

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

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.

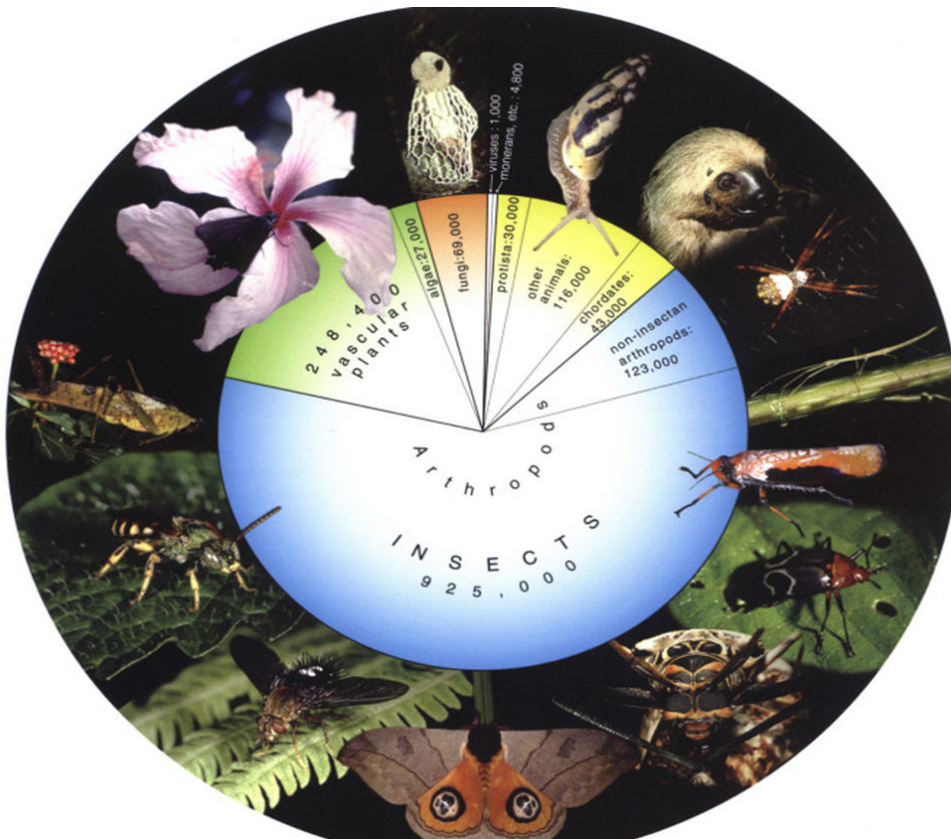
Key words: *Aedes aegypti*. Midgut. Gene expression. Dengue. *Plasmodium*

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.

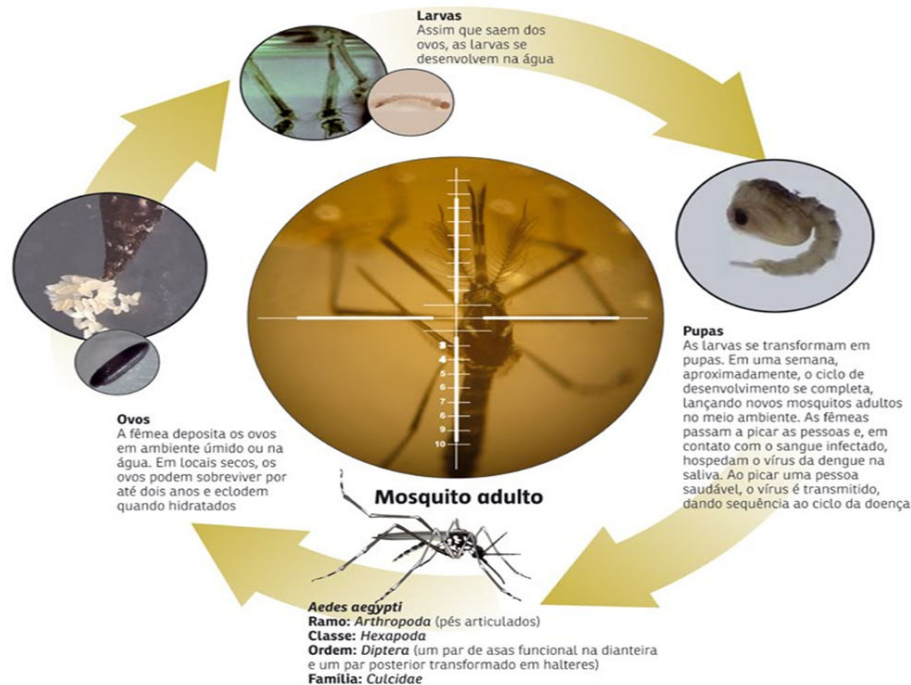


FONTE - © J-P. Hervy/ Orstoom

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,

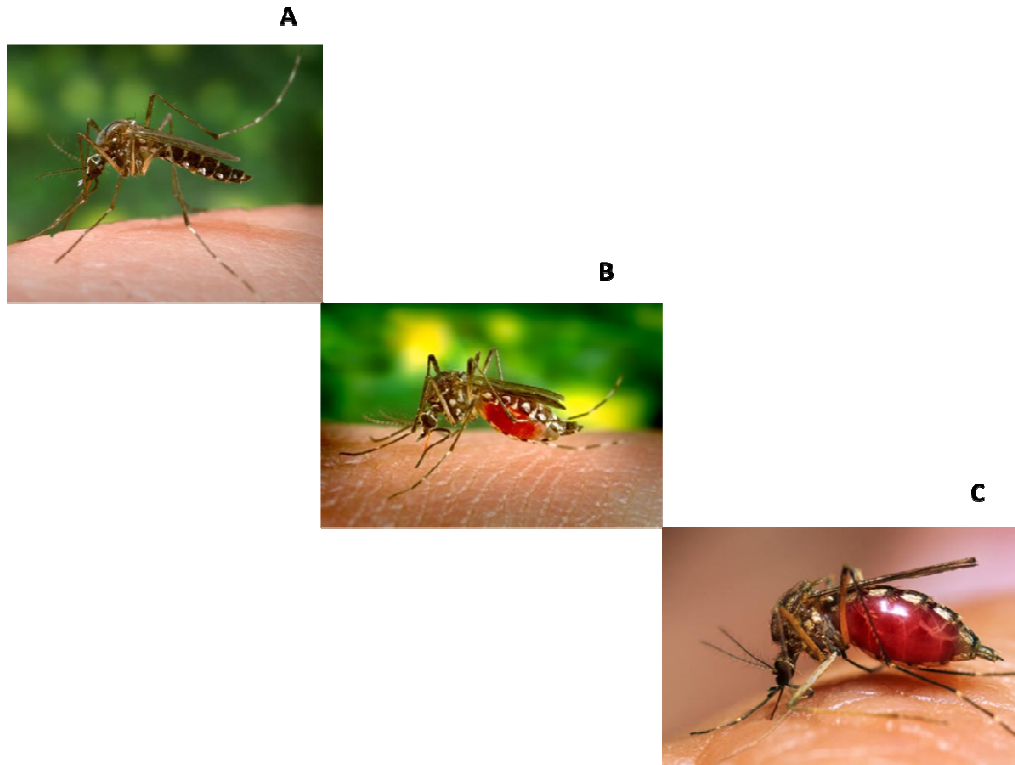
muitas vezes formando ornamentações relevantes à identificação e taxonomia. Na fase adulta, tanto os machos quanto as fêmeas alimentam-se de néctar, entretanto as fêmeas necessitam realizar repasto sanguíneo, o qual é necessário para a produção e maturação dos ovos. As fêmeas têm um tempo de vida de 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).

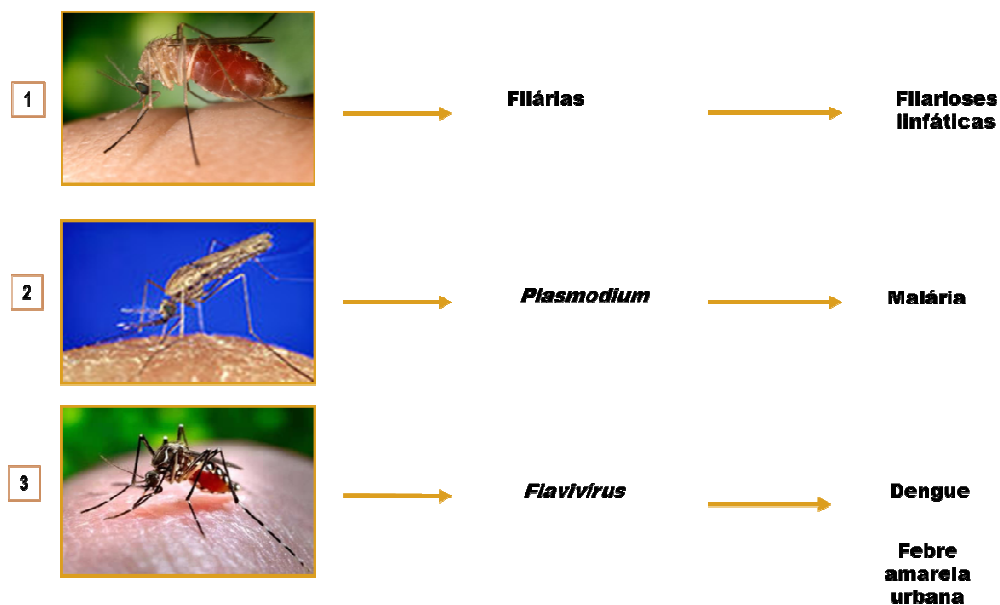
Figura 4 – Fêmea de *Aedes aegypti* durante e após o processo de hematofagia, com marcante alteração morfológica no abdômen.



(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 filariose 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 (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.

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.