

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA AGGEU MAGALHÃES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE

Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves

Caracterização da resposta imunológica de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* à infecção pelo sorotipo 1 do Dengue vírus

RECIFE  
2014

Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves

**Caracterização da resposta imunológica de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* à infecção pelo sorotipo 1 do Dengue vírus**

Dissertação apresentada ao Curso de mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada

Orientador: Dr. Luiz Carlos Alves

Co-orientadora: Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira

RECIFE

2014

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

G635c      Gonçalves, Gabriel Gazzoni Araújo.  
Caracterização da resposta imunológica de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* à infecção pelo sorotipo 1 do Dengue vírus / Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves.  
- Recife: [s.n.], 2014.  
57 p. : ilus., graf.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientador: Luiz Carlos Alves.

Co-orientadora: Cláudia Maria Fontes de Oliveira.

1. *Culex*. 2. *Aedes*. 3. Antimicrobianos. 4. Hemócitos. 5. Vírus da dengue. I. Alves, Luiz Carlos. ths. II. Moura, Adolpho Marlon Antoniol de. ths. III. Título.

---

CDU 616.98

Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves

**Caracterização da resposta imunológica de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* à infecção pelo sorotipo 1 do Dengue vírus**

Dissertação apresentada ao Curso de mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada

Aprovado em: 22/07/14

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Luiz Carlos Alves  
Departamento de Parasitologia – CpqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos  
Departamento de Entomologia – CpqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Helena Rocha Corrêa Araújo  
Departamento de Parasitologia - USP

A todos do grupo LBCM-Parasitologia/CPqAM – MET/LIKA, que mostraram que a jornada é dura e ninguém irá longe só, não se desespere, somos todos nós.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por sempre trilhar meu caminho;

Aos meus orientadores: Luiz Carlos Alves, Cláudia Fontes e Fábio Brayner, que foram essenciais para o crescimento como estudante e pessoa;

Aos meus pais, irmãos e familiares que sempre me amaram independente de qualquer atitude ou escolhas tomadas;

A minha namorada Amanda, por ser a maior incentivadora dessa jornada;

A Ana Paula Feitosa e Dyana Veras, minhas irmãs de coração;

A FACEPE, pelo incentivo financeiro.

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ e Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde, pela estrutura e oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

A todos companheiros e companheiras do LBCM-PARASITO/CPqAM e MET-LIKA, pela ajuda em todos os momentos difíceis e as alegrias compartilhadas;

A Cássia Arantes por toda ajuda e incentivo em momentos difíceis na realização desse trabalho;

A Duschinka, Danilo e as meninas do Insetário, pelo apoio e ajuda na realização desse trabalho;

A todos os meus amigos da graduação e da vida, por todos os momentos de descontração e apoio que foram essenciais para essa jornada.

“Ninguém vai bater tão forte como a vida, mas não se trata de bater forte. Trata-se de quanto você aguenta apanhar e seguir em frente, o quanto você é capaz de aguentar e continuar tentando. É assim que se consegue vencer.”

**Sylvester Stallone**

GONÇALVES, G. G. A. Caracterização da resposta imunológica de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* à infecção pelo sorotipo 1 do Dengue vírus. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

## RESUMO

Os insetos podem atuar como pragas agrícolas e vetores de patógenos causadores de doenças ao homem e outros animais. Investigações a respeito do sistema imunológico de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* poderão contribuir para o desenvolvimento de métodos de controle das doenças veiculadas por estes insetos, principalmente a dengue, enfermidade causadora de sério problema de saúde pública no mundo. Apesar de *Ae. aegypti* ser a única espécie vetora confirmada na transmissão do vírus Dengue no Brasil, considera-se também importante um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos de *Cx. quinquefasciatus* tido como refratário ao vírus. Neste estudo foram utilizadas linhagens de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* mantidas no Insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM/FIOCRUZ. Três grupos experimentais de fêmeas com 10 dias de idade foram formados para cada espécie. Grupo I, composto por fêmeas alimentadas com solução sacarose (10%); grupo II, fêmeas alimentadas com sangue limpo e grupo III, fêmeas alimentadas com sangue infectado com o sorotipo DENV-1. De cada grupo foram obtidos hemolinfa, glândula salivar, intestino médio e corpo gorduroso para avaliação da expressão dos antimicrobianos defensina e transferrina. Essa avaliação foi realizada através de PCR em Tempo Real utilizando o kit QuantiFast SYBR Green - One-Step qRT-PCR. A avaliação da hemodinâmica foi realizada utilizando 10 µL de hemolinfa de cada grupo, através da contagem das células em câmara de Neubauer. Nossos resultados demonstraram que o *Cx. quinquefasciatus* tem um maior aumento da expressão de defensina e um maior número total de hemócitos quando infectados com DENV-1 em relação ao *Ae. aegypti* e a transferrina teve sua expressão alterada somente no *Ae. aegypti*. Em ambas as espécies estudadas, apenas a alimentação sanguínea não interfere na produção de hemócitos ou quanto na indução de defensina e transferrina. Esses dados sugerem que fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* parecem apresentar uma resposta imune celular e humoral mais intensa do que *Ae. aegypti* quando infectados com DENV-1.

**Palavras chave:** *Culex*, *Aedes*, antimicrobianos, hemócitos e Dengue Vírus.

GONÇALVES, G.G. A. Characterization of immune response of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* to infection by Dengue virus serotype 1. 2014. Dissertation (Master of Bioscience and Biotechnology for Health) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

### ABSTRACT

Insects have great economic and medical and sanitary importance for working as agricultural pests and vectors of disease-causing pathogens to humans and other animals. Research into the immune system of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* may contribute to the development of methods to control diseases transmitted by these insects, especially dengue, disease causing serious public health problem in the world. Although *Ae. aegypti* is the only confirmed vector species in the transmission of dengue viruses in Brazil, it is also considered important to a better understanding of the immunologic mechanisms of *Cx. quinquefasciatus* considered refractory to the virus . In this study we used strains of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* maintained in the Department of Entomology at CPqAM / FIOCRUZ. Three groups of 100-150 females 10 days old ( after emergence ) were formed for each species. Group I consists of females fed sucrose solution (10%); group II, females fed with blood clean free viral particles and group III, females fed infected blood with DENV - 1. Each group hemolymph, salivary gland, midgut and fat to evaluate the expression of defensin antimicrobial peptides and transferrin body were obtained. This evaluation was performed by RT-PCR using QuantiFast SYBR Green Kit - One-Step qRT - PCR. The hemodynamic evaluation was performed using 10 µL of hemolymph of each group by counting the cells in a Neubauer chamber. Our results showed that *Cx. quinquefasciatus* has a higher increase in the expression of defensin and a greater total number of hemocytes when infected with DENV - 1 compared to *Ae. aegypti* and transferrin had his expression changed only in *Ae. aegypti* . In both species, feeding only on blood free of viral particles does not interfere in hemocyte production and expression of defensin and transferrin. These data suggest that *Cx. quinquefasciatus* has better cellular and humoral immune response that *Ae. aegypti* when infected with DENV - 1 .

**Keywords:** *Culex*, *Aedes*, antimicrobial, hemocytes and Dengue Virus

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Áreas de risco da Dengue.....	16
<b>Figura 2-</b> Quadro comparativo de casos notificados de dengue em 2012 e 2013 nas diferentes regiões do Brasil.....	18
<b>Figura 3-</b> <i>Ae. aegypti</i> .....	20
<b>Figura 4-</b> <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	22
<b>Figura 5-</b> Alimentação artificial.....	32
<b>Figura 6-</b> Microinjetor utilizado para obter hemolinfa.....	33
<b>Quadro 1-</b> Sequência dos primers utilizados para quantificação de defensina A e transferrina em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .....	35
<b>Quadro 2-</b> Sequência dos primers utilizados para quantificação de defensina A e transferrina em fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	35
<b>Quadro 3-</b> Sequência dos primers utilizados como controle endógeno (CE) das reações de PCR em Tempo Real.....	36
<b>Figura 7.</b> Número total de hemócitos observado em diferentes grupos experimentais de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> submetidos à infecção com o sorotipo 1 do Dengue Vírus.....	39
<b>Figura 8.</b> Expressão da defensina A em <i>Aedes aegypti</i> induzida pelo DENV-1.....	40
<b>Figura 9.</b> Expressão da transferrina em <i>Aedes aegypti</i> induzida pelo DENV-1.....	40
<b>Figura 10.</b> Expressão da defensina A em <i>Aedes aegypti</i> induzida pelo DENV-1.....	41
<b>Figura 11.</b> Expressão da transferrina em <i>Aedes aegypti</i> induzida pelo DENV-1.....	41
<b>Figura 12.</b> Total do números de hemócitos dos grupos sacarose 10%, sangue limpo (controle), sangue infectado com DENV-1 em <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	42
<b>Figura 13.</b> Expressão da defensina em <i>Cx. quinquefasciatus</i> induzida pelo DENV-1.....	43
<b>Figura 14.</b> Expressão da transferrina em <i>Cx. quinquefasciatus</i> induzida pelo DENV-1.....	44

<b>Figura 15.</b> Expressão da defensina em <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	44
<b>Figura 16.</b> Expressão da transferrina em <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	45
<b>Figura 17.</b> Comparação entre o número total de hemócitos de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> quando infectados com DENV-1.....	46
<b>Figura 18.</b> Expressão da defensina em <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Aedes aegypti</i> quando infectados com DENV-1.....	46

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

***Ae. aegypti*** – *Aedes aegypti*

***Ae. albopictus*** – *Aedes albopictus*

**AMP** – peptídeos antimicrobianos

***Cx. quinquefasciatus*** – *Culex quinquefasciatus*

**DENV** – Dengue Vírus

**EDTA** – cido Etilenodiamino Tetra-cetico

**FFU** – Unidades formadoras de foco

**MIQE** – Mínima informação para publicação de experimentos com PCR quantitativa

**NB2** – Nível de Biossegurança 2

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PEAa** – Programa de Erradicação do *Ae. aegypti*

**PNCD** – Programa Nacional de Controle da Dengue

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Dengue.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Culicídeos.....</b>	<b>19</b>
2.2.1 <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	20
2.2.2 <i>Culex quinquefasciatus</i> (Say, 1823).....	21
<b>2.3 Sistema imune dos insetos.....</b>	<b>22</b>
2.3.1 Resposta imune Celular.....	23
2.3.2 Resposta imune Humoral.....	25
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>4 HIPÓTESE.....</b>	<b>28</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
5.1 Geral.....	29
5.2 Específicos.....	29
<b>6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>30</b>
<b>6.1 Mosquitos.....</b>	<b>30</b>
<b>6.2 Cepa do vírus.....</b>	<b>30</b>
6.2.1 Titulação do DENV-1.....	30
<b>6.3 Grupos experimentais dos mosquitos.....</b>	<b>31</b>
<b>6.4 Alimentação e infecção oral dos mosquitos.....</b>	<b>31</b>
<b>6.5 Obtenção dos tecidos analisados.....</b>	<b>32</b>
<b>6.6 Avaliação da hemodinâmica.....</b>	<b>33</b>
<b>6.7 Extração de mRNA.....</b>	<b>33</b>
<b>6.8 Avaliação da expressão da defensina A e transferrina.....</b>	<b>33</b>
<b>6.9 Validação dos primers.....</b>	<b>35</b>
<b>6.10 Análise estatística.....</b>	<b>36</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>37</b>
<b>8 RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>8.1 Título do estoque.....</b>	<b>38</b>
<b>8.2 Validação dos primers.....</b>	<b>38</b>
<b>8.3 <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>38</b>

8.3.1 Contagem Total de Hemócitos.....	38
8.3.2 Expressão gênica da defensina e transferrina.....	39
<b>8.4 <i>Culex quinquefasciatus</i>.....</b>	<b>42</b>
8.4.1 Contagem Total de Hemócitos.....	42
8.4.2 Expressão gênica da defensina e transferrina.....	42
<b>8.5 <i>Ae. aegypti</i> x <i>Cx. quinquefasciatus</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>9 DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>10 CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose mais prevalente no mundo, cujo ciclo de transmissão envolve a presença de mosquitos vetores. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas sob o risco de contaminação pelo Dengue vírus (DENV), sendo aproximadamente 50-100 milhões de pessoas infectadas anualmente, incluindo mais de 500.000 casos potencialmente letais de febre hemorrágica da dengue (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013a).

O DENV pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*, é constituído por um único filamento de RNA envelopado e possui cinco sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e na Malásia recentemente o DENV-5 foi isolado (NORMILE, 2013). Cada sorotipo apresenta genótipos diferentes, com ampla variabilidade genética que podem coexistir em uma mesma região, aumentando as chances de aparecimento de complicações e casos de febre hemorrágica da dengue (DIAS et al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013a). Esta arbovirose ocorre principalmente em países tropicais, onde as condições climáticas são favoráveis à proliferação dos mosquitos vetores.

*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* como a maioria das espécies de mosquitos possuem fêmeas hematófagos e podem coabitar os mesmos ambientes inclusive os explorados pelos humanos, porém apresentam diferenças importantes quanto à transmissão do Dengue vírus (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013a). Estas são as espécies de *Aedes* consideradas principais vetoras do DENV, porém sua capacidade vetorial pode variar de acordo com região onde são encontrados. *Ae. albopictus* tem uma ampla distribuição geográfica, e tem sido implicado como vetor do DENV na Ásia e países da Europa, por outro lado, *Ae. aegypti* é o vetor competente desse vírus em países da África, Américas, Austrália e Ásia (LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010; ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2013). *Cx. quinquefasciatus*, apesar de coabitar os mesmos espaços, é uma espécie refratária ao DENV, e é a espécie incriminada como o vetor da *Wuchereria bancrofti* agente causador da filariose linfática (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013b).

O sucesso do desenvolvimento dos insetos em ambientes repletos de competidores potencialmente patogênicos é atribuído a eficiência de suas barreiras mecânicas e/ou fisiológicas de proteção (COCIANCICH et al., 1994; LOWENBERGER, 2001). Corroborando também a estreita interação dos sistemas

imunológicos celulares e humorais, onde fatores humorais podem atuar como moléculas de reconhecimentos, auxiliando a resposta celular ou ainda, ao sintetizar e secretar moléculas humorais como aglutinina e peptídeos antimicrobianos em resposta a infecção por patógenos e parasitas (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009; STRAND, 2008).

Diante do exposto, este estudo visa identificar a presença e a expressão de genes relacionados a resposta humoral em diferentes tecidos de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, além de conhecer a dinâmica hemocitária em mosquitos desafiados pelo DENV na busca de compreender melhor a interação do vírus com a resposta imune destes culicídeos.

## 2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

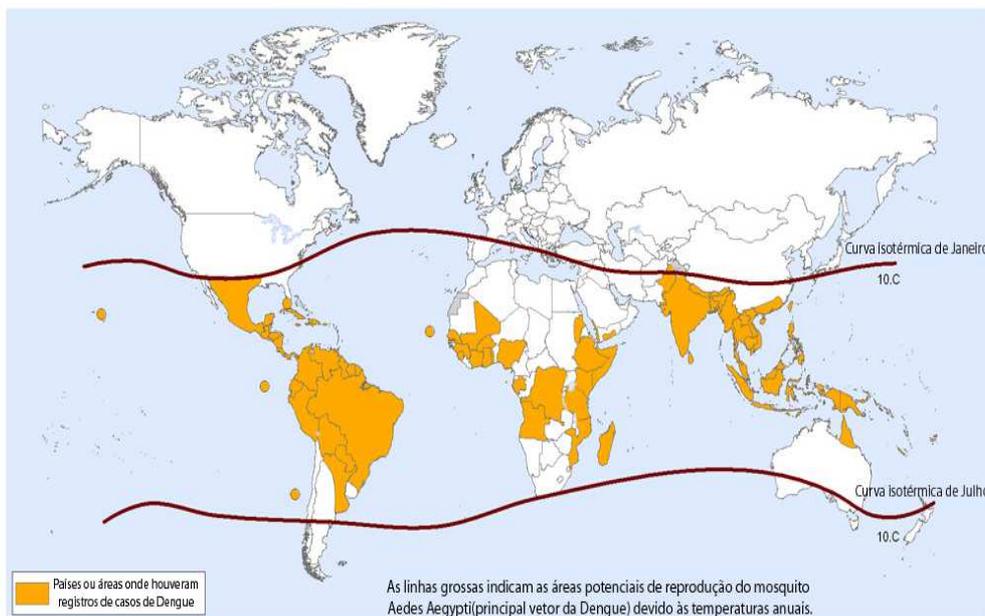
### 2.1 Dengue

A dengue é uma doença viral veiculada ao homem por um mosquito vetor que através das picadas de suas fêmeas inocula juntamente com a saliva o Dengue vírus (DENV) no hospedeiro vertebrado. Mosquitos do gênero *Aedes* são os principais vetores do DENV, suas fêmeas que são hematófagas são responsáveis por propagarem a forma ativa do vírus ao homem, causando-lhe a doença. A dengue tornou-se uma enfermidade comum ao redor do mundo, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a mais importante doença infecciosa de transmissão vetorial. Nos últimos 50 anos a Dengue aumentou expressivamente sua disseminação em diferentes partes do mundo (DIAS et al., 2010; THAI; ANDERS, 2011).

A adaptação do mosquito vetor aos ambientes urbanos e a variação de sorotipos do vírus faz com que o número de infecções seja elevado, totalizando mais de 2 bilhões de pessoas exposta ao risco de infecção no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013a). As áreas de maior risco de infecção são localizadas nos trópicos, cujos países africanos, latino americanos e asiáticos são os mais afetados (Figura 1). O conhecimento da distribuição geográfica da dengue é primordial para compreensão da morbidade e mortalidade global causada pela doença (BHATT et al., 2013).

A dengue pode ser causada por quatro sorotipos de RNA vírus: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5 (NORMILE, 2013), que pertencem à família Flaviviridae. A presença dos diferentes sorotipos depende de cada região, há relatos que os sorotipos DENV1 ao DENV 4 já foram identificados no Brasil (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; DIAS et al., 2010; SIMMONS et al., 2012).

Uma mesma pessoa pode ser infectada e apresentar os sintomas da doença mais de uma vez ao longo da vida devido à transitoriedade dos sorotipos, logo à medida que os sorotipos coexistem na mesma região, a possibilidade de reinfeção pelo Dengue vírus é aumentada (DIAS et al., 2010).

**Figura 1** Áreas de risco da Dengue

**Fonte:** Organização mundial de saúde (2012).

O DENV quando infecta o homem necessita de três a cinco dias para sua incubação extrínseca, podendo este período chegar a 14 dias em alguns casos. Esse período precede o início dos quadros sintomatológicos, quando a febre é o sintoma mais comum da doença. Os sintomas da dengue seguem três fases: inicial, crítica e de recuperação (SIMMONS et al., 2012). A fase inicial é caracterizada pela elevação da temperatura corpórea que geralmente vem acompanhada de dor de cabeça, vômito, mialgia e dores pelo corpo; já a fase crítica é identificada por hemoconcentração, efusão pleural, ascite e hemorragias. Na fase de recuperação os sintomas das fases anteriores vão desaparecendo, porém pode ocorrer fadiga durante algumas semanas após a recuperação (SIMMONS et al., 2012).

O tratamento da dengue é baseado em um período de repouso, ingestão de líquido e intervenção médica nos quadros clínicos graves, entretanto a produção de uma vacina capaz de prevenir a replicação dos cinco sorotipos do Dengue vírus continua sendo uma perspectiva para combater a dengue nos anos futuros. Nos últimos cinco anos, uma vacina produzida pela ChimeriVax (Safoni Pasteur) encontra-se na fase clínica 2 e 3 para determinar sua eficiência contra os sorotipos 1 a 4. Porém, observações associadas a uma infecção secundária por este vírus pode ativar uma reação cruzada e sub-neutralização dos anticorpos que permitem o combate ao Dengue vírus. Esse é um grande entrave no desenvolvimento da vacina e gera

preocupação para as autoridades regulatórias (MARTINA, 2011; SIMMONS et al., 2012).

Existem duas espécies de mosquitos consideradas importantes vetores do Dengue vírus, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) principal vetor nas Américas e África, e *Aedes albopictus* responsável pela transmissão na Ásia. Originário da África, *Ae. aegypti* possivelmente se espalhou para outras localidades através do comércio de escravos no século XV e comércio de especiarias no século XVIII. *Ae. albopictus* é vulgarmente conhecido como “Tigre Asiático” devido ao seu padrão de distribuição de escamas e de sua origem asiática, porém tem grande distribuição mundial devido ao intenso comércio internacional. Sabe-se que essas espécies são totalmente adaptadas a ambientes urbanizados. Com a globalização do mercado, tornou-se mais fácil a dispersão de ovos e formas imaturas desses mosquitos, gerando um grande problema no controle da Dengue (DIAS et al., 2010; MARTINA, 2011; SIMMONS et al., 2012). A relação entre o vírus causador da Dengue e o mosquito vetor, remete a um intenso combate na busca do controle dessa enfermidade através da saúde pública, com a melhoria da qualidade de vida da população e do saneamento básico. Assim, esforços estão sendo realizados para a busca da erradicação da Dengue com base no controle de seus vetores.

Todavia, atualmente é observada a reincidência de algumas infecções causadas por mosquitos transmissores de agentes etiológicos responsáveis por algumas doenças como: dengue, malária, filariose e febre amarela, principalmente a partir dos anos setenta em diversas regiões do globo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013a).

As primeiras ocorrências de dengue que foram bem documentadas são ordinárias da Filadélfia (1778) e do Egito (1779), onde a dengue era considerada uma doença benigna até a Segunda Guerra mundial. Após a guerra foi relatada a circulação de vários sorotipos em uma mesma região, logo formas graves da doença como a febre hemorrágica que foram detectadas com alta incidência nas regiões afetadas. A partir desse momento pós-guerra, a dengue se tornou uma das maiores epidemias mundial, afetando a maioria dos continentes (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

No Brasil, surtos epidêmicos de dengue são relatados desde 1846, porém evidências epidemiológicas concretas foram relatadas apenas em 1982 em Boa Vista, Roraima. DENV-1 foi isolado nessa cidade e um inquérito sorológico mostrou que 11 mil pessoas tinham sido infectadas. Desde 1982 até os dias atuais, ocorreram surtos

epidêmicos, devido à introdução de novos sorotipos (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). A incidência de casos notificados em todo território brasileiro aumentou de cerca de 190% entre os anos de 2012 e 2013 (Figura 2), quando as análises foram feitas por região e as porcentagens apresentam significativas diferenças. A região Nordeste é a única que apresenta um percentual negativo nos casos notificados neste período (-51%), seguido da região Norte com 61%, Sudeste com 223%, Centro-Oeste com 801% e finalmente com preocupantes 2836% de aumento dos casos, a região Sul (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2013).

**Figura 2** Quadro comparativo de casos notificados de dengue em 2012 e 2013 nas diferentes regiões do Brasil.

UF	CASOS NOTIFICADOS		INCIDÊNCIA (nº de casos por 100 mil habitantes)		Percentual de aumento
	2012	2013	2012	2013	
Norte	11.446	18.435	70	112,8	61%
Nordeste	24.574	11.943	45,6	22,2	-51%
Sudeste	25.062	80.876	30,7	99,2	223%
Sul	423	12.420	1,5	44,8	2836%
Centro-Oeste	8.984	80.976	62,3	561,4	801%
Total	70.489	204.650	36,3	105,5	190%

Fonte: Organização Pan Americana de Saúde (2013).

Na tentativa de evitar epidemias de dengue foi implantado no Brasil, em 1996, o Programa de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa), porém em 2002 este programa foi reestruturado e renomeado passando a ser chamado de Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Apesar da atuação do PNCD o vírus DENV permaneceu em circulação mesmo com baixa densidade vetorial, sendo então necessário incluir também medidas de saneamento básico, educação e mobilização social, além as ações de combate ao vetor (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; DIAS et al., 2010).

Existem outras alternativas para controle de *Ae. Aegypti*, como o uso de mosquitos geneticamente modificados, portadores de genes letais ou portadores de bactérias do gênero *Wolbachia*. A introdução de cepas *Wolbachia* em *Ae. aegypti* causa uma infecção, que deixa o mosquito parcialmente resistente ao Dengue Vírus (SIMMONS et al., 2012). Essas duas alternativas de controle do vetor requerem tempo e avaliação do impacto e da adaptação desses novos insetos ao ambiente. Outros estudos, como os genéticos, estão sendo desenvolvidos para avaliar quais os genes

estão ligados à variação de susceptibilidade ao vírus e à resposta imunológica a infecção (BEHURA et al., 2014; KYLE; HARRIS, 2008).

## 2.2 Culicídeos

Os mosquitos pertencem à família Culicidae a qual possui inúmeras espécies de grande interesse médico/sanitário, sendo conhecidos popularmente como pernilongos, muriçocas, carapanã e outros (NEVES et al., 2011). Machos e fêmeas alimentam-se de sacarose que pode ser obtida em plantas, porém as fêmeas também se alimentam de sangue necessário a maturação de seus ovos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI et al., 1987). A hematofagia em geral é crepuscular, porém algumas espécies preferem realiza-la durante a noite ou durante o dia. Quando não estão em atividade alimentar ou sexual, os mosquitos se mantêm em locais de abrigo. Nos culicídeos, o dimorfismo sexual pode ser facilmente percebido pela forma das antenas que nos machos são plumosas e nas fêmeas são pilosas (FORATTINI et al., 1978; NEVES et al., 2011; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2005).

As espécies de mosquitos apresentam grande variabilidade genética e ampla distribuição geográfica, cuja dispersão abrange áreas que se estendem das regiões equatoriais as árticas. As fêmeas das subfamílias *Culicine* e *Anopheline* são hematófagas, portanto durante o repasto sanguíneo podem transmitir patógenos causadores de doenças ao homem, como: febre amarela, dengue, malária e filariose (NEVES et al., 2011).

Os representantes destas espécies apresentam um curto ciclo biológico com duração de aproximadamente 15 dias, quando em condições ambientais favoráveis com elevada temperatura e humidade relativa do ar, além das características relacionadas com a presença de matéria orgânica em decomposição e detritos encontrados nos criadouros larvários como as diferentes coleções de águas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI; BRITO, 2003).

Os principais gêneros da família Culicidae são *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, cada um desses gêneros possui espécies relacionadas aos ciclos de transmissão de patógenos causadores de doenças humanas. Espécies de *Anopheles* podem transmitir o protista causador da malária, enquanto que espécies do gênero *Aedes* estão associadas à veiculação de arbovírus, entre eles o Dengue vírus; o gênero

*Culex* é vetor do verme filarial causador da filariose e de encefalites (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2005).

### 2.2.1 *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Originalmente descrito no Egito, fato que lhe confere o nome específico (*Aedes aegypti*) (Figura 3). Sua distribuição geográfica é ampla, sendo encontrado em regiões quentes nos dois hemisférios (BECKER et al., 2003; NELSON, 1986). Pode ser encontrado entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul, sendo sua distribuição restrita à altitude, porém, já foi encontrado no México em alturas de mais de 2.000 metros, apesar de ser uma espécie que não seja normalmente encontrada em zonas acima de 1.000 metros de altitude, (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 1995).

**Figura 3** *Aedes aegypti*



Fonte: *Aedes aegypti* (2014)

Esse mosquito foi introduzido nas Américas provavelmente, através de embarcações que cruzavam o oceano Atlântico durante as primeiras colonizações europeias no Novo Mundo (BISSET, 2002). Reconhecido como transmissor do vírus causador da febre amarela em 1881 por Carlos J. Finlay (BISSET, 2002), *Ae. aegypti* teve em 1906 as primeiras evidências de que também transmitia o vírus Dengue. Posteriormente, em 1906 e 1931, Agramonte e Simmons respectivamente, confirmaram as evidências achadas em 1881 (HALSTEAD, 1974).

Em 1898 Lutz e 1899 Ribas, respectivamente, fizeram os primeiros registros sobre a identificação de *Ae. aegypti* no Brasil. Esta espécie é encontrada em uma

faixa do continente americano que se estende do Uruguai até o sul dos Estados Unidos da América (EUA).

Também é registrada a ocorrência de surtos da dengue em vários países, como Venezuela, Cuba, Brasil e Paraguai (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2013). No Brasil, *Ae. aegypti* está amplamente distribuído, e em 1998 estava presente em todos os estados brasileiros (FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2001).

*Ae. aegypti* está adaptado aos ambientes urbanos, portanto é encontrado próximos as habitações humanas utilizando os recipientes freqüentemente encontrados no domicílio ou em sua área externa peridomicíliar (vasilhames, potes, barris, latas, garrafas e vasos de plantas, calhas de telhado, axilas de folhas, bambus cortados) para o desenvolvimento de sua fase larvária e jovens. Essa espécie é antropofílica e tem hábitos diurnos, alimentando-se e depositando seus ovos ao amanhecer e no período vespertino próximo ao crepúsculo (BRAGA, 2007).

*Ae. aegypti* apresenta a capacidade de se infectar com o Dengue vírus e ser o único vetor incriminado no Brasil na transmissão natural desse microrganismo para os humanos. Já *Ae. albopictus*, até o momento não foi envolvido com ciclos locais naturais da transmissão do vírus para humanos, apesar de conseguir transmitir o vírus para seus descendentes em testes de laboratórios (GRATZ, 2004).

### 2.2.2 *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823)

*Culex quinquefasciatus* (Figura 4) apresenta ampla distribuição geográfica, cujo seu comportamento fortemente antropofílico influencia na sua abundância e prevalência, principalmente em áreas urbanas de regiões tropicais (CABRERA; BERNAL; CARMEN, 2006; FORATTINI et al., 1978). No Brasil, distribui-se em todos os estados, recebendo diferentes denominações populares como: mosquito, pernilongo, muriçoca ou carapanãs (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Áreas urbanas carentes de saneamento básico são as mais propícias ao desenvolvimento de *Culex*, por concentrarem um maior número de criadouros geralmente situados no solo, representados por coleções aquáticas com elevado teor de matéria orgânica. Apesar de prevalecer durante todo o ano, sua densidade populacional tende a aumentar em períodos chuvosos. (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013b).

**Figura 4** *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: *Culex quinquefasciatus* (2014)

Esta espécie é considerada a principal transmissora da *Wuchereria bancrofti*, verme causador da filariose linfática, em ambientes urbanos tropicais, sendo o vetor exclusivo desse helminto nas Américas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013b). Esta espécie ainda pode transmitir vírus que causam diversas encefalites, além de outra filaria que causa a dirofilariose canina. Em áreas onde existe risco de transmissão desses agentes patogênicos através do mosquito *Cx. quinquefasciatus*, constitui um grande problema de saúde pública devido às doenças causadas por esses agentes serem consideradas desfigurantes e de alto impacto econômico em decorrência da morbidade causada às pessoas acometidas (SALAZAR; MANCADA, 2004).

### **2.3 Sistema imune dos insetos**

A defesa dos insetos contra agentes infecciosos é dada pela resposta imune inata que está dividida em resposta imune celular e imune humoral. A resposta imune celular está baseada em células sanguíneas circulantes, conhecidas como hemócitos, estes são responsáveis pela nodulação, fagocitose e encapsulamento dos organismos estranhos (CASTILLO; REYNOLDS; ELEFThERIANOS, 2011; FALLON; SUN, 2001; STRAND, 2008).

A resposta imune humoral envolve a indução e produção de diversas proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMP) intermediados pelo oxigênio e nitrogênio, e os complexos enzimáticos que regulam a melanização e coagulação da hemolinfa

(CASTILLO; REYNOLDS; ELEFThERIANOS, 2011; FALLON; SUN, 2001; LAVINE; STRAND, 2002).

Quando o inseto é desafiado por algum patógeno, ele irá ativar a resposta imune celular (hemócitos) que produzirá AMP característicos da resposta humoral, pois os hemócitos reconhecem cada corpo estranho pela interação direta de seus receptores de superfície com moléculas do organismo invasor. Ou indiretamente pelo reconhecimento de receptores humorais que se ligam e opsonizam a superfície do invasor, indicando que as repostas imunológicas estão interligadas na defesa contra microrganismos invasores (STRAND; PECH, 1995; STRAND, 2008; TSAKAS; MARMARAS, 2010).

### 2.3.1 Resposta imune Celular

Os hemócitos são os mediadores da resposta imune celular nos insetos e são classificados em prohemócitos, granulócitos, oenocitóides, plasmócitos e esferulócitos e adipohemócito, sendo os três primeiros os mais estudados e caracterizados em mosquitos. (ARAÚJO et al., 2008; BRAYNER et al., 2005; LAVINE; STRAND, 2002; PARIKH, 2011). Essas células são geradas através do órgão hematopoiético, glândula linfática, e durante a fase larval nas células embrionárias do mesoderma dorsal (CASTILLO; REYNOLDS; ELEFThERIANOS, 2011; STRAND, 2008).

Os hemócitos são células livres circulantes na hemolinfa dos insetos, são elementos nucleados que percorrem quase todas as regiões do corpo dos insetos. Apresentam movimentos amebóides, podendo inclusive mover-se em sentido contrário ao fluxo da hemolinfa. Os hemócitos são comparados aos leucócitos dos vertebrados, devido as suas funções que estão relacionadas direta ou indiretamente com sua capacidade de reagir contra a presença de patógenos no organismo. Os hemócitos movimentam-se na hemocele e o contato com partículas estranhas e a resposta a sinais extracelulares, facilita o reconhecimento e a adesão dessas células (BOMBONATO; GREGORIO, 1995). Além disso, reconhecem organismos estranhos pela interação de receptores da superfície celular com moléculas do organismo invasor (LAVINE; STRAND, 2002).

Na fagocitose, os patógenos são reconhecidos pelos hemócitos, através da interação celular ocorrendo a formação do fagossomo, que será maturado e em

seguida, uma série de eventos envolvendo endossomos e lisossomos auxiliam a destruição do patógeno invasor (STRAND, 2008; TSAKAS; MARMARAS, 2010). A ação da fagocitose é direcionada para dois tipos de alvos: microrganismos e células apoptóticas. Em insetos a fagocitose é muito importante na embriogênese eliminando células que estão morrendo durante esse processo e removendo células apoptóticas que excedem o número considerado normal. A atividade da fagocitose contra microrganismos é uma das defesas fundamentais para os insetos, porém sua ação não é totalmente conhecida em todas as infecções (ROSALAES, 2011).

A nodulação por sua vez está baseada na formação de hemócitos adesivos, normalmente, encontra-se em um estado não adesivo e quando ocorre a infecção por patógenos bacterianos, tornam-se adesivos. Essa mudança faz com que os hemócitos formem pequenos agregados que dão origem aos nódulos que irão isolar da hemolinfa o agente infeccioso. Apesar da sua formação não ser totalmente caracterizada, esses nódulos podem ou não ser melanizados e há relatos que evidenciam a presença de eicosanoides na sua formação (ROSALAES, 2011; TSAKAS; MARMARAS, 2010).

O encapsulamento é utilizado para combater microrganismos maiores como nematódeos e protozoários, quando vários hemócitos irão revestir o invasor formando uma cápsula (MAGALHAES et al., 2008). Em várias espécies de inseto essa cápsula é formada, principalmente, por plasmócitos e granulócitos, e em seu interior o invasor será morto por asfixia ou produtos citotóxicos como quinona ou hidroquinona (ROSALAES, 2011; STRAND, 2008).

Os hemócitos podem estar envolvidos com o reconhecimento dos vírus e os mecanismos intracelulares de defesa antiviral, uma vez que a disseminação dos vírus ocorre através da hemocele no interior dos insetos durante a infecção. Entretanto, outros fatores, como as vias de sinalização Toll e Imd, estão envolvidos no reconhecimento e mecanismo de defesas antivirais. (STRAND, 2008). A via Toll é ativada durante a infecção por bactérias Gram-negativas, fungos, *Plasmodium* e alguns vírus, essa via pode ser regulada por alguns genes. O gene *Rel1* por exemplo, está envolvido na ativação da via Toll para uma atividade antiplasmodial. Essa via também está associada às atividades antifúngica e contra o Dengue vírus. A via Imd tem o mesmo princípio da via Toll, porém sua resposta é observada contra bactérias e *Plasmodium* (HILLYER, 2010; MAGALHAES et al., 2008).

### 2.3.2 Resposta imune Humoral

A resposta imune humoral é caracterizada pela presença de fatores humorais como profenoloxidase, receptores padrão de reconhecimento, proteases de serina, opsoninas e a produção de peptídeos antimicrobianos (AMP) (BLANDIN; LEVASHINA, 2007). Esses peptídeos são sintetizados nos hemócitos, intestino médio, glândulas salivares e corpo gorduroso, que é considerado o maior tecido dos invertebrados produtor e secretor de peptídeos antimicrobianos. A coagulação da hemolinfa e sua melanização também são caminhos utilizados na resposta imune humoral intermediado pelos fatores humorais (TSAKAS; MARMARAS, 2010).

Os insetos têm a capacidade de reconhecer diversos patógenos e iniciar sua resposta humoral através dos receptores humorais, essa capacidade ainda é observada mesmo depois de algumas semanas após a infecção, dando continuidade a produção de AMPs. Há cerca de 150 AMP caracterizados, isolados e classificados em quatro grupos: a) cecropina; b) defensina; c) peptídeos ricos em prolina; d) peptídeos ricos em glicina (ROSALAES, 2011; TSAKAS; MARMARAS, 2010). Estudos mostram que a resposta humoral em artrópode modelo (*Drosophila*) é regulada por duas vias: Toll e Imd (DE GREGORIO et al., 2002; HOFFMANN, 2003; MAGALHAES et al., 2008), esse mesmo tipo de regulação foi observado em *Ae. aegypti* (XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008).

A expressão desses peptídeos e proteínas pode ser constitutiva e/ou induzida, sendo liberados na hemolinfa, apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e atividade antiviral (COCIANCICH et al., 1994; HULL; KATETE; NTWASA, 2012). Existe uma característica comum a todos, a sua anfipatia, que indica o modo de ação molecular desses peptídeos e proteínas. Dessa forma, esses peptídeos atuam ao nível das membranas e das paredes celulares eliminando os seus alvos biológicos pela lise celular (COCIANCICH et al., 1994).

A defensina é um peptídeo rico em cisteína descrito pela primeira vez em 1988 na mosca *Sarcophaga peregrina* (MATSUYAMA; NATORI, 1988) e atualmente é relatada em vários vertebrados e invertebrados. A defensina foi o primeiro AMP isolado de *Ae. aegypti* sendo considerada a mais importante AMP encontrada nesse vetor. Três formas foram descritas A, B e C em *Ae. aegypti*, a forma D foi descrita como uma nova defensina encontrada em *Ae. albopictus* (CHO et al., 1996; GAO; HERNANDEZ; FALLON, 1999; TSAKAS; MARMARAS, 2010). As formas A e B são

as mais relatadas e sua expressão é encontrada, principalmente, no corpo gorduroso e a forma C é expressa principalmente no intestino médio (BARTHOLOMAY et al., 2004; LOWENBERGER, 2001). As defensinas têm cerca de 70 a 100% de similaridade entre os dípteros e possui características, principalmente, antibacterianas e antifúngicas (BULET; STÖCKLIN, 2005; YI et al., 2014). A atividade anti-dengue desse peptídeo também é relatada na região do intestino médio, mostrando a capacidade antiviral da defensina (PAN et al., 2012).

Além dos peptídeos, a expressão de proteínas é observada na defesa humoral dos insetos, essa expressão pode estar envolvida na proteção das células do inseto ou na sobrevivência, replicação ou transmissão de arboviroses (TCHANKOUO-NGUETCHEU et al., 2010). Uma das proteínas expressa como molécula de defesa é a transferrina (MAGALHAES et al., 2008), cuja produção é observada, principalmente, na hemolinfa. A capacidade de sequestrar ferro, diminuir a habilidade de infecção do patógeno e ser um veículo para expressão de novos domínios de proteínas são hipóteses ligadas à ação da transferrina em insetos. Acredita-se que a transferrina deve ser regulada durante um ferimento, infecção ou alimentação potencialmente tóxica (FALLON; SUN, 2001; GEISER; WINZERLING, 2012; HARIZANOVA et al., 2005; YOSHIGA et al., 1997).

### 3 JUSTIFICATIVA

Os insetos são de grande importância econômica e médico-sanitária porque podem atuar como pragas agrícolas e vetores de patógenos causadores de doenças ao homem e outros animais. O estudo das interações entre insetos e patógenos tem proporcionado modelos importantes para se estudar as estratégias de respostas antimicrobianas, que por sua vez podem fornecer informações relevantes para o combate às várias patologias. O conhecimento sobre o sistema imunológico de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* é de grande relevância para o desenvolvimento de metodologias de controle de várias doenças transmitidas por patógenos veiculados por estas espécies de mosquitos. Tendo em vista que a dengue é um problema de saúde pública em vários países do mundo e apesar de diferentes espécies de culicídeos coabitarem os mesmos espaços, o *Ae. aegypti* é a única espécie confirmada como vetora na transmissão do Dengue vírus no Brasil. Na busca de um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos com as defesas imunológicas das espécies *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* que habitam as mesmas áreas endêmicas para a Dengue e se comportam diferentemente em relação a transmissão do Dengue vírus, este estudo se propõe a avaliar o número total dos hemócitos circulantes e a expressão dos antimicrobianos defensina e transferrina em diferentes tecidos envolvidos na defesa imunológica destas espécies quando desafiados com o DENV-1.

#### 4 HIPÓTESE

*Culex quinquefasciatus* apresenta diferente resposta imune humoral e celular que *Aedes aegypti*, quando desafiados com DENV-1.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Geral

Avaliar a resposta imune de defesa celular e humoral de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* ao sorotipo 1 do Dengue Vírus.

### 5.2 Específicos

- a) Avaliar o número total de hemócitos presentes na hemolinfa de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* alimentados com sangue infectado pelo DENV-1, sangue limpo e por sacarose (10%);
- b) Avaliar a expressão de defensina e transferrina em hemócitos, glândula salivar, intestino médio e corpo gorduroso de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* alimentados com sangue infectado pelo DENV-1, sangue limpo e por sacarose (10%).

## 6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 6.1 Mosquitos

Foram utilizados mosquitos das linhagem *Aedes aegypti* (RecLab) e *Culex quinquefasciatus* (CqSLab) ambas consideradas referência de susceptibilidade a inseticidas, patógenos e arbovírus, mantidas a mais de 15 anos sob condições controladas de laboratório, a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa entre 65-85% e fotoperíodo 12:12h, no Insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/ FIOCRUZ.

### 6.2 Cepa do vírus

O DENV-1, cepa EU259529, isolado de soro de paciente infectado na Região Metropolitana do Recife, armazenadas em freezer  $-80^\circ\text{C}$ , foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Virologia e Terapia Experimental(LAVITE) – CPqAM/FIOCRUZ e utilizada para infecção artificial das fêmeas dos mosquitos.

#### 6.2.1 Titulação do DENV-1

A titulação por peroxidase foi feita para determinar o título dos estoques e dos vírus usados na alimentação artificial. Este procedimento foi realizado seguindo o protocolo de Das *et al.* (2007) com modificações conforme descrição a seguir. Em placas de 24 poços, foi semeado  $3 \times 10^5$  células C6/36 com o meio L-15 de crescimento em cada poço 48 horas antes da realização do ensaio. Após 48 horas foi preparada uma diluição seriada ( $1:10^1$ ,  $1:10^2$ ,  $1:10^3$ ,  $1:10^4$ ,  $1:10^5$ ,  $1:10^6$ ,  $1:10^7$  e  $1:10^8$ ) a cada amostra a ser titulada. Os meios foram retirados das placas e foram inoculados 200  $\mu\text{l}$  de cada diluição no poço correspondente.

As placas ficaram em um homogeneizador orbital (bailarina) por 15 minutos, seguido de uma incubação de 45 minutos em estufa a  $28^\circ\text{C}$  para adsorção do vírus. Após a incubação, os poços foram aspirados com pipeta Pasteur e, então, foi adicionado em cada poço 1 ml de meio semi-sólido (Carboximetilcelulose 2%, meio Leibovitz 2X concentrado, antibióticos 1% e antifúngicos 1%). As placas foram acondicionadas em estufa a  $28^\circ\text{C}$  por 5 dias. Após este período o meio semi-sólido

foi retirado, os poços foram lavados com PBS 1X (0,1M; pH 7,4) e foi adicionado 1 ml de acetona 30% por 13 minutos para fixação das células em cada poço. A acetona foi então, retirada por inversão e as placas foram colocadas para secar em estufa a 37 °C por 24 horas.

Após 24 horas, as placas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal (líquido ascítico murino anti-dengue 1, 2 ou 3, gentilmente cedido por Biomanguinhos) a 37 °C por 1 hora e, em seguida, lavadas três vezes com PBS 1X (0,1M; pH 7,4). Após as lavagens, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário HRP-rec-Protein G (Invitrogen – cat. No 10-1223) a 37 °C por 1 hora e, em seguida, lavadas novamente três vezes com PBS 1X (0,1M; pH 7,4). Após as lavagens, foi adicionado a cada poço o substrato AEC (Sigma – cat. No A6926) para revelação dos focos, e os ensaios foram feitos em duplicata e o título foi obtido através da quantificação das unidades formadoras de focos por ml (FFU/ml) usando a fórmula: Título (FFU/ml) = média de focos da última diluição x última diluição (10<sup>n</sup>) x fator de diluição, onde n é o número da última diluição correspondente à visualização dos focos.

### **6.3 Grupos experimentais dos mosquitos**

Três grupos experimentais de 100 a 150 fêmeas com 10 dias de idade da emergência foram formados para cada espécie. O grupo I composto por fêmeas alimentadas apenas com solução sacarose (10%) controle negativo; grupo II, fêmeas alimentadas com sangue limpo usado como controle positivo e grupo III, fêmeas alimentadas com sangue infectado com DENV-1, grupo experimental propriamente dito.

### **6.4 Alimentação e infecção oral dos mosquitos**

Todo o procedimento de alimentação artificial oral dos mosquitos foi realizado no infectório do Departamento de Entomologia do CPqAM/FIOCRUZ-PE, onde as etapas de alimentação e manutenção dos mosquitos sadios e infectados foram realizadas de acordo com as normas de biossegurança e bioproteção previstas para laboratórios e infectórios com nível 2 de segurança (NB2).

O procedimento de infecção oral com DENV-1 seguiu o protocolo descrito por Salazar *et al.* (2007) com algumas modificações, conforme descrição a seguir. Para a

alimentação sanguínea artificial foi utilizada uma mistura de suspensão de vírus previamente expandida em células C6/36 e sangue de carneiro desfibrinado na proporção de 1:1 cuja alimentação de manutenção com solução de sacarose e água foi retirada 24 horas antes da infecção oral. A mistura de sangue e vírus foi mantida a 37°C em um sistema artificial de mamadeiras, membranas e mangueiras (MAGALHAES et al., 2008) e oferecidas as fêmeas (Figura 5).

**Figura 5** Alimentação artificial.



Fonte: O autor

Após a alimentação sanguínea, os mosquitos foram anestesiados em gelo e mantidos em placa fria para separação das fêmeas ingurgitadas. Aquelas que não se alimentaram ao ponto de ficarem ingurgitadas foram descartadas do estudo. Os grupos controles, formado por mosquitos alimentados com sangue limpo e mosquitos alimentados com sacarose (10%) também foram incluído em cada ensaio.

### **6.5 Obtenção dos tecidos analisados**

A hemolinfa dos mosquitos foi obtida por perfusão feita com um microcapilar de vidro acoplado a um microinjetor (Figura 6), através da inoculação intratorácica de 5-10µL de solução anticoagulante com inibidor de proteases (contendo Solução Salina

Balanceada de Hanks – HBSS, citrato de sódio a 50 mM, EDTA a 10 mM e sacarose 25 mM pH 7,2, e 13µL de inibidor de proteases para cada 1 mL de amostra). O mix de hemolinfa e anticoagulante foi coletado por capilaridade através da punção lateral do abdômen. Ademais, os mosquitos foram dissecados para retirada das glândulas salivares, corpo gorduroso e intestino médio foram coletados após 3, 7 e 14 dias da alimentação respectivamente. Todas as amostras coletadas, foram armazenadas em 100 µL de isocianato de guanidina, a -80°C, para evitar a degradação do RNA mensageiro.

**Figura 6** Microinjetor utilizado para obter hemolinfa.



Fonte: O autor

## 6.6 Avaliação da hemodinâmica

A avaliação da hemodinâmica foi realizada utilizando 10 microlitros de hemolinfa perfundida de *pools* de 6 mosquitos para cada grupo. Os hemócitos foram contados em câmara de Neubauer descartáveis (®iNCYTO C-Chip, DHC-N01), sendo feitas três lâminas por grupo e o experimento em triplicata técnica e biológica.

## 6.7 Extração de mRNA

Foram coletados dois *pools* de glândulas salivares de 10 mosquitos, corpos gordurosos de 10 mosquitos e intestinos médios de 10 mosquitos, dos três grupos experimentais de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Cada *pool* foi armazenado em 100  $\mu$ L de isocianato de guanidina, posteriormente lisado, homogeneizado e submetido à extração de RNA, utilizando 100  $\mu$ L de isocianato de guanidina, 100  $\mu$ L de fenol ácido, 50  $\mu$ L de clorofórmio e 25  $\mu$ L de acetato de sódio 2M para cada amostra. Em seguida, o RNA foi precipitado com isopropanol durante 12 horas sob refrigeração, centrifugação e ressuspensão em água ultra pura (Sigma). Após a ressuspensão, o RNA foi tratado com DNase (Sigma) para diminuir a contaminação por DNA genômico e foi quantificado no Nanodrop (New Nanodrop – Cellpian) a partir de uma alíquota de 1  $\mu$ L da amostra.

## 6.8 Avaliação da expressão diferencial da defensina A e transferrina

Para a avaliação da expressão diferencial da defensina A e transferrina foram utilizados primers que amplificam uma região de 96 e 109 pb, respectivamente, para *Ae. aegypti* (Quadro 1) e uma região de 190 e 181 pb, respectivamente para *Cx. quinquefasciatus* (Quadro 2). Os primers para *Cx. quinquefasciatus* foram construídos pelo programa NCBI/Primer-BLAST. A PCR em tempo real foi realizada com amostras de RNA gerada a partir de *pools* coletados após 3, 7 e 14 dpi.

Foi utilizado o Kit QuantiFast SYBR Green, One-Step qRT-PCR, no qual foram adicionados 2  $\mu$ L da amostra com concentração de 100 ng/ $\mu$ L de RNA de interesse em 5  $\mu$ L de SYBR Green RT-PCR Master mix, 0,1  $\mu$ L de QuantiFast RT mix e 2,9  $\mu$ L de água RNase-Free, totalizando um volume final de 10  $\mu$ L. A programação do qRT-PCR seguiu as condições seguintes: transcrição reversa a 50°C por 10 min, etapa de ativação da PCR a 95°C por 5 min, em seguida 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento e extensão a 63°C por 30 segundos. Os controles endógenos foram usados para normalização da qRT-PCR, cujo esses controles não poderiam variar entre os grupos experimentais e seus respectivos dpi. O equipamento qRT-PCR 7500 da *Applied Biosystems* foi utilizado para avaliar a expressão da defensina e transferrina do presente estudo. Os controles endógenos gene ribossomal 18S e S3, e seus respectivos primers, encontram-se descritos na quadro 3.

## 6.9 Validação dos primers

Para validar todos os primers utilizados nas reações, foi realizada uma diluição seriada de 1:10 em 5 pontos consecutivos. Entre essas diluições foi avaliada a curva padrão e curva de *melting* para averiguar se os primers tinham um padrão de eficiência e especificidade, respectivamente, propostos pelo guia MIQE - Mínima informação para publicação de experimentos com PCR quantitativa (BUSTIN et al., 2009), esses parâmetros foram avaliados pelo equipamento qRT-PCR 7500 da *Applied Biosystems*.

**Quadro 1-** Sequência dos primers utilizados para quantificação de defensina A e transferrina em fêmeas de *Aedes aegypti*.

PEPTÍDEOS	SEQÜÊNCIAS	REFERÊNCIA
<b>Defensina A</b>	<b>Forward:</b> 5'-GCCACCTGTGATCTGCTGAGCGGA-3'	(CHO <i>et al.</i> , 1996)
	<b>Reverse:</b> 5'-GGAGTTGCAGTAGCCTCCCGAT-3'	
<b>Transferrina</b>	<b>Forward:</b> 5'-CGGCCAGCTGGAGGATAACATTG-3';	(YOSHIGA <i>et al.</i> , 1997)
	<b>Reverse:</b> 5'-CGCTTTGAACTCGCCGAACATCTC-3'	

Fonte: O autor

**Quadro 2-** Sequência dos primers utilizados para quantificação de defensina A e transferrina em fêmeas de *Culex quinquefasciatus*.

PEPTÍDEOS	SEQÜÊNCIAS	REFERÊNCIA
<b>Defensina A</b>	<b>Forward:</b> 5'- TTGCCGTTTTTGTGCCTGTTT -3'	Presente estudo
	<b>Reverse:</b> 5'- TCGTTGACGCCCAATCCAC -3'	
<b>Transferrina</b>	<b>Forward:</b> 5'- CACCGATTGAATTCGACGCC -3';	Presente estudo
	<b>Reverse:</b> 5'- TTCTCGCAGACGAGCACTTT -3'	

Fonte: O autor

**Quadro 3-** Sequência dos primers utilizados como controle endógeno (CE) das reações de PCR em Tempo Real.

MOSQUITO/CE	SEQÜÊNCIAS	REFERÊNCIA
<i>Culex quinquefasciatus</i> / Gene Ribossomal 18S	<p><b>Forward:</b> 5'- CGCGGTAATTCCAGCTCCACTA -3';</p> <p><b>Reverse:</b> 5'- GCATCAAGCGCCACCATATAGG -3'</p>	(REID <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aedes aegypti</i> / Proteína Ribossomal S3	<p><b>Forward:</b> 5'- AGCGTGCCAAGTCGATGAAG -3'</p> <p><b>Reverse:</b> 5'- ACGTACTCGTTGCACGGATCTC -3'</p>	(VISHVANATH <i>et al.</i> , 2007)

Fonte: O autor

## 6.10 Análise Estatística

A contagem total dos hemócitos foi avaliada e comparada pelo teste t-Student com erro de  $P < 0,0001$  utilizando o GraphPad PRISM versão 5.0. A análise da eficiência dos primers e da expressão dos defensina A e transferrina foram avaliadas no software SDS 7500 v. 2.0 e sua expressão relativa foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

## **7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente estudo não envolveu procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo para pesquisas com seres humanos ou animais de experimentação

## **8 RESULTADOS**

### **8.1 Título do estoque**

O título do estoque DENV-1 usado para propagar o vírus em células C6/36 foi de  $5 \times 10^5$  FFU/ml, determinado pelo ensaio de titulação de peroxidase. O efeito citopático de 80-90% das células C6/36 foi observado após 5 dias da infecção com o vírus. Este material foi então utilizado nos experimentos de infecção artificial.

### **8.2 Validação dos primers**

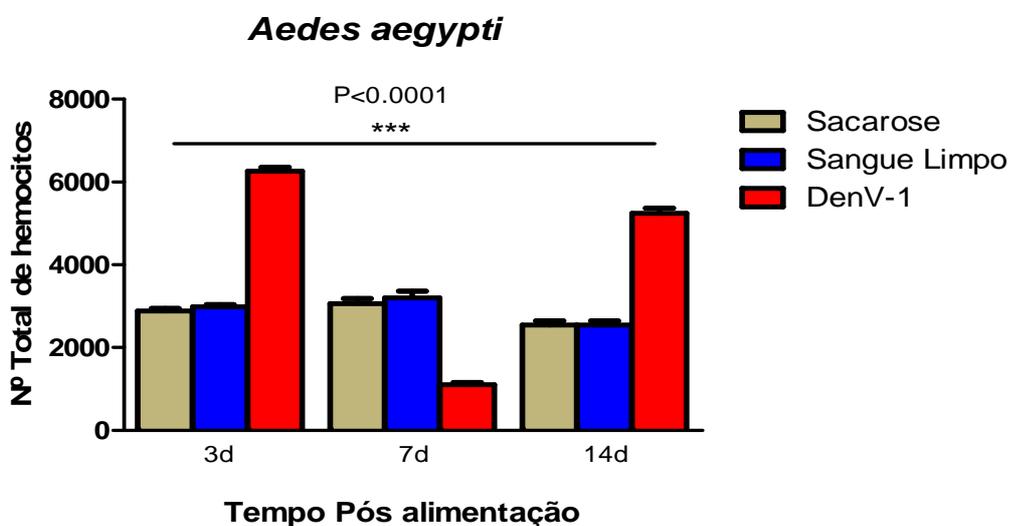
Todos os primers utilizados no estudo apresentaram eficiência entre 95-105% e produtos de amplificação específico para cada primer, ou seja, amplificações inespecíficas ou dímeros de primers, que podem interferir nos resultados, não foram visualizados nas análises de cada primer. Esses parâmetros são ideais, segundo o guia MIQE (BUSTIN et al., 2009), para validação dos primers utilizados em reações de PCR quantitativa.

### **8.3 *Aedes aegypti***

#### **8.3.1 Contagem Total de Hemócitos**

O número total de hemócitos aumentou significativamente nos mosquitos infectados com DENV-1 nos 3° e 14° dpi quando comparado tanto com o grupo controle sangue limpo quanto com o controle sacarose, porém no 7° dpi houve uma redução no total de hemócitos. Os grupos controle sangue limpo e controle sacarose, não diferiram estatisticamente entre si em todos os tempos observados (Figura 7).

**Figura 7** Número total de hemócitos observado em diferentes grupos experimentais de fêmeas de *Aedes aegypti* submetidos à infecção com o sorotipo 1 do Dengue Vírus.



Fonte: O autor

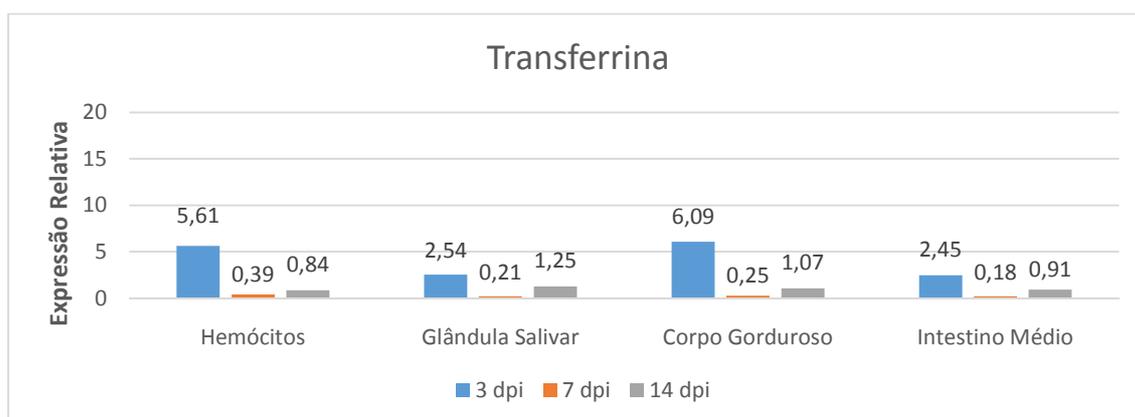
### 8.3.2 Expressão gênica da defensina e transferrina

O Dengue vírus induziu no *Ae. aegypti* o aumento da produção de defensina A e transferrina nos quatro tecidos estudados a partir do 3º dia após infecção, sendo o maior aumento de defensina (7,55 vezes) observado no corpo gorduroso e a menor expressão (3,11 vezes) no intestino médio. Um comportamento similar foi observado para a transferrina, com o corpo gorduroso apresentando o maior aumento (6,09 vezes), e o intestino médio o menor (2,45 vezes). Ao contrário, no 7º dpi, ocorreu a redução da expressão desses peptídeos em todos os tecidos, sendo no corpo gorduroso detectada a redução mais expressiva da defensina A (0,13 vezes), enquanto para a transferrina isto ocorreu no intestino médio (0,18 vezes). No 14º dpi, foram observados pequenos aumentos não significativos da expressão dos dois peptídeos em todos os tecidos. Comparando os níveis de expressão de defensina e transferrina, observou-se um mesmo padrão de expressão em cada tecido estudado nos três tempos investigados. Os dados referentes a defensina encontram-se na figura 8 e para transferrina na figura 9.

**Figura 8** Expressão da defensina A em *Aedes aegypti* induzida pelo DENV-1.

Fonte: O autor

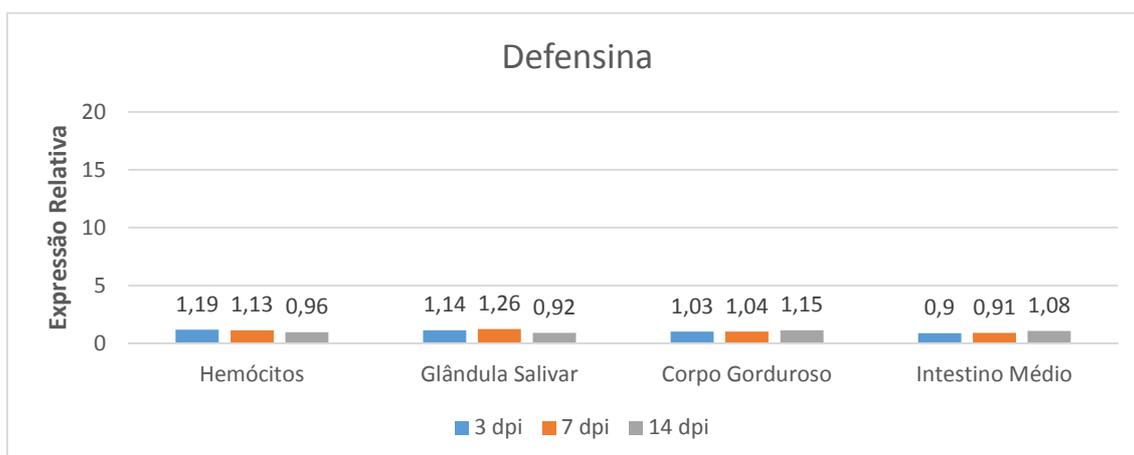
Nota: Avaliação foi feita por qRT-PCR usando diferentes 4 tecidos e três momentos de avaliação após a infecção oral de fêmeas com 10 dias de idade (3, 7 e 14 dpi) em duplicata biológica. Foi utilizado como referência mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais e como alvo mosquitos alimentados com sangue infectado com DENV-1. A expressão do gene foi normalizada com RP18S.

**Figura 9** Expressão da transferrina em *Aedes aegypti* induzida pelo DENV-1.

Fonte: O autor

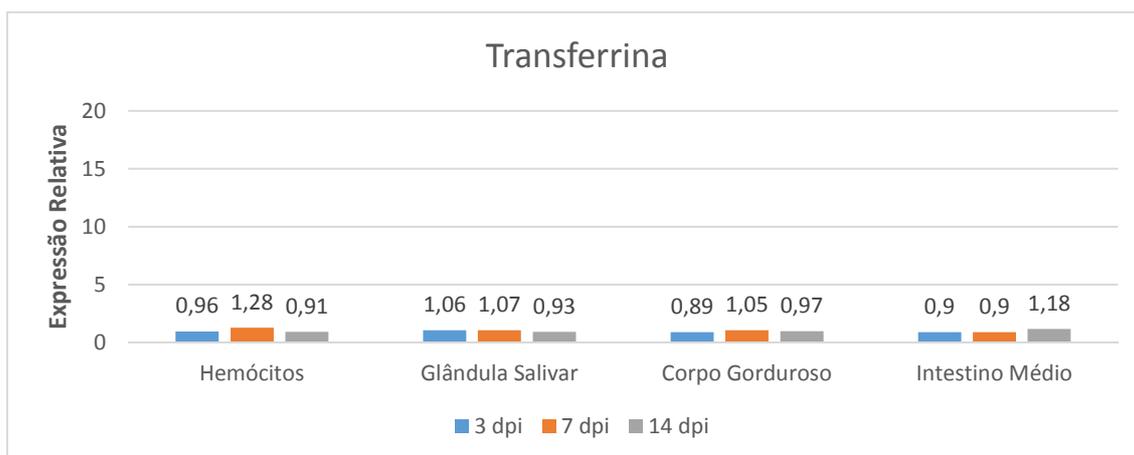
Nota: Avaliação foi feita por qRT-PCR usando diferentes 4 tecidos e três momentos de avaliação após a infecção oral de fêmeas com 10 dias de idade (3, 7 e 14 dpi) em duplicata biológica. Foi utilizado como referência mosquitos alimentados com sangue limpo e como alvo mosquitos alimentados com sangue infectado com DENV-1. A expressão do gene foi normalizada com RP18S.

Em uma outra análise, nossos resultados mostram que não há diferença de expressão significativa da defensina (Figura 10) e transferrina (Figura 11), em todos os dpi, quando comparado os tecidos dos mosquitos alimentados com sangue limpo (controle-sangue) e os mosquitos alimentados com sacarose (controle-sacarose). Logo, alimentação com sangue não foi determinante para induzir a expressão dos peptídeos estudados.

**Figura 10** Expressão da defensina A em *Aedes aegypti* induzida pelo DENV-1.

Fonte: O autor

Nota: Avaliação foi feita por qRT-PCR usando diferentes 4 tecidos e três momentos de avaliação após a infecção oral de fêmeas com 10 dias de idade (3, 7 e 14 dpi) em duplicata biológica. Foi utilizado como referência mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais e como alvo mosquitos alimentados com sacarose 10%. A expressão do gene foi normalizada com RP18S.

**Figura 11.** Expressão da transferrina em *Aedes aegypti* induzida pelo DENV-1.

Fonte: O autor

Nota: Avaliação foi feita por qRT-PCR usando diferentes 4 tecidos e três momentos de avaliação após a infecção oral de fêmeas com 10 dias de idade (3, 7 e 14 dpi) em duplicata biológica. Foi utilizado como referência mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais e como alvo mosquitos alimentados com sacarose 10%. A expressão do gene foi normalizada com RP18S.

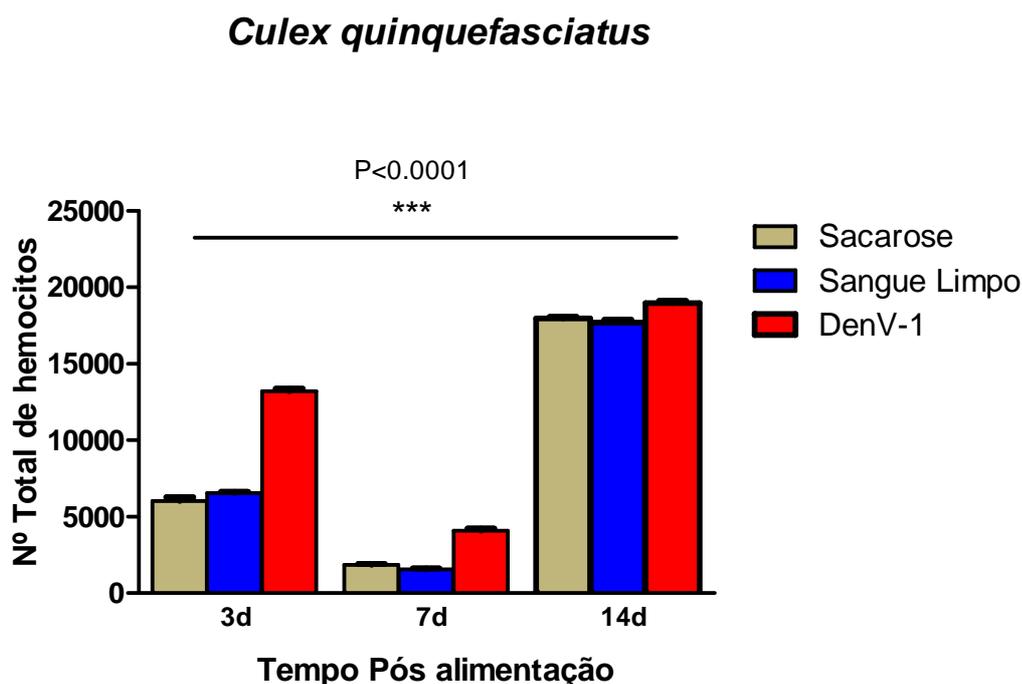
Por fim, através da análise da contagem total de hemócitos e a expressão gênica foi observado que em *Ae. aegypti* os níveis de expressão da defensina e transferrina acompanham a variação do número de hemócitos quando as fêmeas são alimentadas com sangue infectado com DENV-1 aumentando no 3º dpi e reduzindo no 7º dpi.

## 8.4 *Culex quinquefasciatus*

### 8.4.1 Contagem Total de Hemócitos

O número total de hemócitos em *Cx. quinquefasciatus* quando infectado com DENV-1 aumentou significativamente no 3° e 7° dpi quando comparado com os grupos controle sangue limpo e controle sacarose e o grupo alimentado com sacarose 10%, entretanto no 14° dpi não houve diferença estatística entre eles. O grupo controle sangue limpo e o controle sacarose não apresentaram diferença estatística no número total de hemócitos em todos os tempos estudados (Figura 12).

**Figura 12** Total do números de hemócitos dos grupos sacarose 10%, sangue limpo (controle), sangue infectado com DENV-1 em *Cx. quinquefasciatus*.



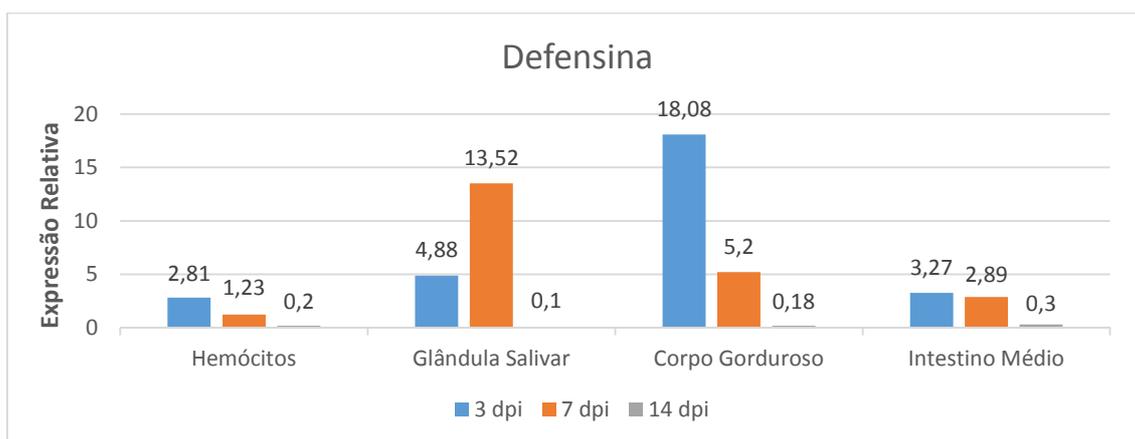
Fonte: O autor

### 8.4.2 Expressão gênica da defensina e transferrina

Após a infecção com o Dengue vírus, os três tecidos estudados do *Cx. quinquefasciatus* aumentaram a expressão da defensina no 3° dpi, cujo maior valor foi registrado no corpo gorduroso (18,08 vezes) e o (2,81 vezes) nos hemócitos. Analisando o 7° dpi, o nível de expressão da defensina diminuiu drasticamente no corpo

gorduroso, porém ainda elevado quando comparado ao grupo controle sangue limpo, e indiferente nos hemócitos, permanece similar no intestino médio e triplica nas glândulas salivares. A glândula salivar, nesse momento, foi a que apresentou o maior aumento do nível de expressão (13,52 vezes) e o intestino médio teve o aumento discreto (2,89 vezes). Para transferrina, foi observado que os níveis de expressão em todos os tecidos mantêm um padrão sem variação no 3° e 7° dpi. No 14° dpi, houve uma redução da expressão tanto de defensina quanto de transferrina em todos os tecidos, cujo a maior redução para defensina ocorreu na glândula salivar de 0,10 vezes e para transferrina, o intestino médio apresentou a menor redução de 0,25 vezes. Os dados para defensina encontram-se na figura 13 e para transferrina na figura 14.

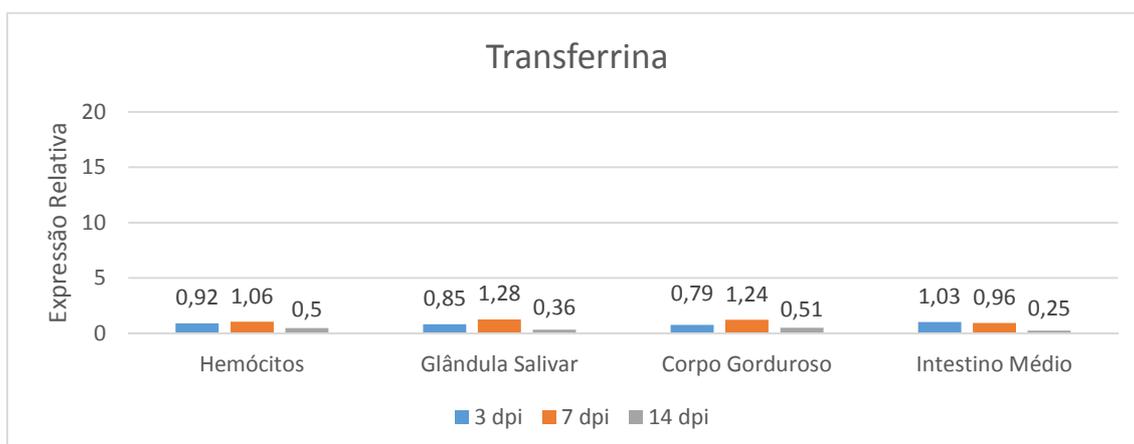
**Figura 13.** Expressão da defensina em *Cx. quinquefasciatus* induzida pelo DENV-1.



Fonte: O autor

Nota: qRT-PCR foi realizada usando os 4 tecidos e 3 tempos (3,7 e 14 dpi) diferentes em duplicata biológica. Foi utilizado como referência mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais e como alvo mosquitos alimentados com sangue infectado com DENV-1. A expressão do gene foi normalizada com RPS3.

**Figura 14.** Expressão da transferrina em *Cx. quinquefasciatus* induzida pelo DENV-1.

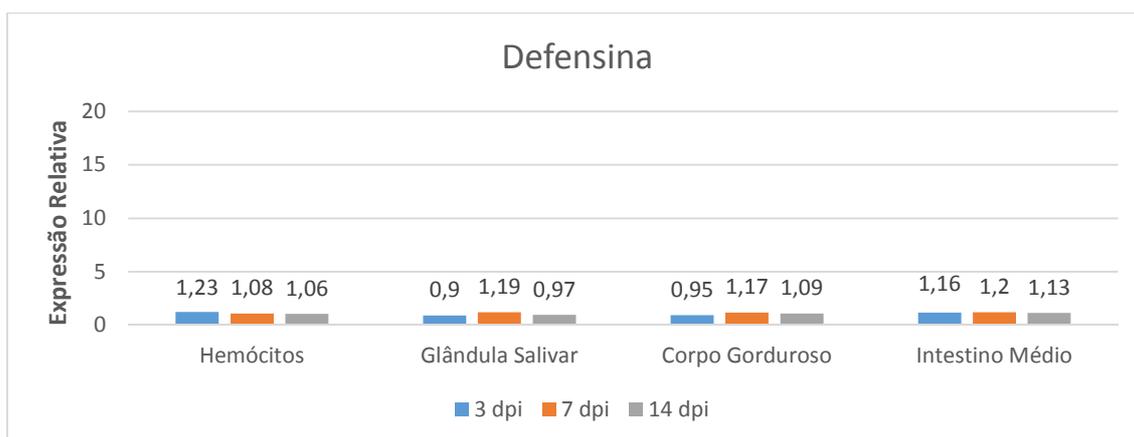


Fonte: O autor

Nota: qRT-PCR foi realizada usando os 4 tecidos e 3 tempos (3,7 e 14 dpi) diferentes em duplicata biológica. Foi utilizado como referência mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais e como alvo mosquitos alimentados com sangue infectado com DENV-1. A expressão do gene foi normalizada com RPS3.

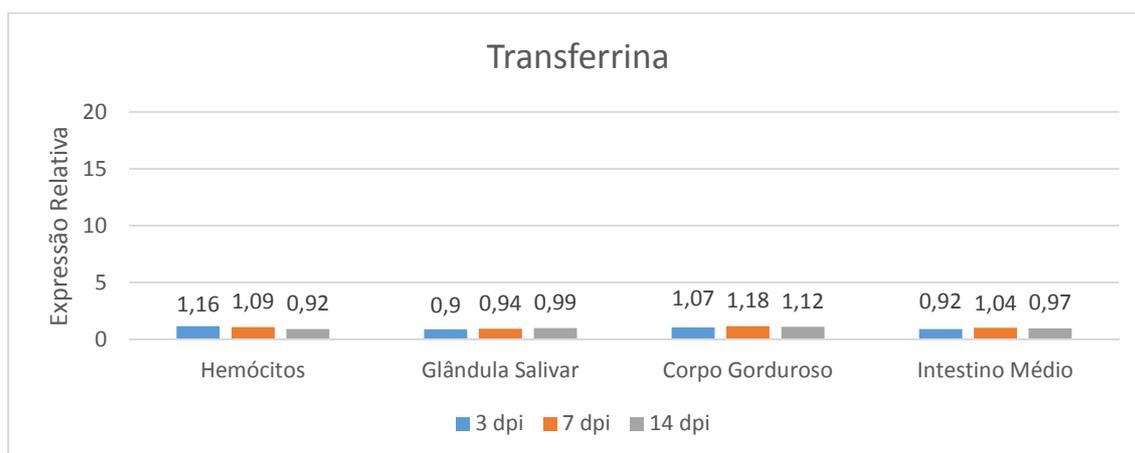
Assim como em *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* não apresentou diferença significativa da defensina (Figura 15) e transferrina (Figura 16) comparando-se os tecidos dos mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais e os mosquitos alimentados com sacarose nos três dpi estudados. Logo, alimentação com sangue, também, não é determinante para expressão dos peptídeos nessa espécie.

**Figura 15.** Expressão da defensina em *Cx. quinquefasciatus*.



Fonte: O autor

Nota: qRT-PCR foi realizada usando os 4 tecidos e 3 tempos (3,7 e 14 dpi) diferentes em duplicata biológica. Foi utilizado como referência mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais e como alvo mosquitos alimentados com sacarose 10%. A expressão do gene foi normalizada com RPS3.

**Figura 16.** Expressão da transferrina em *Cx. quinquefasciatus*.

Fonte: O autor

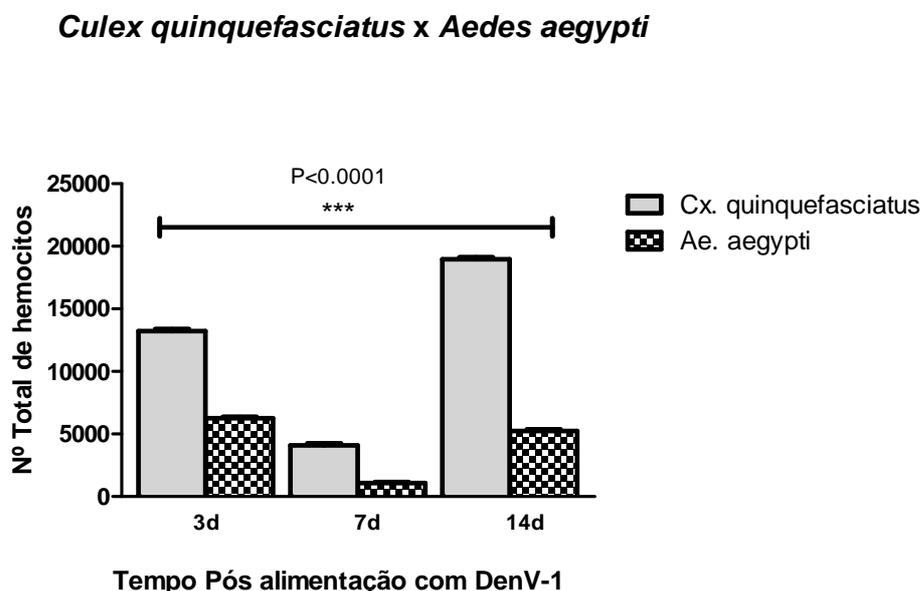
Nota: qRT-PCR foi realizada usando os 4 tecidos e 3 tempos (3,7 e 14 dpi) diferentes em duplicata biológica. Foi utilizado como referência mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais e como alvo mosquitos alimentados com sacarose 10%. A expressão do gene foi normalizada com RPS3.

Comparando a contagem total de hemócitos e a expressão da defensina e transferrina em *Cx. quinquefasciatus* foi observado que no 3° e 7° dpi houve um aumento tanto no número de hemócitos quanto na expressão da defensina em relação ao grupo controle sangue limpo. Por outro lado, uma resposta mais celular do que humoral parece ter ocorrido no 14° dpi, quando apenas quantitativo absoluto de hemócitos aumenta.

### 8.5 *Ae. aegypti* x *Cx. quinquefasciatus*

Comparando as duas espécies estudadas, há uma diferença no número total de hemócitos circulantes quando os mosquitos são infectados com DENV-1, cujo o *Cx. quinquefasciatus* apresenta um quantitativo absoluto de hemócitos, duas ou mais vezes, maior do que *Ae. aegypti* em todos os tempos pós alimentação com DENV-1 (Figura 17).

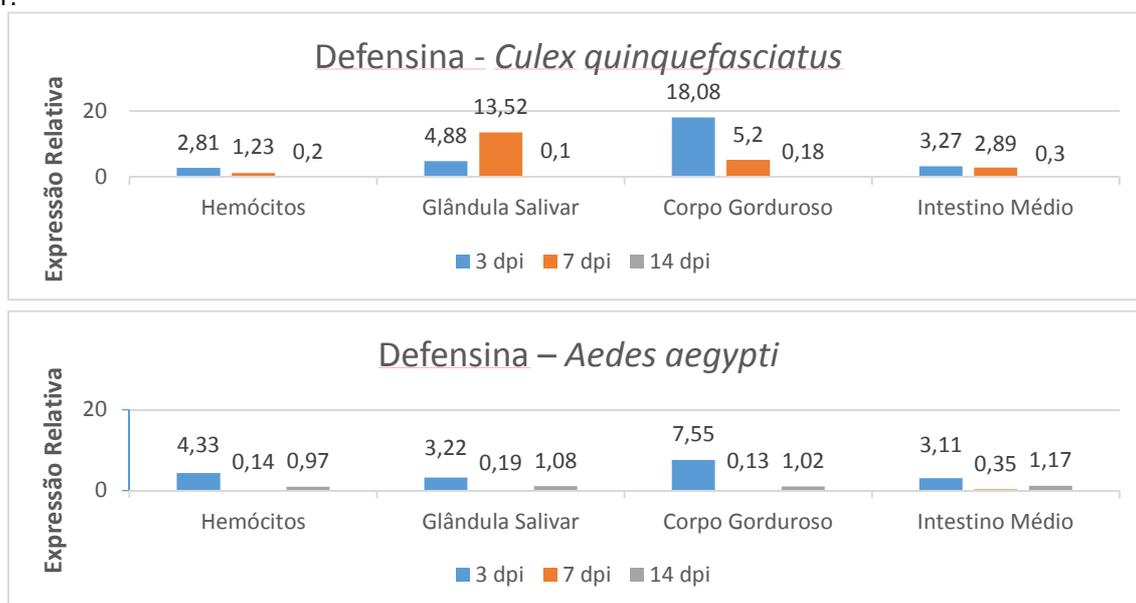
**Figura 17** Comparação entre o número total de hemócitos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* quando infectados com DENV-1.



Fonte: O autor

O nível de expressão da defensina em *Cx. quinquefasciatus* manteve-se maior no 3° e 7° dpi em relação ao *Ae. aegypti* (Figura 18), porém os níveis de transferrina tem sua expressão aumentada somente nesse último mosquito. No 3° dpi outro dado interessante é que o corpo gorduroso parece ser o principal tecido, em ambas as espécies, apresentar a maior expressão da defensina.

**Figura 18** Expressão da defensina em *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* infectados com DENV-1.



Fonte: O autor

## 9 DISCUSSÃO

O aumento nos níveis de defesa celular e humoral possam não ser suficientes para evitar a transmissão do Dengue Vírus pelo *Ae. aegypti*. Entretanto, o aumento na produção de hemócitos e os altos níveis de defensina parecem estar diretamente ligado a capacidade do *Cx. quinquefasciatus* debelar a infecção causada pelo Dengue Vírus. As variações observadas no quantitativo tanto de hemócitos quanto no níveis de defensina e transferrina podem estar ligada diretamente a capacidade desses mosquitos transmitirem o vírus explicando de certa forma a refratariedade do *Cx. quinquefasciatus* e a susceptibilidade do Dengue Vírus em *Ae. aegypti*.

O número total de hemócitos elevado presentes na hemolinfa dos insetos após uma infecção é considerada uma resposta comum (SILVA, 2002). Araújo (2011) verificou que estas células em *Ae. aegypti* aumentam em número após infecção com Dengue Vírus 2 (DENV-2), logo nossos resultados concordam com a literatura por apresentar resultados similares. Todavia, em nossos resultados revelam um aumento estatisticamente significativo na resposta imune celular no 3º dia após-infecção (dpi) com vírus DENV-1 sugerindo que sensibilização neste período, seja mais intensa, uma vez que o vírus passa a infectar a hemolinfa, além do intestino (SALAZAR *et al.* 2007). Em seguida foi observada uma redução significativa no número total de hemócitos no 7º dpi indicando provavelmente que o DENV-1 mantém uma relação estável com a fisiologia do inseto, uma vez que a produção de hemócitos foi regulada para baixo. O aumento estatisticamente significativo na população total de hemócitos, observado em nossos dados, no 14º dpi pode ser explicado pelo fato da infecção viral ter se estabelecido em outros órgãos reativando a resposta imune celular, corroborando com os resultados obtidos por Salazar *et al.* (2007) onde eles observaram que a infecção viral no abdome e glândulas salivares varia em torno de 76-95% ocorrendo um aumento no número total de hemócitos

Em nosso estudo, demonstramos que a contagem total de hemócitos em *Ae. aegypti* nos grupos controle-sangue e controle-sacarose não diferem entre si. Logo, a alimentação sanguínea por si só não induz a produção de hemócitos.

Em *Cx. quinquefasciatus*, observamos o aumento do número total de hemócitos quando infectado com DENV-1 nos três períodos analisados diferindo dos nossos resultados obtidos em *Ae. aegypti*, também infectados com DENV-1. Entretanto, um aumento estatisticamente significativo desses hemócitos em *Cx. quinquefasciatus*

comparando com os grupos controles só foi observado no 3° e 7° dpi, indicando uma grande ativação da produção dos hemócitos na hemolinfa. Resultados similares também foram encontrados por Brayner *et al.* (2007) que verificaram que após uma alimentação com sangue infectado por *Wuchereria bancrofti*, ocorreu também um aumento no número total de hemócitos de *Cx. quinquefasciatus*, mostrando que essa variação acontece após uma alimentação potencialmente infecciosa. Assim como no *Ae. aegypti*, em *Cx. quinquefasciatus* também foi verificado que a alimentação com sangue limpo de partículas virais não foi capaz de alterar a produção de hemócitos.

Neste trabalho, quando analisamos os antimicrobianos, a expressão da defensina foi maior no 3° dpi e caiu no 7° dpi em *Ae. aegypti* sendo o corpo gorduroso, obtido da carcaça do mosquito, o órgão que apresentou o maior nível de expressão deste antimicrobiano. Bonizzoni *et al.* (2012) observaram que o maior nível de expressão da defensina em *Ae. aegypti* infectados com DENV-2 ocorreu no 1° e 4° dpi também em carcaças seguida de redução no 14°dpi, padrão de resposta observado para glândulas salivares e intestino médio. Apesar de sorotipos diferentes do vírus, os nossos resultados corroboram com os de Bonizzoni *et al.* (2012), que sugerem que essa diminuição favoreça a capacidade do vírus sobreviver ao sistema imune do inseto.

Quando analisamos a expressão da defensina e transferrina em hemócitos, glândula salivar, intestino médio e corpo gorduroso de *Ae. aegypti*, foi observado o mesmo padrão, de diminuição da expressão desses antimicrobianos entre o 7° e 14° dpi. Luplertlop *et al.*, (2011) mostraram que em *Ae. aegypti* infectados com DENV-1, a glândula salivar apresenta o mesmo padrão de redução da expressão da defensina. Tchankouo-Nguetcheu *et al.*, (2010) observaram que a diminuição de expressão da transferrina em *Ae. aegypti* deve estar ligada a capacidade do patógeno sobreviver ao sistema imune do mosquito, corroborando os nossos resultados. Outro dado interessante é que a alimentação com sangue livre de partículas virais quando comparada com a alimentação com sacarose 10%, não apresentou variação na expressão da defensina e transferrina em *Ae. aegypti*. Esses resultados diferem com os dados obtidos por Harizanova *et al.* (2005), onde foi observado que alimentação de *Ae. aegypti* com sangue não infectado induziu a expressão de transferrina. É importante salientar que os autores utilizaram ferramentas de análise diferentes (Northern blotting e Western blotting) das utilizadas neste estudo.

Em *Cx. quinquefasciatus* foi observado que a expressão da defensina foi elevada no 3° e 7°dpi em todos os tecidos quando infectado com DENV-1 e nesse mesmo período não houve variação da expressão de transferrina. Essa é a primeira vez que foi reportada a expressão de defensina e transferrina para *Cx. quinquefasciatus* infectado com Dengue Vírus. A expressão desses antimicrobianos nessa espécie foram estudadas, principalmente, em infecções com *Wuchereria bancrofti* (KUMAR; PAILY, 2008; PAILY; KUMAR; BALARAMAN, 2007). Todavia, a alta expressão da defensina no corpo gorduroso e glândula salivar, que apresentam o pico de expressão no 3° e 7° dpi respectivamente, estão relacionadas com o fato da infecção do vírus ser debelada, o que elimina a competência vetorial do *Cx. quinquefasciatus* para este arbovírus. Apesar da literatura mostrar que a transferrina em mosquitos está ligada na atividade antimicrobiana contra nematódeos e bactérias (ABDEL-SAMIEE *et al.*, 2013), nossos resultados mostraram que a expressão da transferrina em *Cx. quinquefasciatus* não apresenta atividade antimicrobiana contra a infecção do DENV-1. Assim como em *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* não apresenta variação da expressão da defensina e transferrina quando é comparado o grupo alimentado com sangue livre de partículas virais com o grupo alimentado com sacarose 10%.

Comparando a expressão da defensina nas duas espécies, que possui seus maiores níveis de expressão no corpo gorduroso (TSAKAS; MARMARAS, 2010), além de expressar níveis maiores desses antimicrobianos, *Cx. quinquefasciatus*, ao contrário de *Ae. aegypti*, ainda mantém o nível de expressão elevado até 7° dpi. Esse mesmo padrão é observado no número total de hemócitos circulantes, que além de ter um maior número quando comparado a *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* mantém o número de hemócitos maior que os grupos controles no 3° e 7° dpi, portanto podemos sugerir que a resposta celular e expressão do antimicrobiano defensina podem está envolvida na resposta contra o DENV-1 nesta espécie. Logo, esses dados podem indicar a capacidade da competência vetorial para o DENV-1 entre essas duas espécies, uma vez que os mecanismos de defesa e a regulação da resposta imune após a infecção pode influenciar a manutenção da infecção pelo Dengue Vírus em diferentes espécies de mosquitos (BEHURA *et al.*, 2014) ou cepas da mesma espécie de *Ae. aegypti* (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012).

Quando comparamos nossos resultados da expressão do antimicrobianos transferrina levando em consideração a relação vetor-patógeno nossos resultados

diferem dos obtidos por Paily; Kumar; Balaraman, (2007) onde os autores observaram que quando *Cx. quinquefasciatus* foi infectado com *W. bancrofti* ocorreu uma maior variação na expressão de transferrina, Já os nossos resultados mostraram que o *Cx. quinquefasciatus* infectados com DENV-1 não apresenta variação na expressão de transferrina. Por outro lado, quando *Ae. aegypti* foi infectado com *W. bancrofti*, a expressão da transferrina não foi significativa (MAGALHÃES et al. 2008), enquanto que em nossos dados, *Ae. aegypti* infectado com DENV-1 apresentou uma expressão significativamente maior quando comparada ao controle. Estes resultados sugerem que a expressão da transferrina pelos mosquitos estudados não está diretamente envolvida na resposta aos patógenos utilizados nos estudos.

Entretanto, é importante salientar que outros peptídeos antimicrobianos não analisados no presente estudo possam ter papéis importantes no desenvolvimento, manutenção e transmissão da infecção viral do DENV-1 nas espécies estudadas.

## 10 CONCLUSÕES

- a) *Cx. quinquefasciatus* apresenta número total de hemócitos maior que *Ae. aegypti* quando infectado com DENV-1;
- b) *Cx. quinquefasciatus* apresenta aumento de expressão da defensina maior que *Ae. aegypti* quando infectado com DENV-1;
- c) Defensina tem aumento de expressão em todos os tecidos nas duas espécies estudada quando infectadas com DENV-1;
- d) Corpo gorduroso é o principal tecido que expressa defensina e transferrina em *Ae. aegypti* e defensina em *Cx. quinquefasciatus* quando infectados com DENV-1;
- e) Transferrina em *Cx. quinquefasciatus* não está ligada a resposta imune quando infectado com DENV-1;
- f) Alimentação com sangue limpo livre de partículas virais não interfere na produção de hemócitos e na expressão de defensina e transferrina;
- g) Fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* parecem apresentar uma resposta imune celular e humoral mais intensa do que *Ae. aegypti* quando infectados com DENV-1.

## REFERÊNCIAS

ABD EL-SAMIEE, E. M. et al. Cloning and Expression of the Recombinant Transferrin Protein from *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) and Study of Its Antimicrobial Activity. **Journal of Mosquito Research**, British Columbia, v. 3, n. 4, p. 21–32, 2013.

ARAÚJO, H. C. R. et al. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Micron (Oxford, England : 1993)**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 184–9, jan. 2008.

ARAÚJO, H. R. C. **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS HEMÓCITOS DO AEDES AEGYPTI E DO AEDES ALBOPICTUS E A RESPOSTA IMUNE DOS HEMÓCITOS DO *Aedes aegypti* APÓS A INFECÇÃO PELO Dengue virus.** 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil : situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.

BARTHOLOMAY, L. C. et al. Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect molecular biology**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 125–32, abr. 2004.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and their control**. ed: New York: Klumer Academic/Plenum, 2003.

BEHURA, S. K. et al. Influence of mosquito genotype on transcriptional response to dengue virus infection. **Functional & integrative genomics**, 6 maio 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798794>>. Acesso em: 30 maio 2014.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.

BISSET, J. A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Habana, v. 54, n. 3, p. 202–219, 2002.

BLANDIN, S. A.; LEVASHINA, E. A. Phagocytosis in mosquito immune responses. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 219, p. 8–16, 2007.

BOMBONATO, M. T.; GREGORIO, E. A. Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos em larvas de *Diatraea sacharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 867–879, 1995.

BONIZZONI, M. et al. Complex Modulation of the *Aedes aegypti* Transcriptome in Response to Dengue Virus Infection. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. 505–512, 27 nov. 2012.

- BRAGA, I. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.
- BRAYNER, F. A et al. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). **Micron (Oxford, 1993)**, v. 36, n. 4, p. 359–367, jan. 2005.
- BRAYNER, F. A et al. Haemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of the mosquito *Culex quinquefasciatus* to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. **Medical and veterinary entomology**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 112–120, mar. 2007.
- BULET, P.; STÖCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and peptide letters**, Gainesville, v. 12, n. 1, p. 3–11, jan. 2005.
- BUSTIN, S. A et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, New York, v. 55, n. 4, p. 611–622, abr. 2009.
- CABRERA, L. O.; BERNAL, S. I.; CARMEN, M. Los mosquitos (Diptera: Culiciidae) De Tlaxcala, México. **Folia Entomol**, Warsaw, v. 45, n. 3, p. 223–225, 2006.
- CARVALHO-LEANDRO, D. et al. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. **Acta tropica**, Basel, v. 124, n. 2, p. 113–119, nov. 2012.
- CASTILLO, J. C.; REYNOLDS, S. E.; ELEFTHERIANOS, I. Insect immune responses to nematode parasites. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 537–547, 2011.
- CHO, W. L. et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defensin A, from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 395–402, abr. 1996.
- COCIANCICH, S. *et al.* The inducible antibacterial peptides of insects. **Parasitology today**, Cambridge, v. 10, n. 4, p. 132–9, maio 1994.
- CONSOLI, R. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.
- DAS, S. *et al.* Protocol for dengue infections in mosquitoes (*Aedes Aegypti*) and infection phenotype determination. **Journal of visualized experiments**, Bonston, n. 5, p. 220, 2007.
- DE GREGORIO, E. *et al.* The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 21, n. 11, p. 2568–2579, 3 jun. 2002.

DIAS, L. B. A. *et al.* Dengue : transmissão , aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 2, p. 143–152, 2010.

FALLON, A M.; SUN, D. Exploration of mosquito immunity using cells in culture. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 263–78, 1 mar. 2001.

FORATTINI, O. P. *et al.* Ecológicos sobre mosquitos culicidae sistema da serra do mar , Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 12, p. 297–325, 1978.

FORATTINI, O. P. *et al.* Preferências alimentares de mosquitos culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 171–187, 1987.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti* Household water reservoirs and control of *Aedes aegypti*. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 676–677, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (BRASIL). **Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vektor - Manual de Normas Técnicas** -. 3. ed. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, 2001.

GAO, Y.; HERNANDEZ, V. P.; FALLON, A M. Immunity proteins from mosquito cell lines include three defensin A isoforms from *Aedes aegypti* and a defensin D from *Aedes albopictus*. **Insect molecular biology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 311–318, ago. 1999.

GEISER, D. L.; WINZERLING, J. J. Insect transferrins: multifunctional proteins. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1820, n. 3, p. 437–451, mar. 2012.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 215-217, 2004.

HALSTEAD, S. B. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Baltimore, v. 23, n. 5, p. 974–982, 1974.

HARIZANOVA, N. *et al.* *Aedes aegypti* transferrin. Gene structure, expression pattern, and regulation. **Insect molecular biology**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 79–88, jan. 2005.

HILLYER, J. F. Mosquito Immunity. In: SORDERHALL, K. (Ed.). **Invertebrate Immunity**. Nashville: Landes Bioscience and Springer Science, 2010. p. 218–238.

HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, London, v. 426, n. 6962, p. 33–38, 6 nov. 2003.

HULL, R.; KATETE, R.; NTWASA, M. Therapeutic potential of antimicrobial peptides from insects. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Cambridge v. 7, n. June, p. 31–47, 2012.

- KUMAR, B. A.; PAILEY, K. P. Identification of immune-responsive genes in the mosquito *Culex quinquefasciatus* infected with the filarial parasite *Wuchereria bancrofti*. **Medical and veterinary entomology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 394–8, dez. 2008.
- KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v. 62, p. 71–92, jan. 2008.
- LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco v. 4, n. 5, p. 1–9, jan. 2010.
- LAVINE, M.; STRAND, M. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 1295–1309, out. 2002.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, p. 219–229, 2001.
- LUPLERTLOP, N. et al. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following Infection with Dengue Virus. **PLoS pathogens**, San Francisco v. 7, n. 1, p. 1-15 , jan. 2011.
- MAGALHAES, T. et al. Experimental Parasitology Expression of defensin , cecropin , and transferrin in *Aedes aegypti* ( Diptera : Culicidae ) infected with *Wuchereria bancrofti* ( Spirurida : Onchocercidae ), and the abnormal development of nematodes in the mosquito. **Experimental Parasitology**, New York, v. 120, n. 4, p. 364–371, 2008.
- MARMARAS, V. J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cellular signalling**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 186–195, mar. 2009.
- MARTINA, B. E. E. Clinical course , pathogenesis and treatment of dengue : An overview. **Culture**, London, v. 32, n. 1, p. 1–4, 2011.
- MATSUYAMA, K.; NATORI, S. Purification of Three Antibacterial Proteins from the Culture Medium. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 263, n. 32, p. 17112–17116, 1988.
- NELSON, M. **Aedes aegypti**: biologia y ecologia. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 7. Ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
- NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, Washington, v. 342, n., p. 13, October 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Health topics Dengue**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>>. Acesso em: 23 mar. 2013a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Filariasis**. Disponível em: <[http://www.who.int/lymphatic\\_filariasis/en/](http://www.who.int/lymphatic_filariasis/en/)>. Acesso em: 22 mar. 2013b.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: Guías pra su prevención y control**. Ed. Washington, DC, 1995.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)\* in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2008**. Disponível em: <<http://www1.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2008.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Dados da dengue no Brasil, 2013**. Disponível em: <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3159&Itemid=1](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3159&Itemid=1)>. Acesso em: 16 out. 2013.

PAILY, K. P.; KUMAR, B. A.; BALARAMAN, K. Transferrin in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), up-regulated upon infection and development of the filarial parasite, *Wuchereria bancrofti* (Cobbold) (Spirurida: Onchocercidae). **Parasitology research**, v. 101, n. 2, p. 325–330, jul. 2007.

PAN, X. et al. Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 1, p. 1–9, 3 jan. 2012.

PARIKH, G. **Cell biology of pathogen-hemocyte interactions in the mosquito innate immune response**. 2011. Theses (Doctor of Philosophy) – Iowa State University, Ames, 2011.

REID, W. R. et al. The Transcriptome Profile of the Mosquito *Culex quinquefasciatus* following Permethrin Selection. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. 1–12, 2012.

ROSALAES, C. Phagocytosis , a cellular immune response in insects C Rosales Abstract Insects like many other organisms are exposed to a wide range of infectious agents . Defense against these agents is provided by innate immune systems , which include physical barrier. **Insect Science Journal**, Tucson, v. 8, p. 109–131, 2011.

SALAZAR, M. J.; MANCADA, M. I. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas em Bogotá. **Biomédica**, Bogotá, v. 24, p. 386–387, 2004.

SILVA, C. C. Aspectos do Sistema Imunológico dos Insetos. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 24, p. 68–72, 2002.

SIMMONS, C. P. et al. Review article: Dengue. **New England Journal Medicine**, Boston, v. 366, p. 1423–1432, 2012.

STRAND, M. The insect cellular immune response. **Insect Science**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 1–14, 22 jan. 2008.

STRAND, M.; PECH, L. IMMUNOLOGICAL BASIS FOR. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 40, p. 31–56, 1995.

TCHANKOUO-NGUETCHEU, S. et al. Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. **PloS one**, San Francisco, v. 5, n. 10, p. 1–11, jan. 2010.

THAI, K. T. D.; ANDERS, K. L. The role of climate variability and change in the transmission dynamics and geographic distribution of dengue. **Experimental biology and medicine**, Maywood, v. 236, n. 8, p. 944–954, 1 ago. 2011.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Introduction to the Study of Insects**. 7. ed. Belmont: Brooks/Cole, 2005.

TSAKAS, S.; MARMARAS, V. J. Insect immunity and its signalling : an overview. **Insect Science Journal**, Tucson, v. 7, p. 228–238, 2010.

VISHVANATH, N *et al.* Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector, **Science**, Washington, v. 316, p. 1718-1723, 2007.

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

YI, H.-Y. et al. Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v.1, n.1, p. 1-16, 9 maio 2014.

YOSHIGA, T. et al. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 23, p. 12337–12342, 11 nov. 1997.