

MARIA KARINA COSTA

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

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

Área de concentração: Biologia da relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimaraes

Versão original

São Paulo

2015

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti*

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

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

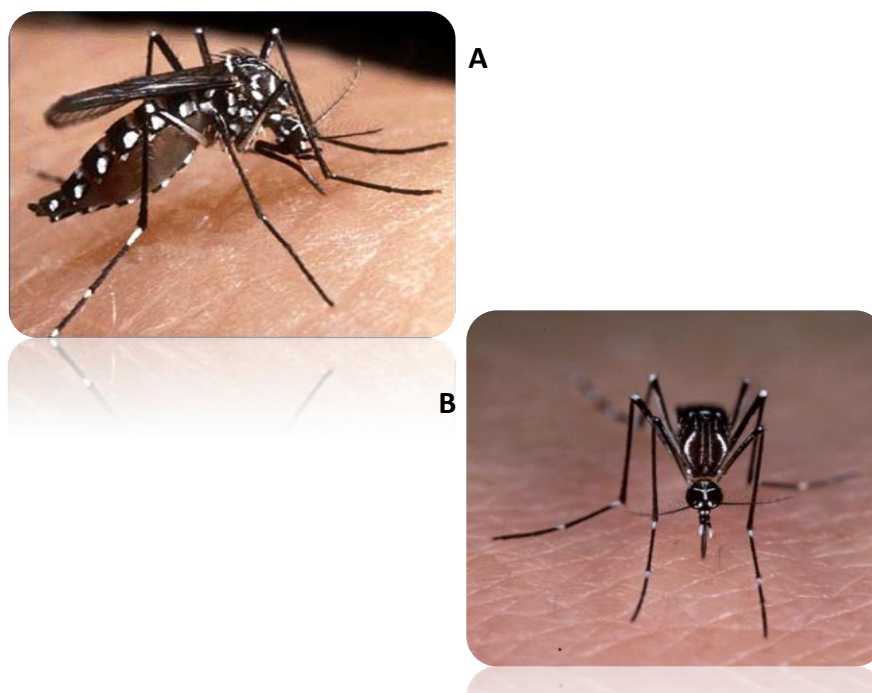


Figura 1 -A-)Fêmea adulta de *Aedes aegypti*, durante o repasto sanguíneo. B-)Escamas em forma de lira presente no tórax de *Ae. aegypti* utilizada na identificação morfológica da espécie.

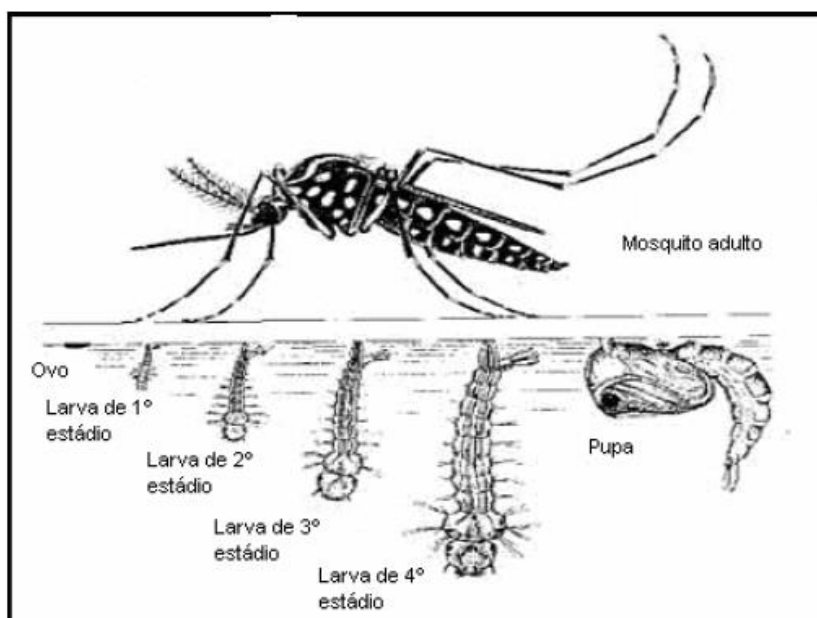


Figura 2 Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*

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

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

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

1.2 Dengue

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

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

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

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

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

1.3 Multiplicação do *Dengue vírus* no vetor

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

1.4 Malária

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

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

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

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

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

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

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

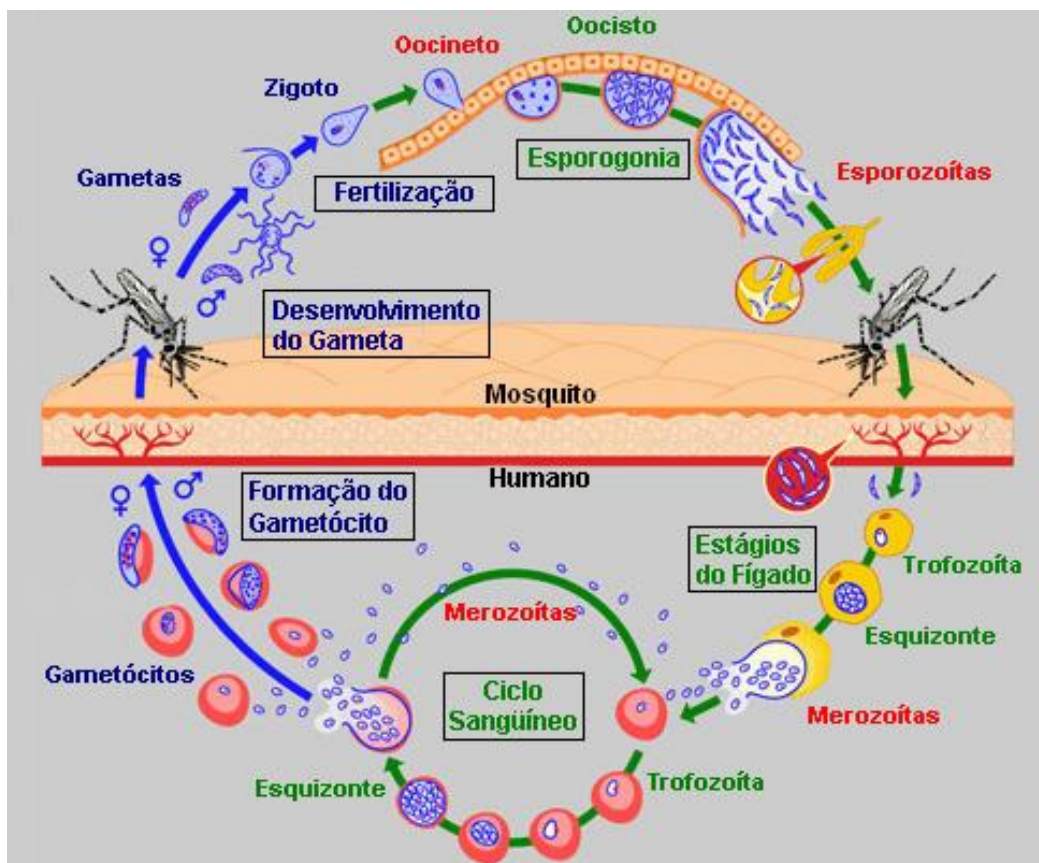


Figura 3-Ciclo do Plasmodium

1.5 Sistema imune dos mosquitos

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

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

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

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

1.6 Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

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

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

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

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

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

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

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

1.6.1 Estrutura de peptídeos antimicrobianos

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

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

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

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

1.6.2 Modo de ação

Alguns mecanismos de permeabilização da membrana bacteriana foram descritos.

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

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

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

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

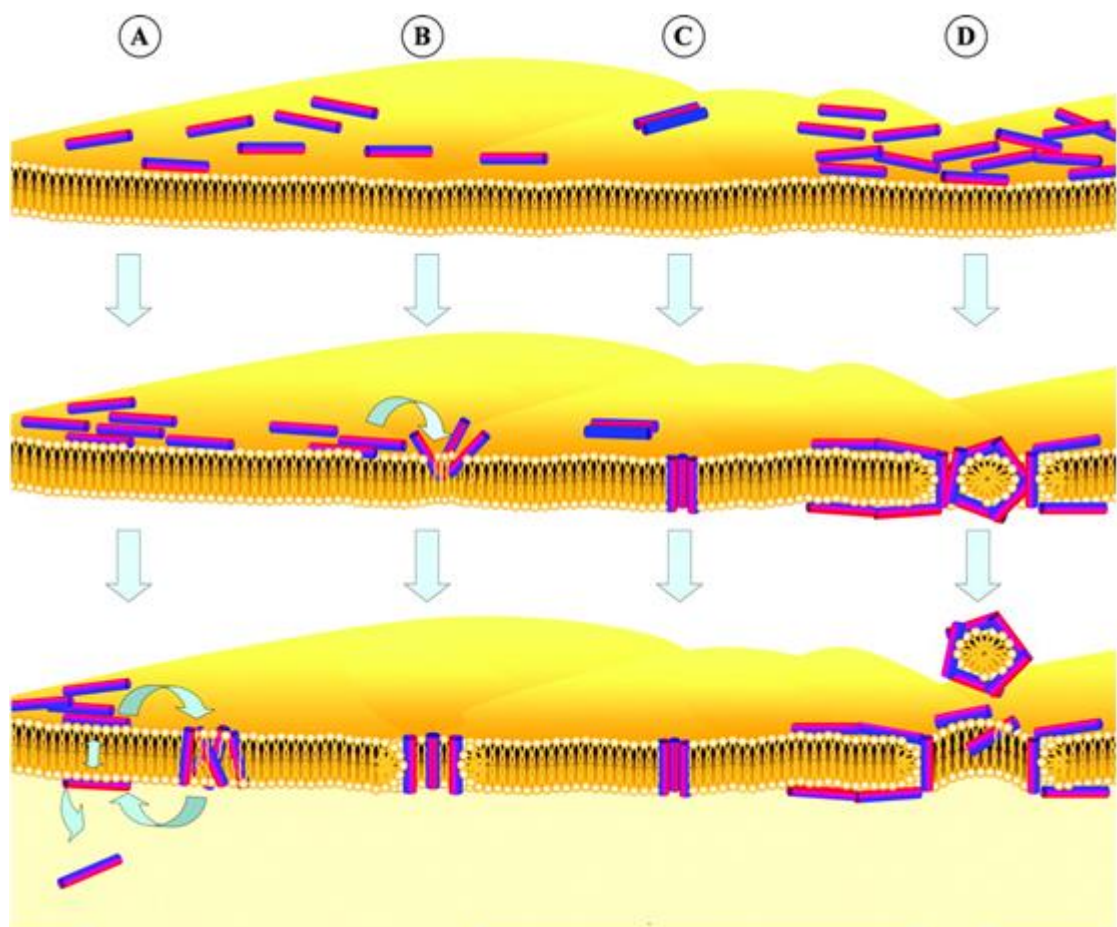


Figura 4- Mecanismos de ação dos Peptídeos Antimicrobianos

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

1.6.3 Peptídeos Antivirais

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

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

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

1.6.4 AMPS com atividade antibacteriana

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

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

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

1.6.5 AMPs com atividade sobre parasitas

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

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

1.6.6 AMPs isolados e caracterizados em insetos

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

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

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

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

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

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

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

1.6.7 Peptídeo Antimicrobiano: Gambicina

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

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

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

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

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

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

5 CONCLUSÃO

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

- Os transcritos do peptídeo gambicina estão presentes em todas as fases de vida do mosquito, desde a fase larval (L1 à L4), pupas (macho e fêmea), mosquitos adultos (machos alimentados com sacarose e fêmeas alimentadas com sangue e sacarose) apresentando uma expressão basal.
- Quando o mosquito está infectado por *Plasmodiumgallinaceum*, nos intervalos analisados (24,48,72 horas e 7 e 14 dias), não há diferença significativa no número de cópias de transcrito da gambicina, quando comparamos o grupo controle e infectado.
- Na infecção de *Aedes aegypti* por vírus dengue sorotipo-2, no intervalo de 24 horas após a infecção, não diferença significativa no número de cópias de transcrito de gambicinaentre os grupos controle e infectado. Nos intervalos de 7 dias e 14 dias após a infecção o número de transcritos da gambicina é maior no grupo controle em relação ao grupo infectado.

REFERENCIAS*

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

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

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

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

DIMOPOULOS, G; Richman, A; Muller, HM; Kafatos, FC. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. **Proceedings National of Academy Science**, U.S.A , v 94, n.21, p. 11508-11513, 2007.

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

* De acordo com :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TZOU, P; Reichhart, JM; Lemaitre, B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. **Proceedings National of Academy Science**., v. 99, n. 4, p. 2152–2157, 2009..

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

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

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