PCR. **24h-15d**: fêmeas adultas de 24 horas a 15 dias após a ingestão sanguínea. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. O número de cópias de mRNA é dado por indivíduo. Os dados representam valores médios e as barras de erros indicam o desvio padrão. A análise estatística foi realizada através dos testes t (Student) e ANOVA. ***: $p < 0,001$.

Para caracterizarmos o perfil espacial da transcrição de DV411647, foi realizado RT-PCR em tempo real utilizando tecidos específicos, de acordo com o descrito para os genes anteriores. Foi feito o RT-PCR semi-quantitativo para validarmos a qualidade das amostras. Os resultados apresentados na figura 36 mostraram a integridade das amostras do gene DV411647 (Cetoreductase) que está presente nas células do corpo gorduroso, ovários e trato digestivo, tanto de fêmeas 24 horas após repasto sanguíneo, como também em fêmeas mantidas com solução de sacarose 10%. Como controle do experimento foi realizado RT-PCR com iniciadores para o transcrito 18S ribossômico (gene constitutivo).

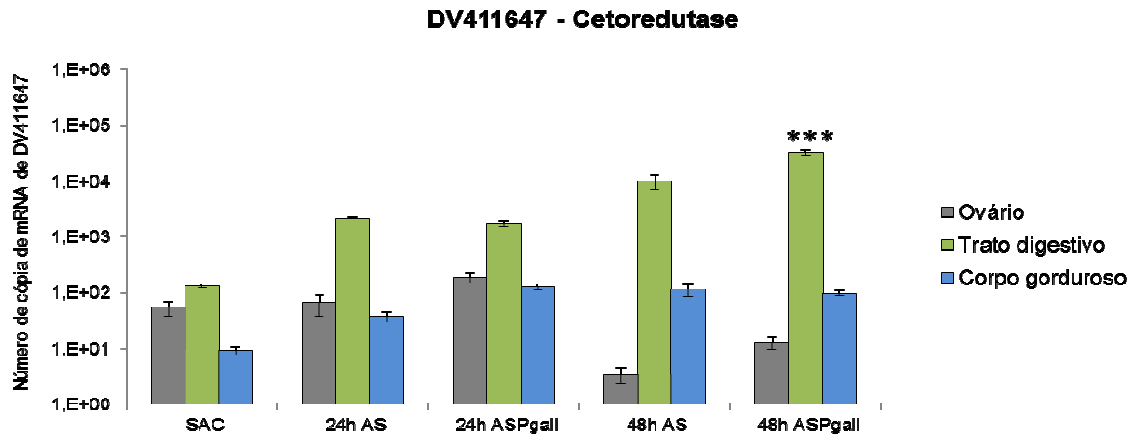
Figura 36 – Perfil espacial de transcrição do gene DV411647 durante a infecção por *P. gallinaceum* em fêmeas de *Aedes aegypti*.



Os tecidos foram dissecados em fêmeas mantidas em sacarose e 24 horas após o repasto sanguíneo. **Ov**: ovário; **TD**: trato digestivo; **CG**: corpo gorduroso; **SAC**: fêmea adulta mantida com sacarose 10%; **AS**: 24 horas após alimentação sanguínea; **ASPGall**: 24 horas após a ingestão sanguínea infectada com *P. gallinaceum*. Cada cDNA foi testado anteriormente por ausência de gDNA contaminante (dados não mostrados).

Nos ensaios de qRT-PCR espacial, o transcrito DV411647 (Cetoreductase) apresentou um aumento significativo no nível de expressão no trato digestivo de fêmeas 48 horas após repasto sanguíneo infectado (Figura 37). Embora este contig seja proveniente de biblioteca de *Aedes aegypti* infectado por vírus dengue (Tabela 3), esse resultado mostrou-se muito interessante, uma vez que, estávamos buscando genes expressos diferencialmente durante a infecção. Adicionar a descrição com o 32.033 cópias/indivíduo.

Figura 37 – Perfil espacial de transcrição do gene que codifica para Cetoreductase durante a infecção por *P. gallineum* em fêmeas de *Aedes aegypti*.



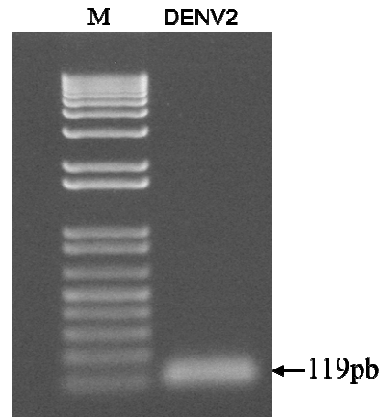
Os tecidos foram dissecados em fêmeas mantidas em sacarose e 24 e 48 horas após o repasto sanguíneo sadio ou infectado por *P. gallineum*. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. **SAC**: fêmeas adultas mantidas com solução de sacarose 10%; **AS**: 24 horas após alimentação sanguínea; **ASPgall**: 24 horas após a ingestão sanguínea infectada com *P. gallineum*. *** $P < 0.001$. Para as análises estatísticas foram utilizados o teste t (Student) e ANOVA.

4.4.2 Caracterização do transcrito DV411647 em *Aedes aegypti* infectado por dengue tipo 2

Na busca da comparação dos níveis de expressão diferencial durante a infecção, mosquitos *Aedes aegypti* foram infectados por partículas virais de dengue sorotipo 2. A figura 38 mostra uma PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o RNA do vírus dengue, como descrito em Materiais e Métodos (item 3.1.4.1), nas culturas celulares de C6/36.

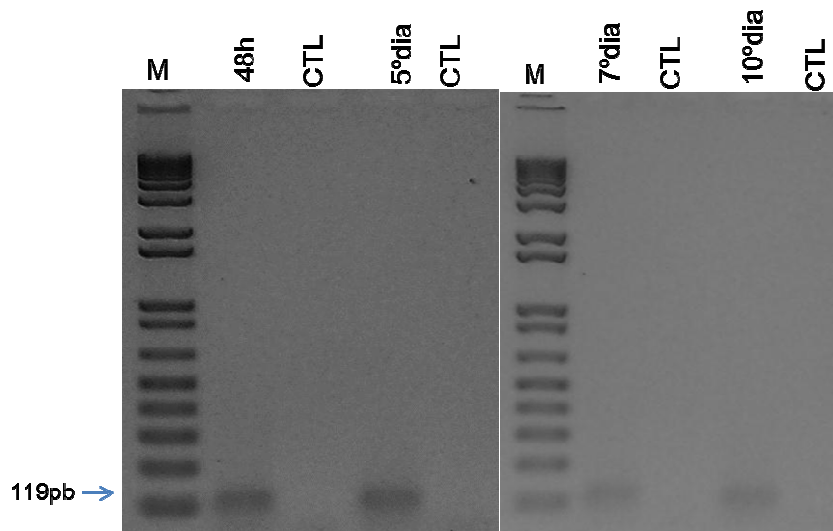
Na figura 39, foram realizadas as PCRs com RNA de mosquitos 48 horas, 5, 7 e 10 dias após a infecção do vírus dengue sorotipo 2. Esses experimentos são utilizados para o controle da infecção e garantir que a amplificação é realmente das partículas virais que estão presentes no mosquito e não presentes no sangue infectado que acabou de ser ingerido.

Figura 38 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR e PCR Nested em cultura celular.



RT-PCR e PCR Nested em cultura celular de *Aedes albopictus* (C6/36) no 7º dia após a inoculação por vírus dengue sorotipo 2. **M**: marcador molecular; **DENV2**: cultura viral dengue tipo 2.

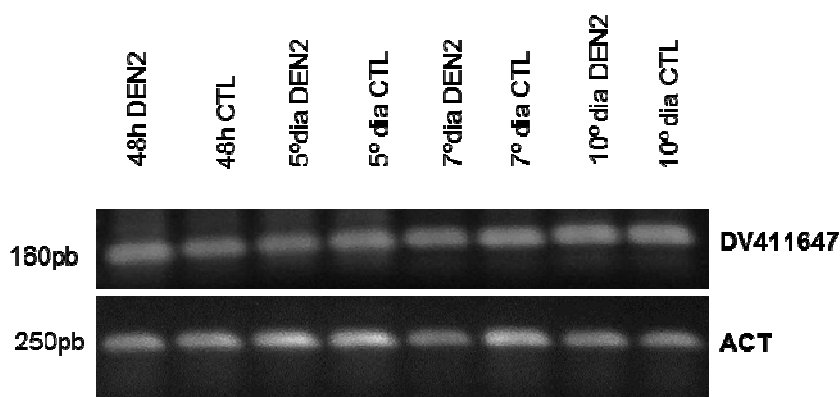
Figura 39 – PCR diagnóstico. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas e não infectadas por vírus dengue tipo 2.



M: marcador molecular; **48h-5º dia**: fêmeas após alimentação sanguínea artificial com sangue de camundongo infectado por dengue tipo 2; **CTL**: fêmeas após alimentação sanguínea artificial com sangue de camundongo não infectado; **7-10º dia**: fêmeas após alimentação sanguínea artificial com sangue de camundongo infectado por dengue tipo 2.

A análise do transcrito do gene DV411647 que codifica para a cetoreductase, foi realizada utilizando RT-PCR (figura 40) e qRT-PCR (figura 41). Os mosquitos foram alimentados em alimentador artificial utilizando-se sangue de camundongos sadios ou adicionado de partículas virais dengue sorotipo 2, como descrito em Materiais e Metodos (item 3.1.4.2). As RT-PCR semi-quantitativo foram realizadas para a validação da qualidade das amostras (Figura 40). Para o controle do experimento foi realizado RT-PCR com iniciadores para o transcrito actina (gene constitutivo).

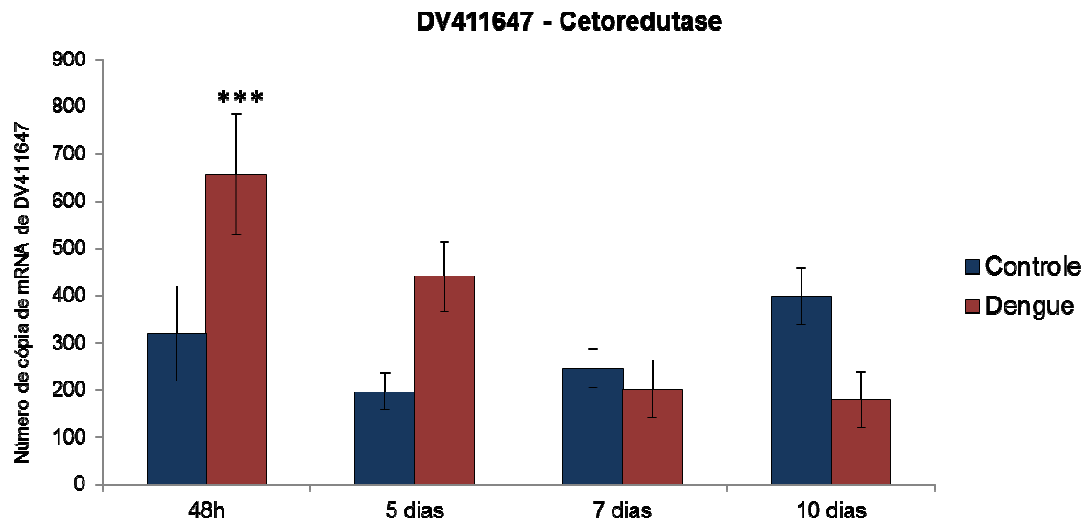
Figura 40 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da RT-PCR de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas e não infectadas por vírus dengue tipo 2.



48h-10º dia DEN2: fêmeas após alimentação sanguínea artificial com sangue de camundongo infectado por dengue tipo 2; **48h-10º dia CTL:** fêmeas após alimentação sanguínea artificial com sangue de camundongo não infectado.

Os resultados da quantificação dos transcritos do gene que codifica a cetoreductase durante a infecção por vírus dengue, mostraram que 48 horas após a infecção ocorreu um aumento significativo nos transcritos desse gene em comparação aos mosquitos sadios (656 cópias/indivíduo e 318 cópias/indivíduo). O perfil de transcrição para os mosquitos 5, 7 e 10 dias não mostrou diferenças significativas de cópias dos mRNAs do gene que codifica a cetoreductase (439 cópias/indivíduo, 196 cópias/indivíduo, 202 cópias/indivíduo, 246 cópias/indivíduo, 179 cópias/indivíduo e 398 cópias/indivíduo).

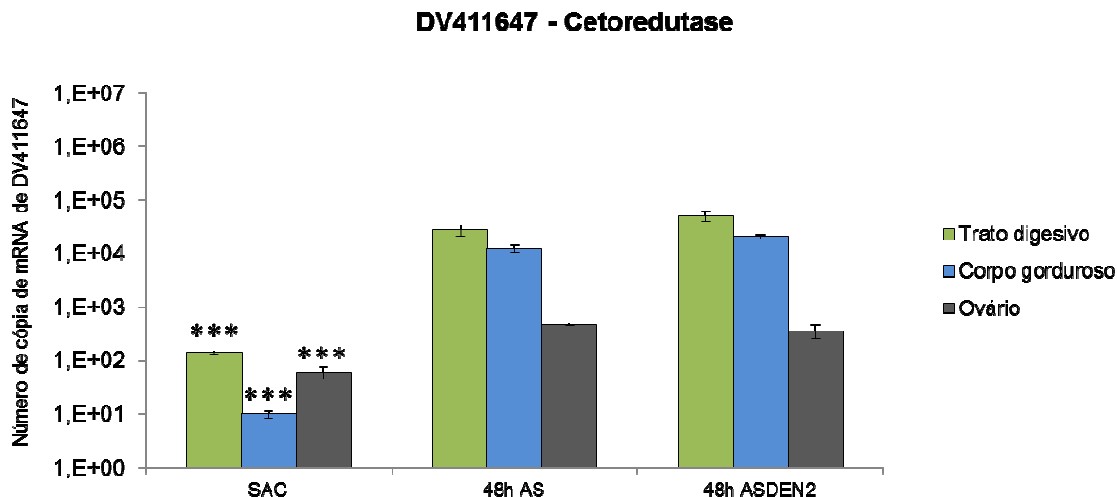
Figura 41 – Análise comparativa do perfil de mRNAs de DV411647 durante a infecção por vírus dengue sorotipo 2 em fêmeas de *Aedes aegypti*.



Foram utilizadas amostras de cDNA de fêmeas adultas infectadas (barras vermelhas) ou não (barras azuis) por *vírus dengue sorotipo 2* como molde das qRT-PCR. **48h a 10 dias**: fêmeas adultas de 48 horas a 10 dias após a ingestão sanguínea. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. O número de cópias de mRNA é dado por indivíduo. Os dados representam valores médios e as barras de erros indicam o desvio padrão. A análise estatística foi realizada através dos testes t (Student) e ANOVA. ***: $p < 0,001$.

Nos experimentos de qRT-PCR utilizando os tecidos como amostra, o transcrito DV411647 (Cetoreductase) apresentou um perfil muito semelhante ao determinado na infecção dos mosquitos por *Plasmodium gallinaceum*. Um aumento significativo no nível de expressão no trato digestivo de fêmeas 48 horas após repasto sanguíneo infectado por vírus dengue 2 (27.469 copias/indivíduo, 49.881 copias/indivíduo (Figura 42) em relação as fêmeas alimentadas com sangue não infectado. O resultado obtido foi compatível com o resultado apresentado na infecção por *P. gallinaceum*, o que é muito interessante, pois indica que esse gene, de acordo com as bases de dados, tem um nível de transcrição aumentado na infecção. Porém nas nossas análises, isso ocorre não somente na infecção por vírus dengue, como está anotado no banco de dados, mas também por *P. gallinaceum*.

Figura 42 – Perfil espacial de transcrição do gene que codifica para Cetoreductase durante a infecção por vírus dengue em fêmeas de *Aedes aegypti*.



Os tecidos foram dissecados em fêmeas mantidas em sacarose e 24 horas após o repasto sanguíneo sadio ou infectado por vírus dengue. Cada coluna representa as medidas de expressão com desvio padrão médio de três experimentos independentes. **SAC**: fêmeas adultas mantidas com solução de sacarose 10%; **AS**: 48 horas após alimentação sanguínea; **ASDEN2**: 48 horas após a ingestão sanguínea infectada com vírus dengue. *** $P < 0.001$. Para as análises estatísticas foram utilizados o teste t (Student) e ANOVA.

4.5 Expressão de proteína recombinante codificada pelo gene DV411647

Com o objetivo de confirmar se o transcrito do gene DV411647 é realmente traduzido e gera uma proteína detectável em extratos de intestinos médios, inicialmente foram realizados experimentos para obtenção da proteína recombinante e conseqüentemente produção de anti-soro policlonal contra esta proteína.

Para isso, o fragmento de cDNA parcial de DV411647 previamente clonado em vetor pCR[®] 2.1, foi subclonado em vetor de expressão pGEX – 2T (Material e Métodos, item 3.11). A construção final foi sequenciada e a fase aberta de leitura foi confirmada por tradução teórica da seqüência obtida.

Ao ser introduzido, este vetor de expressão com o fragmento subclonado gera uma proteína recombinante fusionada à GST (ceto-GST) de massa molecular

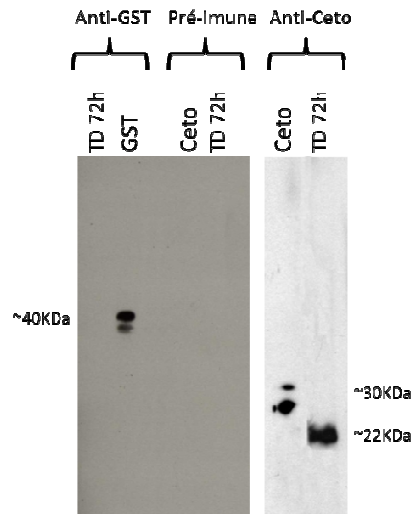
estimada de 31 kDa, sendo 26 kDa correspondente à GST e 5 kDa à proteína traduzida pelo cDNA parcial de DV411647.

A construção finalizada foi transformada em bactérias da cepa BL21(DE3)pLysS e a proteína recombinante foi expressa e purificada de acordo com Material e Métodos (item 3.11). Após a purificação, a proteína recombinante foi injetada em camundongos para a obtenção dos anticorpos policlonais (Material e Métodos, item 3.15.1.4).

Extratos protéicos de trato digestivo de fêmeas de *Aedes aegypti* 72 horas após o repasto sanguíneo (TD), assim como a proteína recombinante purificada (ceto-GST) foram submetidas a eletroforese na presença de SDS, como descrito em Material e Métodos (item 3.15.1.6). Após a eletroforese, os polipeptídeos foram transferidos para membranas de nitrocelulose e incubadas com anti-soros policlonais. Para o controle dos experimentos foi utilizada uma proteína recombinante (GST-RvMSP1.19), a qual reage positivamente ao anticorpo contra GST. Essa proteína assim como o anticorpo policlonal anti- α -GST foram doadas pelo Prof. Dr. Gerhard Wunderlich do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

A figura 43 mostra que o anticorpo anti- α -GST reconhece as proteínas recombinantes GST-RvMSP 1.19 assim como a ceto-GST. Na membrana incubada com o soro-pre-imune, nenhum polipeptídeo foi detectado, entretanto nas amostras incubadas com o anti-Ceto, tanto a proteína recombinante ceto-GST assim como a proteína cetoreductase de tratos digestivos (TD) foram detectadas. Esses resultados mostram ainda que o polipeptídeo da cetoreductase de tratos digestivos tem a massa molecular aproximada de 22 kDa, sendo que a partir dos aminoácidos deduzidos do cDNA a massa molecular prevista seria em torno de 15kDa. A diferença encontrada pode ser devido à fosforilações e açúcares presentes após processamento pós traducional.

Figura 43 – Western Blot referente a expressão da proteína recombinante cetoreductase fusionada à GST



As proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a membrana foi submetida à técnica de Western blot. **Soro Anti-GST**: uma banda imunorreativa em torno de 40kDa foi detectada em GST, confirmando a expressão da proteína GST-PvMSP1.19 (controle positivo); utilizando o mesmo soro, o teste com extrato de trato digestivo 72h após a alimentação sanguínea infectada por vírus dengue tipo 2 não apresentou banda imunorreativa (controle negativo); **Soro Pré-imune** foi usado como controle negativo para a proteína recombinante DV411647 e também para a proteína de trato digestivo de mosquito 72h após alimentação sanguínea infectada por vírus dengue tipo 2; **Soro Anti-Ceto**: uma banda imunorreativa em torno de 30kDa foi detectada em Ceto (cDNA parcial de DV411647 fusionado a GST), confirmando a expressão da proteína recombinante (controle positivo); Uma banda imunorreativa em torno de 22kDa foi detectada em extrato de trato digestivo 72 horas após alimentação sanguínea infectada por vírus dengue tipo 2, confirmando a expressão da proteína Cetoreductase em trato digestivo 72 horas após a alimentação sanguínea infectada.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo a caracterização da expressão gênica diferencial dos genes DV431431, DV340891 e DV411647 em *Aedes aegypti* durante a infecção por vírus dengue ou *Plasmodium gallinaceum*. Além disso, nos propusemos a confirmar a anotação automática, que é baseada no número de vezes que os transcritos aparecem nas bibliotecas indicando a possível função/expressão dos transcritos desconhecidos.

Os resultados obtidos permitem concluir que:

Transcrito DV431431

- Esse transcrito tem um domínio conservado de RNaseH, podendo ter um papel na replicação e/ou reparação do híbrido RNA/DNA.
- O número de cópias desse transcrito nos tórax de machos é 4,05 vezes maior do que o número de cópias das fêmeas mantidas em solução de sacarose 10%.
- 24 horas após a infecção por *Plasmodium gallinaceum* a expressão gênica foi reprimida, entretanto não ocorreu nenhuma modificação significativa nos outros tempos estudados.
- A expressão gênica nos tecidos estudados mostrou-se reprimida nos ovários e trato digestivo de fêmeas infectadas por *P. gallinaceum*, já no corpo gorduroso, foi notado um aumento no número de cópias de RNA em fêmeas infectadas por *P. gallinaceum*. Porém, tanto a queda quanto o aumento da transcrição de RNA não apresentou significância estatística.

Transcrito DV340891

- Na análise do ciclo de vida do *Aedes aegypti*, esse transcrito apresentou um acúmulo de 1269 cópias/indivíduo em fêmeas 48 horas após a alimentação sanguínea sem infecção.
- Em relação à quantidade dos mRNAs do gene DV340891 durante a infecção por *Plasmodium gallinaceum*, ocorre uma redução significativa na quantidade de mRNA 48 horas após o repasto sanguíneo infectado, de 1269 cópias/indivíduo nas fêmeas sadias para 521 cópias/indivíduo nas fêmeas infectadas. Enquanto nas outras amostras, as quantidades de mRNA do transcrito do gene DV340891, não foi modificada significativamente, mantendo o perfil de transcrição igual ou semelhante ao encontrado para os mosquitos não infectados.
- Nos tecidos, a expressão dos mRNAs do gene DV340891 é praticamente específica nos trato digestivos. Com significativa redução do número de cópias nos trato digestivos infectados quando comparado aos mosquitos não infectados. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos na quantificação dos mosquitos infectados.

Transcrito DV411647

- Nossos resultados mostraram que no ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*, esse transcrito sofre um aumento expressivo nas fêmeas 24 horas após a alimentação sanguínea não infectada, seguido de uma ligeira diminuição nas fêmeas 48 horas nas mesmas condições.
- Nos experimentos comparativos entre fêmeas alimentadas com sangue de pintainhos sadios ou sangue infectados por *Plasmodium gallinaceum*, os resultados mostraram que 24 horas após o repasto sanguíneo houve uma redução no número de transcritos nas fêmeas infectadas em relação as não infectadas. Enquanto em fêmeas 48 horas após a infecção houve um

acúmulo do transcrito do gene que codifica a cetoreductase em fêmeas infectadas quando comparadas as não infectadas.

- Nos ensaios de qRT-PCR espacial, o transcrito DV411647 apresentou um aumento significativo no nível de expressão no trato digestivo de fêmeas 48 horas após repasto sanguíneo infectado.

As análises in silico para a seleção de genes candidatos a caracterização e confirmação da anotação predita, se mostrou uma ferramenta bastante útil. Nesse projeto pudemos confirmar a expressão diferencial dos três genes selecionados para o estudo.

REFERÊNCIAS

AHMED, A. M.; MAINGON, R.; ROMANS, P.; HURD, H. Effects of malaria infection on vitellogenesis in *Anopheles gambiae* during two gonotrophic cycles. **Insect. Mol. Biol.**, v. 10, n.4, p. 347-356, 2001.

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

ARAUJO, R. V.; MACIEL, C.; HARTFELDER, K.; CAPURRO, M. L. Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. **J. Insect. Physiol.**, v. 57, n. 2, p. 265-273, 2011.

BIRON, D. G.; AGNEW, P.; MARCHE, L.; RENAULT, L.; SIDOBRE, C.; MICHALAKIS, Y. Proteome of *Aedes aegypti* larvae in response to infection by the intracellular parasite *Vavraia culicis*. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 13, p. 1385-1397, 2005.

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

BRENNAN, J. D.; KENT, M.; DHAR, R.; FUJIOKA, H.; KUMAR, N. *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, p. 25-64, 2000.

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

CERRITELLI, S. M.; CROUCH, R. J. Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. **FEBS J.**, v. 276, n. 6, p. 1494-1505, 2009.

CHEN, G. Y., MURAMATSU, H.; ICHIHARA - TANAKA, K.; MURAMATSU, T. Expression profile of mouse BWF1, a protein with a BEACH domain, WD40 domain and FYVE domain. **Cell. Struct. Funct.**, v.29, n. 2, p. 35-42, 2004.

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

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

DE FIGUEIREDO, M. L.; GOMES, C. A.; AMARILLA, A. A.; LEANDRO, S. A.; ORRICO, S. A.; ARAUJO, R. F.; CASTRO, J. S. M.; DURIGON, E. L. AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Viol. J.**, v.7, p. 152, 2010.

DIMOPOULOS, G.; SEELEY, D.; WOLF, A.; KAFATOS, F. C. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. **Embo J.**, v.17, n. 21, p. 6115-6123, 1998.

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

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

FRANCO, O. A erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. *Ver, Bras. Mal. Doenças Trop.*, v.13, p. 43-48, 1961.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the insects**. New York: Cambridge University Press, 2005. 772 p.

GUPTA, L.; MOLINA-CRUZ, A.; KUMAR, S.; RODRIGUES, J.; DIXIT, R.; ZAMORA, E. R.; BARILLAS-MURY, C. *Cell. Host. Microbe*, v.5, n. 5, p. 498-507, 2009.

HACKER, C. S. The differential effect of *Plasmodium gallinaceum* on the fecundity of several strains of *Aedes aegypti*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 18, n. 3, p. 373-377, 1971.

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

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1988. 726 p.

HOGG, J. C.; HURD, H. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae* s. l. in north east Tanzania. **Parasitology**, v.114, n. 4, p. 325-331, 1997.

JAMES, A. A. Engineering mosquito resistance to malaria parasites: the avian malaria model. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 10, p.1317-1323, 2002.

KALLBERG, Y.; OPPERMANN, U.; JORNVALL, H.; PERSSON, B. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). **Eur. J. Biochem.**, v. 269, n. 18, p. 4409-4417, 2002.

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

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

LAWSON, D.; BESANSKY, N. J.; BRUGGNER, R. V.; BUTLER, R.; CAMPBELL, K. S.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRISTLEY, S.; DIALYNAS, E.; EMMERT, D.; HAMMOND, M.; HILL, C. A.; KENNEDY, R. C.; LOBO, N. F.; MACCALLUM, M. R.; MADEY, G.; MEGY, K.; REDMOND, S.; RUSSO, S.; SEVERSON, D. W.; STINSON, E. O.; TOPALIS, P.; ZDOBNOV, E. M.; BIRNEY, E.; GELBART, W. M.; KAFATOS, F. C.; LOUIS, C.; COLLINS, F. H. VectorBase: a data resource for invertebrate vector genomics. **Nucleic Acids. Res.**, v. 37, p. D583-D587, 2009.

LEE, Y.; TSAI, J.; SUNKARA, S.; KARAMYCHEVA, S.; PERTEA, G.; SULTANA, R.; ANTONESCU, V.; CHAN, A.; CHEUNG, F.; QUACKENBUSH, J. The TIGR Gene Indices: clustering and assembling EST and known genes and integration with eukaryotic genomes. **Nucleic Acids. Res.**, v. 33, p. D71-D74, 2005.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 432 p.

MARSHALL, J. M.; TAYLOR, C. E. Malaria control with transgenic mosquitoes. **PLoS Med.**, v. 6, p. 2-20, 2009.

NAGAO, E.; ARIE, T.; DORWARD, D. W.; FAIRHURST, R. M.; DVORAK, J. A. The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte. **J. Struct. Biol.**, v. 162, n. 3, p. 460-467, 2008.

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

PERSSON, B.; KALLBERG, Y.; OPPERMANN, U.; JORNVALL, V. Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). **Chem. Biol. Interact.**, v. 143-144, p. 271-278, 2003.

PLATT, K. B.; LINTHICUM, K. J.; MYINT, K. S. Impct of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, n. 2, p. 119-125, 1997.

PUTNAM, J. L.; SCOTT, T. W. Blood-feeding behavior of dengue - 2 virus - infected *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 3, p. 225-227, 1995.

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

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

RAIKHEL, A. S.; KOKOZA, V. A.; ZHU, J. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studeis to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 10, p. 1275-1286, 2002.

RICHMAN, A. M.; DIMOPOULOS, G.; SEELEY, D.; KAFATOS, F. C. Plasmodium activates the innate immune response of Anopheles gambiae mosquitoes. **EMBO J.**, v. 16, n. 20, p. 6114-6119, 1997.

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

RUPPERT, E. E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Ed. Roca. 1996. 1028 p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2 v.

SANCHEZ- VARGAS, I.; SCOTT, J. C.; POOLE-SMITH, B. K.; FRANZ, A. W.; BARBOSA- SOLOMIEU, V.; WILUSZ, J.; OLSON, K. E.; BLAIR, C. D. Dengue virus type 2 infections of Aedes aegypti are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. **PLoS Pathog.**, v.5, n. 2, p. e1000299, 2009.

SANDERS, H. R.; EVANS, A. M. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, Aedes aegypti. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 33, n. 11, p. 1105-1122, 2003.

SCAFF, L. M.; GALVÃO, S. S., a REINFESTAÇÃO DO Pará pelo *Aedes aegypti*. Situação atual. **Rev. Bras. Mal. Doenças Trop.** v. 21, n. 3, p. 615-626, 1968.

SIM, S.; DIMOPOULOS, G. Dengue virus inhibits immune responses in Aedes aegypti cells. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p.10678, 2010.

SOUZA-NETO, J. A.; SIM, S.; DIMOPOLUS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.106, n. 42, p.17841-17846, 2009.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saude Publica**, v. 17 (Supl.), p. 99-102, 2001.

TU, W. C.; CHEN, C. C.; HOU, R. F. Ultrastructural studies on the reproductive system of male Aedes aegypti(Diptera: Culicidae) infected with dengue 2 virus. **J. Med. Entomol.**, v. 35, n. 1, p. 71-76, 1998.

TZOU, P.; REICHHART, J. M.; LEMAITRE, B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, n. 4, p. 2152-2157, 2002.

VILELA, A. P.; FIGUEIREDO, L. B.; DOS SANTOS, J. R.; EIRAS, A. E.; BONJARDIM, C. A.; FERREIRA, P. C.; KROON, E. G. L. B. Dengue virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, n. 6, p. 989-992, 2010.

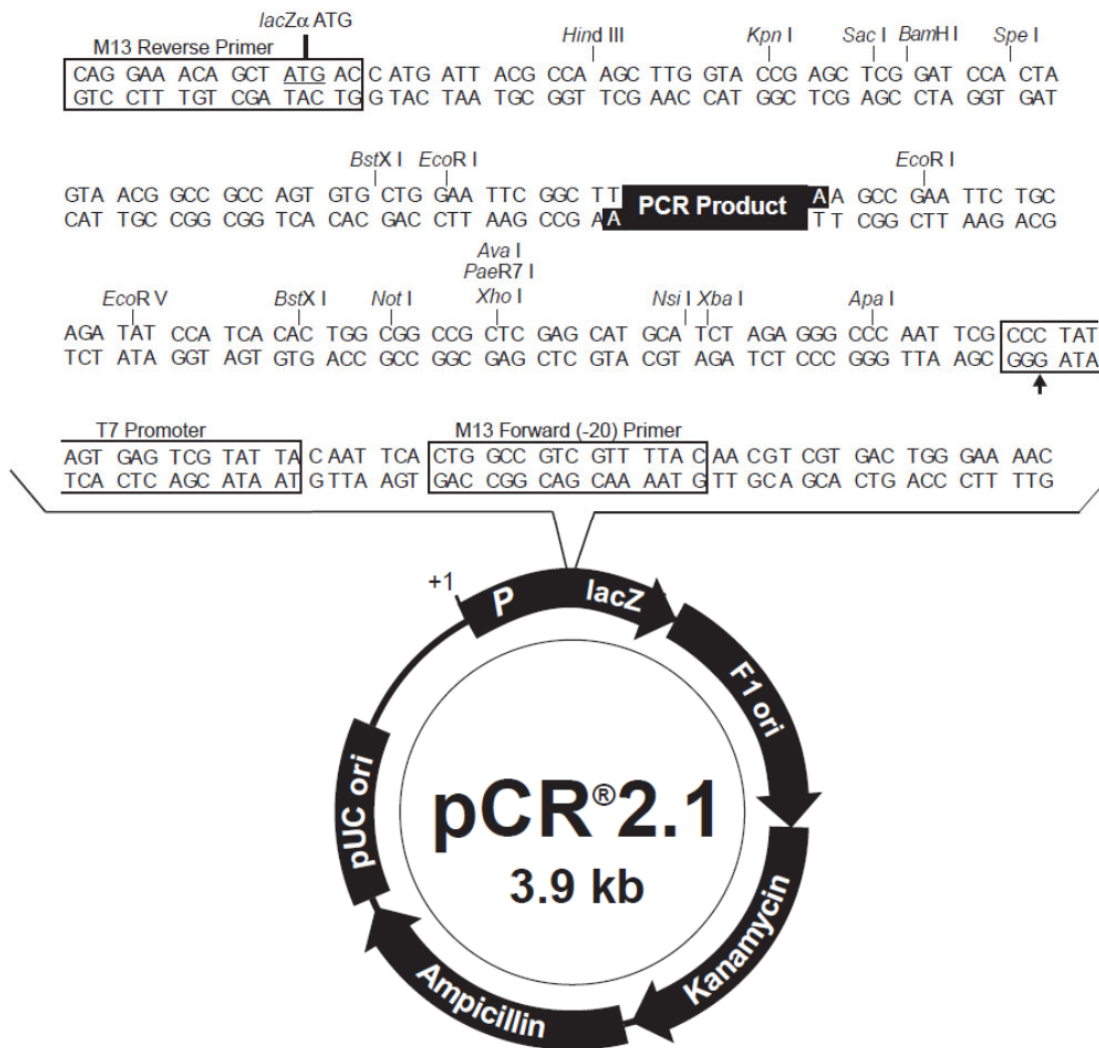
WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria report. Geneva: WHO Press, 2009. 163 p.

XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathog.**, v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008.

XU, X.; DONG, Y.; ABRAHAM, E. G.; KOCAN, A.; SRINIVASAN, P.; GHOSH, A. K.; SINDEN, R. E.; RIBEIRO, J. M.; JACOBS-LORENA, M.; KAFATOS, F. C.; DIMOPOULOS, G. Transcriptome analysis of *Anopheles stephensi*-*Plasmodium berghei* interactions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 142, n. 1, p. 76-87, 2005.

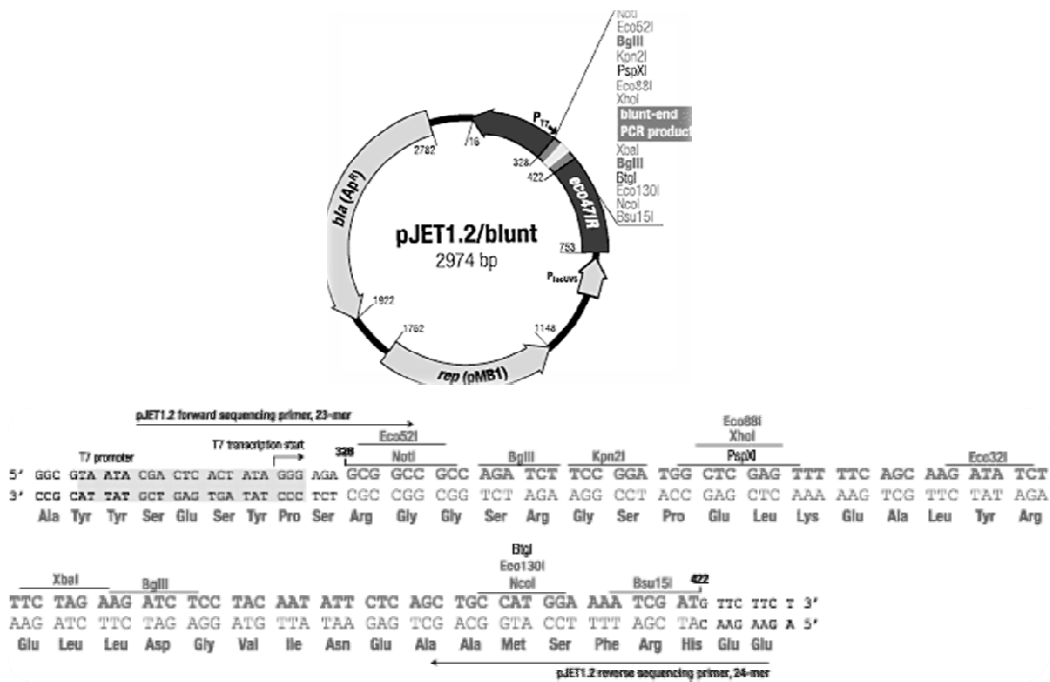
ANEXOS

Anexo A – Mapa do vetor de clonagem comercial pCR® 2.1 e sequências nucleotídicas adjacentes ao sítio de clonagem.



O vetor possui genes que conferem resistência aos antibióticos Ampicilina (*Ampicillin*) e Canamicina (*Kanamycin*). A região indicada por *lacZ* corresponde à fase aberta de leitura que codifica para a proteína repórter β-galactosidase. O local de inserção para clonagem de fragmentos de DNA está indicado por *PCR Product*.
 FONTE – Modificado de TA Cloning® kit User Manual (Invitrogen), 2004.

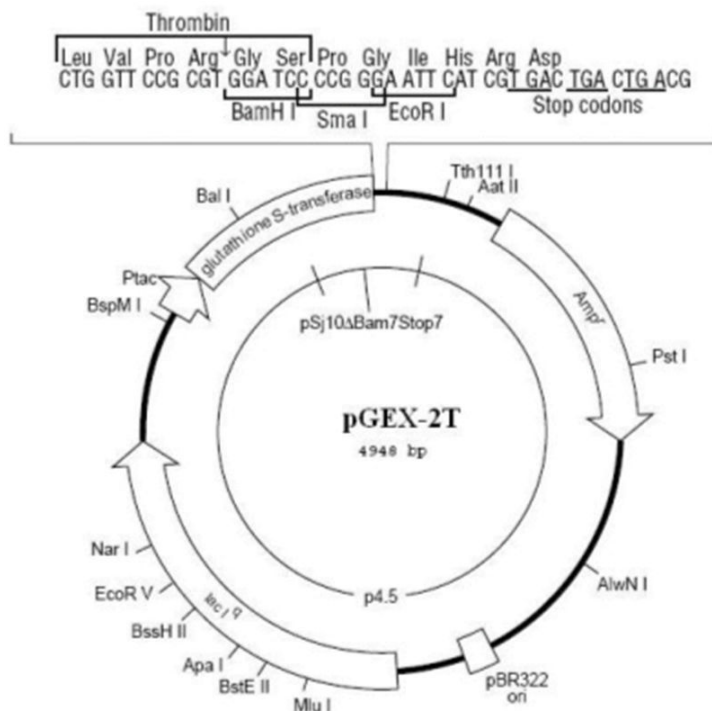
Anexo B – Mapa do vetor de clonagem comercial pjet1.2, indicando sítio múltiplo de clonagem e sequências adjacentes ao sítio de clonagem.



O vetor possui genes que conferem resistência aos antibióticos Ampicilina (*bla Ap^R*). A região indicada por *eco471R* corresponde à fase aberta de leitura que codifica para gene letal que permite seleção positiva dos recombinantes (com inserto). O local de inserção para clonagem de fragmentos de DNA está indicado por *blunt-end PR product*, flanqueado pelo sítio de múltipla clonagem.

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

Anexo C – Mapa do vetor de expressão comercial pGEX-2T, e sequências adjacentes ao sítio de clonagem.



O vetor possui genes que conferem resistência aos antibióticos Ampicilina (*Amp^r*). A região indicada por *lacI* corresponde à fase aberta de leitura codificante para a proteína repressora que se liga à região operadora do promotor *Ptac*, prevenindo a expressão da proteína glutatona S-transferase (*glutathione S-transferase*) sem indutor IPTG. O local de inserção para clonagem de fragmentos de DNA está apontado no mapa e evidenciado em destaque, através da exibição da sequência nucleotídica acima do esquema do vetor.

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