

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo de genes relacionados à resposta imune
de vetores brasileiros de *Plasmodium vivax*.

por

Sabrina Barbosa de Oliveira

Belo Horizonte
Fevereiro de 2009

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo de genes relacionados à resposta imune
de vetores brasileiros de *Plasmodium vivax*.

por

Sabrina Barbosa de Oliveira

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Luciano Andrade Moreira

Co-Orientação: Cristiana F. A. de Brito

Jeronimo Conceição Ruiz

Belo Horizonte
Fevereiro de 2009

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

O48e
2009

Oliveira, Sabrina Barbosa de.

**Estudo de genes relacionados à resposta imune
de vetores brasileiros de *Plasmodium vivax* /
Sabrina Barbosa de Oliveira. – Belo Horizonte, 2009.**

xv, 72 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 73 - 80

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Malária Vivax/transmissão 2. *Plasmodium vivax*/parasitologia 3. Anopheles/parasitologia 4. Anopheles/imunologia I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Orientação) III. Ruiz, Jerônimo Conceição (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estudo de genes relacionados à resposta imune
de vetores brasileiros de *Plasmodium vivax*.

Por

Sabrina Barbosa de Oliveira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra Cristiana Ferreira Alves de Brito (Presidente)

Prof. Dr.Marcos Horácio Pereira

Prof. Dr.Breno de Melo Silva

Suplentes: Roberta Lima Caldeira

Dissertação defendida e aprovada em: 19/02/2009

Agradecimentos

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pelo ambiente agradável e de grandes trocas de conhecimento.

À FIOCRUZ - Amazônia e ao INPA, por possibilitarem que os experimentos de infecção dos mosquitos fossem realizados.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao Seminário Laveran & Deane, por possibilitar a discussão deste trabalho e seu aperfeiçoamento, bem como por contribuir o com meu crescimento como cientista. Agradeço em especial às excelentes contribuições de meus tutores Dr. Paulo Ribolla, Maria Anice Sallum e Jayme Neto.

Ao Dr. Luciano Moreira, pelo exemplo como pessoa e como pesquisador, pelo apoio, dedicação e incentivo. Agradeço a confiança e o esforço para continuar sendo um orientador presente, ainda que longe, estando atento a cada detalhe do trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, pela compreensão, paciência e pela vontade em ver meu crescimento.

À Dra. Cristiana Brito, pela contribuição em todo o trabalho, antes mesmo que o vínculo de co-orientação fosse formalizado. Agradeço pela paciência, pela constante disposição em ajudar e pela motivação.

Ao Dr. Jerônimo Ruiz pela ajuda nas análises de bioinformática.

À Dra. Laila Nahum pela ajuda nas análises filogenéticas, pela imensa disposição em ensinar e por compartilhar comigo a paixão por esse assunto.

À Dra. Ana Paula Madureira pela contribuição muito além das análises estatísticas. Obrigada pelo incentivo e por todo o apoio.

À Dra. Taís Nóbrega de Sousa pela ajuda nas análises das sequências.

À Dra. Luzia Helena Carvalho pela coordenação do laboratório e do insetário e pelo constante apoio.

À Alice Sabatino pela boa vontade em organizar os pedidos, os reagentes e o laboratório.

Ao Geraldo pela preparação dos materiais.

À Izabela Ibraim, pelo aprendizado com sua dedicação, seriedade, motivação e inteligência.

Ao Armando Menezes e ao Antônio Mauro, pela amizade, excelente companhia, pelo interesse em meu projeto, por nossas longas e proveitosas discussões e pela constante disposição em ajudar.

Ao Bruno Rocha, pela amizade e pela ótima companhia (apesar de todos os contratempos que passamos) nos experimentos, principalmente nas madrugadas de dissecação de mosquitos em Manaus.

Ao Walison e à Fernanda Rezende pelo trabalho na manutenção das colônias de mosquitos.

À toda equipe do Laboratório de Malária, que propiciam um ambiente tão agradável para a realização dos trabalhos.

À equipe da FIOCRUZ - Amazônia e do INPA pelo auxílio nos experimentos em Manaus. Dr. Roberto, Dr. Tadei, Dr. Sérgio Luz, Mota, Waléria, Érica, Carol, Silvano, Gláucio e seu Pedro, muito obrigada!

Ao Roberto e à Ângela, por me receberem em Manaus, por terem feito com que me sentisse em casa e por possibilitarem que uma etapa tão importante neste trabalho fosse realizada.

Ao Dr. Alexandre Peixoto pela ajuda dada pessoalmente, por telefone e pelo muitos e-mails no desenho dos iniciadores degenerados e na realização do PCR em tempo real.

À Carla Gentile pela contribuição em diversas etapas deste projeto e pela disposição, mesmo de longe, em ajudar.

Ao Dr. Fábio Brayner e ao Dr. Luiz Alves pelo carinho e enorme hospitalidade. Agradeço pelas discussões sobre meu projeto e o tempo que passamos juntos.

À minha mãe Raquel pelo investimento, pelo carinho, apoio durante todo o trabalho e pela alegria nesta nova etapa.

À Fabi, por sempre acreditar em meu potencial e pelo incentivo.

Ao Fred e a Vanessa pelo imenso apoio em todas as etapas, por me inspirarem em tantos aspectos e pela ajuda em especial após o acidente com o computador. Obrigada pelo empréstimo do computador, pelo tempo dispensado em me ajudar e pelo carinho em fazer isso.

Ao Flávio pelo exemplo como pessoa e na organização das prioridades, pelo apoio, incentivo, amor e amizade que me ajudaram (e ajudam) muito.

Ao meu cunhado Léo por me emprestar o computador e pela disposição em ajudar.

À Patrícia Moreira e à Lílian pelas orações, pelo carinho e por, mesmo sem muita simpatia pelos mosquitos, se interessaram muito pelo meu projeto e torceram por ele.

Aos petequeiros do laboratório (e aos agregados), por deixarem minha casa mais alegre às segundas- feiras.

À Deus, por permitir a realização deste trabalho e pelas pessoas com que convivi durante esses dois anos, que além de extremamente competentes, se tornaram muito especiais para mim.

Sumário

Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas	XI
Lista de Abreviaturas	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A malária.....	16
1.2 Os vetores dos parasitas da malária	17
1.2.1 Vetores brasileiros	18
1.3 Interação parasito-vetor	19
1.4 Sistema imune dos mosquitos.....	20
1.4.1 Resposta humoral.....	21
1.4.2 Resposta celular	24
1.4.3 FBN9.....	24
1.4.4 TEP 1	25
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 Manutenção da colônia de <i>A. aquasalis</i>	29
4.2 Coleta de mosquitos.....	29
4.3 Identificação morfológica dos mosquitos	30
4.4 Extração de DNA dos mosquitos.....	30
4.5 Identificação molecular dos mosquitos.....	31
4.6 Desenho dos iniciadores degenerados	32
4.7 Amplificação dos genes selecionados em diversas espécies de anofelinos.....	34
4.8 Sequenciamento dos genes TEP e FBN9 nas diferentes espécies de anofelinos brasileiros.....	34
4.9 Análise da conservação das sequências identificadas.....	36
4.10 Infecção de <i>A. aquasalis</i> com <i>P. vivax</i>	36
4.11 Extração do RNA	37
4.12 Síntese de cDNA.....	37
4.13 Quantificação da expressão de Tep1 e TepX em <i>A. aquasalis</i> e infectados com <i>P. vivax</i>	38
4.14 Análise da filogenia do gene FBN9	41
5 RESULTADOS	44
5.1 Identificação dos mosquitos.....	44
5.2 Amplificação de FBN9 e Tep1 nos anofelinos brasileiros.	45
5.3 Sequenciamento dos genes alvo.	50
5.4 Análise da conservação entre as sequências	56
5.4.1 FBN9.....	56
5.4.2 TepX	57
5.5 Análise filogenética de FBN9	57
5.6 Quantificação da expressão do RNA mensageiro de Tep1 e TepX em <i>A. aquasalis</i> infectados e não infectados com <i>P. vivax</i>	60
6 DISCUSSÃO	65
6.1 Identificação dos mosquitos.....	65
6.2 Análise das sequências parciais do gene	66
6.2.1 FBN9	66

6.2.2 Tep1	67
6.2.3 TepX	68
6.3 Quantificação da expressão dos genes alvo	68
6.4 Filogenia de FBN9	69
7 CONCLUSÕES	72
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	73

Lista de Figuras

Figura 1: Mapa de risco de malária por município de infecção, Amazônia Legal, 2007.....	177
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> dentro do mosquito	20
Figura 3: Alinhamento da seqüência da proteína FBN9 de <i>A. gambiae</i> com sua provável ortóloga identificada em <i>A. aegypti</i>	46
Figura 4: Alinhamento da seqüência da proteína Tep1 de <i>A. gambiae</i> com sua provável ortóloga identificada em <i>A. aegypti</i>	47
Figura 5: Géis com os produtos das PCRs realizadas com os iniciadores degenerados.	499
Figura 6: Alinhamento utilizando o algoritmo Clustal entre as seqüências encontradas nos anofelinos brasileiros e a seqüência referência de <i>A. gambiae</i>	53
Figura 7: Alinhamento das seqüências de Tep1-Tep4 obtidas nos vetores brasileiros e as regiões correspondentes de Tep1 e Tep4 de <i>A. gambiae</i>	54
Figura 8: Representação do Alinhamento de TepX de <i>A. gambiae</i> (AGAP008366) e TepX identificada em <i>A. aquasalis</i>	55
Figura 9: Árvore filogenética de seqüências parciais do gene FBN9 de 10 espécies de anofelinos	59
Figura 10: Expressão de Tep1 em carcaças de mosquitos infectados com <i>P.vivax</i> e mosquitos controle	63
Figura 11: Expressão de TepX em carcaças e intestinos de mosquitos infectados com <i>P.vivax</i> e de mosquitos controle	64

Lista de Tabelas

Tabela 1: Iniciadores degenerados desenhados.	34
Tabela 2: Iniciadores para a avaliação da expressão dos genes de resposta imune.....	40
Tabela 3: Sequências utilizadas no estudo da filogenia de FBN9.	43
Tabela 4: Identificação molecular das espécies identificadas morfológicamente.	45
Tabela 5: Resultado do BlastX realizado com as sequências obtidas a partir da amplificação com os iniciadores de FBN9, contra o banco de dados de <i>A.gambiae</i>	51
Tabela 6: Resultado do BlastX realizado com as sequências obtidas a partir da amplificação com os iniciadores de TEP1 (5step_deg1 e3step_deg1), contra o banco de dados de <i>A.gambiae</i>	51
Tabela 7: Resultado do BlastX realizado com as sequências obtidas a partir da amplificação com os iniciadores de Tep1 (5step_deg2 e3step_deg2), contra o banco de dados de <i>A.gambiae</i>	52
Tabela 8: Resultado do cálculo de d_N e d_S realizado no programa <i>MEGA</i> . Valores de d_N e d_S expressos juntamente com o erro padrão.	57
Tabela 9: Eficiência dos iniciadores utilizados no PCR em tempo real.	60
Tabela 10: Quantificação relativa da expressão de Tep1 em carcaças de mosquitos <i>A. aquasalis</i> infectados e não-infectados através de PCR em tempo real.	61
Tabela 11: Quantificação relativa da expressão de TepX em carcaças de mosquitos <i>A. aquasalis</i> infectados e não-infectados através de PCR em tempo real.	62
Tabela 12: Quantificação relativa da expressão de TepX em intestinos de mosquitos <i>A. aquasalis</i> infectados e não-infectados através de PCR em tempo real.	62

Lista de abreviaturas

- ATP – *Adenosine Triphosphate* (Trifosfato de Adenosina)
- BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
- cDNAs – *complementar DNA* (Sequência complementar de DNA)
- CTL – *C-Type Lectins*
- Ct – Threshold cycle
- DEPC - Dietilpirocarbonato
- DNA – *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)
- dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- DTT – Ditioneitol
- EB – *Elution Buffer* (Tampão de Eluição)
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
- FBN - *Fibrinogen-like domain immunlectins*
- GALE – *galactoside-binding lectins*
- GNBP – *Gram negative binding protein*
- GTR - *General Time Reversible*
- Imd – *Immune deficiency*
- INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
- IPA – Incidência Parasitária Anual
- IPTG – *Isopropyl-beta-D-thiogalactosyranoside*
- ITS2 - Internal Transcribed Spacer 2 (Espaço Interno Transcrito 2)
- JAK-STAT – Janus Kinase Signal Transducer and Activators of Transcription
- LRRD7 – *Leucine-Rich Repeat Domain*
- MCMC - *Markov chain Monte Carlo*
- MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
- mtDNA – DNA mitocondrial
- Pb= pares de bases
- PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- pp - probabilidade a posteriori
- PRGP – *Peptidoglycan recognition protein*
- RAPD- *Random Amplified Polymorphic DNA* (DNA polimórfico amplificado ao acaso)
- rDNA – DNA ribossomal
- RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de Fragmento de Restrição)
- RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucléico)

SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

TEP - *Thioester containing protein* (Proteína contendo domínio tioéster)

T_m = Temperatura de anelamento.

X-Gal – *5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside*

RESUMO

A malária é uma doença de grande impacto na saúde pública, em diferentes regiões do mundo, inclusive no Brasil. O mosquito anofelino é vetor dos protozoários que causam a doença, constituindo parte fundamental na transmissão. O sistema imune dos mosquitos apresenta função essencial no que determina a competência vetorial desses insetos, sendo, portanto, alvo importante para estudos sobre vacinas de bloqueio de transmissão e de genes para o desenvolvimento de mosquitos transgênicos refratários ao plasmódio. Em *Anopheles gambiae*, vários genes foram descritos e caracterizados quanto à resposta contra os protozoários causadores da malária. Entre esses genes, o codificador da FBN9 (uma imunoelectina da família dos fibrinogênios) e das proteínas da família Tep (*Thioester containing protein*) apresentaram resultados interessantes que demonstram uma resposta contra *Plasmodium* spp. e outros microorganismos. No entanto, os estudos sobre a imunidade dos vetores brasileiros, bem como sobre a resposta à infecção por *Plasmodium vivax*, são escassos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar os genes FBN9 e Tep1, por meio da amplificação, seqüenciamento, análises das seqüências e da filogenia dos genes e ainda pela quantificação da expressão destes genes em mosquitos infectados com *P. vivax*. Os genes correspondentes à FBN9, e de duas proteínas da família Tep (Tep1 e TepX) foram identificados e suas seqüências parciais foram obtidas em *Anopheles aquasalis*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles albitarsis* e *Anopheles nuneztovari*. As análises demonstraram alto grau de conservação destas proteínas entre as diferentes espécies, apresentando grande quantidade de substituições sinônimas, o que sugere que estas proteínas possuem importante função e/ou estrutura. A árvore filogenética gerada para FBN9 mostra que os anofelinos brasileiros e os anofelinos africanos fazem parte de dois agrupamentos distintos. As análises de expressão gênica demonstraram que Tep1 é 4,7 vezes mais expresso em carcaças de mosquitos infectados em relação aos controles e para TepX, apesar de não haver diferença significativa na sua expressão em carcaças de mosquitos infectados em relação ao controle, sua expressão no intestino foi 6,5 vezes maior em mosquitos infectados. Esses resultados demonstram que FBN9 e TepX possuem grandes evidências de serem importantes na resposta imune dos anofelinos brasileiros contra *P.vivax*. No entanto, outros estudos, como o silenciamento dessas proteínas, são essenciais para afirmações mais conclusivas.

ABSTRACT

Malaria is one of the major public health problems in the world, including Brazil. Anopheline mosquitoes are the vectors of the parasites responsible for human malaria. Mosquitoes have developed efficient immune responses against malaria parasites. The mosquito's immune system presents an essential part determining the vectorial competence to plasmodia, being an important target for developing alternative approaches for controlling malaria, such as transmission blocking vaccines and transgenic mosquitoes to block malaria parasites. Many anti-malaria immunity genes were already studied in *Anopheles gambiae*, and FBN9 and TEPs (Thioester Containing Proteins) have been described as important candidates, especially against *Plasmodium* spp. Since most mosquito immunity research focus on malaria vectors which are not present in Brazil, this project aimed to study the immune-related genes FBN9 and TEPs of Brazilian mosquitoes by amplifying, sequencing, analyzing the gene's phylogeny and quantifying the mRNA expression on infected mosquitoes with *Plasmodium vivax*. FBN9 and two proteins from the Tep family (Tep1 and TepX) were identified and the partial sequences were obtained in *Anopheles aquasalis*, *Anopheles darling*, *Anopheles albitarsis* and *Anopheles nuneztovari*. The analyses showed high conservation between these proteins in the different species, presenting a large number of synonymous substitutions, suggesting that these proteins should have important structure and/or function. The phylogeny tree from FBN9 showed Brazilian anophelines and African anophelines in two separated groups. The expression analyses placed that Tep1 is 4.7 fold more expressed in carcasses from infected *P. vivax* mosquitoes and TepX, despite not presenting relevant difference between the expression in carcass, in midguts it is 6.5 times more expressed in infected mosquitoes. These results demonstrate that FBN9 and TepX have high evidences to have an important role in the mosquito immune response against *P. vivax*. Further studies, such as silencing of these proteins, are essential to have solid conclusive information.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A malária

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e que pode acometer diferentes espécies de vertebrados. Esses protozoários possuem ciclo heteroxênico e geralmente mosquitos do gênero *Anopheles* atuam como seus vetores. Dentre as várias espécies conhecidas do parasita, quatro são capazes de infectar o homem, sendo elas *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*. Alguns artigos indicam também *Plasmodium knowlesi* como parasita humano ¹.

Em 2008, 109 países foram considerados endêmicos para malária e, aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas com risco ². Estima-se que 200 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente, resultando em aproximadamente um milhão de mortes por ano ^{3,4}.

No Brasil, a situação também é preocupante, com cerca de 500 mil casos anualmente, sendo que esses se concentram na região da Amazônia Legal e *P. vivax* é a espécie predominante, responsável por aproximadamente 80% dos casos em 2007 ⁵ (Figura 1).

As medidas de controle recomendadas pela Organização Mundial de Saúde se baseiam principalmente no diagnóstico rápido, via microscopia, seguido pelo tratamento dos pacientes, na aplicação de inseticidas nas casas e na utilização de mosquiteiros impregnados com inseticidas ². É importante ressaltar que cada país deve avaliar a adequação desses métodos de controle para cada situação. No Brasil, por exemplo, a utilização de mosquiteiros impregnados é recente e restrita a alguns municípios dos estados do Amazonas e Acre. Apesar destes esforços, tais medidas ainda são insuficientes para o controle da malária e por isso são necessárias pesquisas para o desenvolvimento de vacinas, novas drogas e novos inseticidas, bem como estudos que ampliem o conhecimento sobre a doença e a interação parasito-vetor para que novas alternativas visando o controle sejam desenvolvidas.

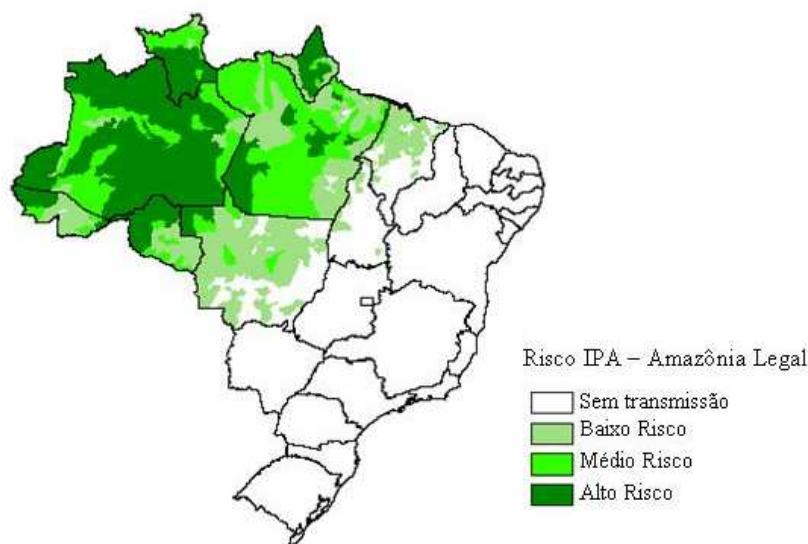


Figura 1: Mapa de risco de malária por município de infecção, Amazônia Legal, 2007. Incidência Parasitária Anual (IPA) = número de casos/1000 habitantes. Baixo risco: IPA < 10; Médio risco: IPA 10-49; Alto risco: IPA ≥ 50. Fonte: SIVEP-Malária ⁵.

1.2 Os vetores dos parasitas da malária

Os transmissores dos parasitas causadores da malária humana são insetos do gênero *Anopheles*. Esses mosquitos pertencem ao filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera e família Culicidae. Essa família compreende três subfamílias: Toxorhynchitinae, Culicinae e Anophelinae, sendo que, de acordo com Consoli & Oliveira (1994) ⁶, essa última se divide nos gêneros *Anopheles* (cosmopolita), *Chagasia* (restrito à região neotropical) e *Bironella* (restrito apenas à região australiana). O gênero *Anopheles* compreende seis subgêneros, sendo que no Brasil os vetores de malária pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* ⁶.

Os anofelinos, assim como outros mosquitos, são holometábolos com o desenvolvimento das fases imaturas ocorrendo na água. Nos adultos, apenas as fêmeas são hematófagas e, portanto, possuem maior interesse no que se refere à epidemiologia das doenças transmitidas por mosquitos ⁷.

Os principais vetores dos parasitas da malária humana são *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus* (África); *Anopheles stephensi* e *Anopheles culicifacies* (Ásia); *Anopheles albimanus* e *Anopheles pseudopunctipennis* (México e América Central) e *Anopheles darlingi*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles nuneztovari* e *Anopheles albitarsis* (América do Sul) ⁷⁻⁹. Alguns estudos consideram também *Anopheles albimanus* entre os principais vetores de malária da América do Sul ¹⁰.

A. gambiae, o principal vetor mundial, é considerado um complexo de sete espécies crípticas contendo *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, *Anopheles merus*, *Anopheles melas* e *Anopheles bwambae* e *Anopheles quadriannulatus* A e B¹¹. *A. gambiae* e *A. arabiensis* são os principais vetores de *Plasmodium* na África Sub-Sahariana, *A. merus* e *A. melas* possuem importância intermediária no que se refere à transmissão de malária, já as outras três espécies do complexo são altamente zoofílicas sendo raramente expostas ao *P. falciparum*¹².

1.2.1 Vetores brasileiros

Das 54 espécies de anofelinos encontradas no Brasil, 33 ocorrem na região amazônica e destas, 13 espécies foram encontradas naturalmente infectadas por *Plasmodium* spp. (*A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. albimanus*, *A. nuneztovari*, *Anopheles triannulatus*, *Anopheles mattogrossensis*, *Anopheles braziliensis*, *Anopheles mediopunctatus*, *Anopheles peryassui*, *Anopheles oswaldoi*, *Anopheles strodei*, *Anopheles galvaoii* e *Anopheles rondoni*), podendo apresentar papel como vetores primários ou secundários^{8,13-15}.

A. darlingi é o principal vetor no Brasil, sendo considerado o mais antropofílico, endofílico e endofágico¹⁵. Está presente em grande parte do interior do país, além de amplamente distribuído na América do Sul^{6,15,16}.

A. aquasalis possui uma distribuição mais restrita, sendo frequentemente encontrado no litoral, visto que possui preferência por águas cuja salinidade varia entre 0,4 e 38,4%^{6,17}. É considerado vetor primário da malária em determinadas regiões como zonas áridas do Nordeste, Pará, Amapá e na Amazônia, além de já ter sido encontrado infectado naturalmente nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo⁶. Uma grande vantagem em seu estudo se deve ao fato de ser possível sua criação em laboratório, e procedimentos de manutenção da colônia serem bem estabelecidos¹⁸, o que, apesar dos esforços de vários grupos de pesquisa, ainda não foi possível com o *A. darlingi*.

A. nuneztovari é encontrado do norte da América do Sul até o Panamá e trata-se de uma espécie neotropical importante para a transmissão da malária nas Américas⁹. Estudos com diferentes populações de *A. nuneztovari* sugerem a presença de um complexo de espécies com no mínimo duas espécies crípticas alopátricas cuja especiação teria ocorrido recentemente^{9,14,19}.

A. albitarsis é considerado um complexo de várias espécies crípticas que não podem ser distinguidas morfológicamente na fase adulta e das quais algumas apresentam papel importante na transmissão da malária^{6,20,21}. Membros desse complexo possuem grande

distribuição, além de alta variabilidade comportamental ²¹. Fazem parte deste complexo: *A. albitarsis s.s.*, *Anopheles albitarsis B*, *Anopheles albitarsis E*, *Anopheles marajoara* e *Anopheles deaneorum* ²². A espécie *A. marajoara* foi descrita como importante vetor no estado do Amapá ²¹ e é encontrado no Brasil, Colômbia, Venezuela e sul da América Central ²³. Já o *A. deaneorum* está entre as espécies mais endofágicas e foi encontrado infectado com *P. vivax* e com *P. falciparum* no município de Costa Marques em Rondônia, e é considerado um potencial vetor em outras regiões deste estado ¹⁵.

Várias metodologias foram utilizadas para separar as espécies do Complexo Albitarsis, entre elas aloenzimas, mtDNA-RFLP, RAPD-PCR, análise da citocromo oxidase I do DNA mitocondrial e comparação das sequências de ITS2 ^{20-22,24}. No entanto, este complexo ainda permanece confuso, visto que novas espécies crípticas têm sido descritas e há incompatibilidade entre resultados encontrados por diferentes metodologias ^{22,25}.

Outros vetores do subgênero *Nyssorhynchus* são amplamente distribuídos pelo Brasil, e possuem papel secundário na transmissão da malária ¹⁶.

1.3 Interação parasito-vetor

Os parasitas da malária necessitam de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado para completar o ciclo. No caso da malária humana, o hospedeiro invertebrado trata-se de uma fêmea de anofelino ²⁶.

No homem, o parasita é injetado na derme, na forma de esporozoítos, através da picada do mosquito e invade os vasos sanguíneos. Pela circulação sanguínea os parasitas chegam ao fígado, onde invadem as células hepáticas e se desenvolvem em esquizontes multinucleados ²⁶.

Os esquizontes liberam vesículas, denominadas merossomos, contendo os merozoítos, forma que, quando liberada na corrente sanguínea, infecta os eritrócitos. Dentro dos eritrócitos os merozoítos se reproduzem assexuadamente e liberam novos merozoítos através da ruptura das hemácias ²⁶.

Nos anofelinos, para que sejam vetores eficientes de plasmódios, é necessária a ingestão do sangue de uma pessoa infectada com parasitas na forma sexuada (gametócitos) e é imprescindível que esses gametócitos se desenvolvam, passando por diversas fases, para que o parasita chegue às glândulas salivares ²⁷ (Figura 2). Dentro do intestino do mosquito os gametócitos se diferenciam em microgametas masculinos e macrogametas femininos, ocorre a fecundação desses gametas formando zigotos e estes se diferenciam em oocinetos móveis. Aproximadamente 24 horas após a ingestão do sangue infectado, os oocinetos atravessam a matriz peritrófica, composta principalmente por quitina e proteínas, e cruzam o epitélio do

intestino até a lâmina basal. Na lâmina basal, ocorre a formação dos oocistos, nos quais são gerados milhares de esporozoítos haplóides. Estes esporozoítos são liberados na hemocele e migram para as glândulas salivares, onde atravessam o epitélio e se alojam no lúmen juntamente com a saliva. Nesta etapa os esporozoítos estão aptos a infectar uma pessoa quando o mosquito realizar outro repasto sanguíneo²⁷.

Quando mosquitos ingerem um parasita de uma espécie incompatível de *Plasmodium*, esse ciclo é interrompido e isso pode ocorrer em diversas etapas. A invasão das glândulas salivares, por exemplo, é dependente da interação entre um ligante do parasito e um receptor do vetor, sendo considerada espécie-específica²⁸.

Em linhagens de mosquitos resistentes à infecção pelo *Plasmodium*, observa-se uma ativação do sistema imune e normalmente os parasitas são mortos através da melanização²⁹. Nos mosquitos susceptíveis, o número de parasitas apresenta grande variação durante o desenvolvimento dentro do vetor, sendo que a maior diminuição no número de parasitas ocorre durante o cruzamento de oocinetos pelo epitélio do intestino³⁰. Essa redução no número de parasitas é atribuída à ação do sistema imune, o que demonstra a importância deste sistema na determinação da intensidade da infecção³⁰⁻³².

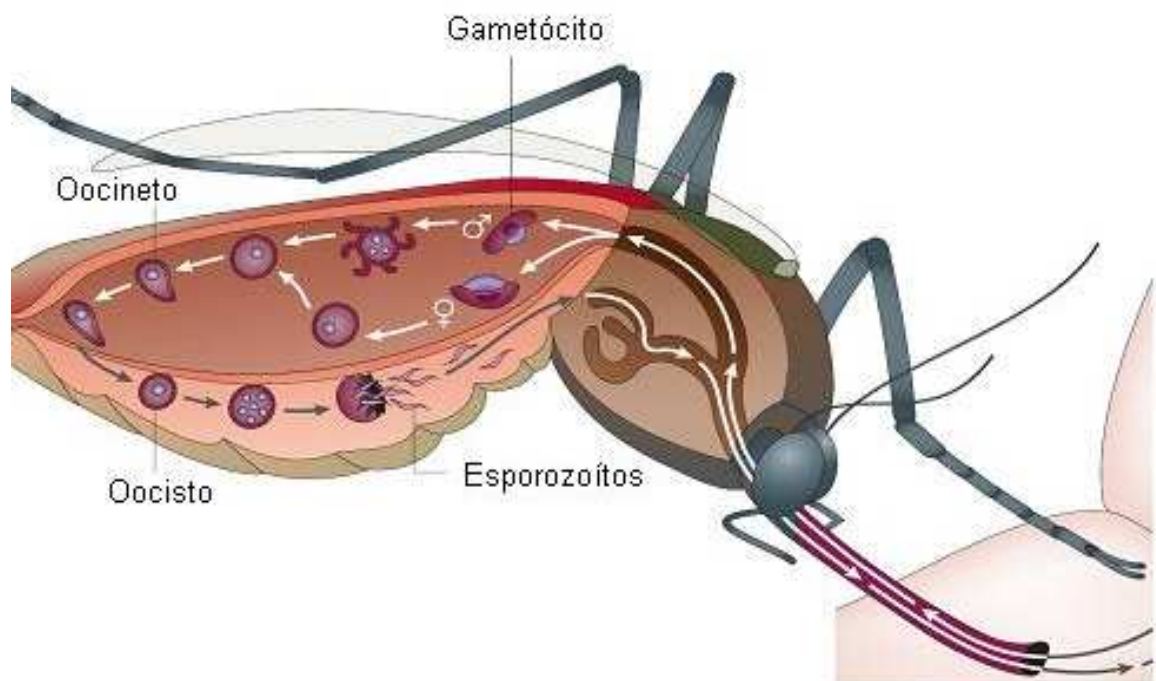


Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium* dentro do mosquito. Modificado de Su e colaboradores (2007)²⁶.

1.4 Sistema imune dos mosquitos

Os insetos desenvolveram uma resposta imune eficiente para combater a invasão de microorganismos, sendo que esta é composta somente pelo sistema imune inato, já que o sistema imune adaptativo ocorre apenas em vertebrados ³³.

Divergências significantes foram encontradas no mecanismo de reconhecimento e nas moléculas efetoras entre *Anopheles* e *Drosophila*, refletindo, provavelmente, adaptações específicas para o estilo de vida ³⁴.

O sistema imune dos mosquitos possui importante relação com a competência vetorial dos mesmos, no entanto, os mecanismos moleculares responsáveis, além de pouco compreendidos, se restringem principalmente às espécies *A. gambiae* e *Aedes aegypti* ³⁵.

Os mecanismos de defesa dos mosquitos compreendem uma ampla variedade de barreiras físicas, como a cutícula sobre a epiderme, a síntese da matriz peritrófica no lúmen do intestino, e também o revestimento de quitina do sistema traqueal ³³. Além disso, a resposta imune envolve componentes humorais e celulares ³⁶.

A resposta humoral pode ser dividida em quatro etapas: reconhecimento de moléculas patogênicas não próprias; modulação, permitindo a amplificação dos sinais reconhecidos; ativação de vias de transdução de sinais, como Toll, Imd e STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) e, finalmente, ativação das respostas efetoras, como a síntese de peptídeos antimicrobianos e a cascata de melanização ³⁷.

Já os componentes celulares são mediados por hemócitos e incluem a fagocitose e a encapsulação celular ^{34,36,37}.

Embora haja muitos estudos abordando a resposta imune dos mosquitos com os parasitas da malária, a grande maioria utiliza o modelo *A. gambiae* e *P. falciparum* ou *P. berghei*. Desta forma, pesquisas sobre a resposta imune dos vetores brasileiros de malária e sua relação específica com os parasitas, especialmente *P. vivax*, são escassas, o que torna essa relação parasito-vetor desconhecida e com extrema necessidade de aprofundamento.

1.4.1 Resposta humoral

Reconhecimento de patógenos

O início da resposta imune inata ocorre quando receptores de reconhecimento de padrões, sejam eles solúveis ou presentes na superfície das células, reconhecem e se ligam a padrões moleculares associados à patógenos ³³.

Existem diversas famílias de receptores de reconhecimento de padrões. Esses, além de opsonizar e facilitar a fagocitose dos microorganismos, participam de vias sinalizadoras que levam a respostas contra os patógenos³³.

Entre as família de receptores de reconhecimento de padrões estudadas estão CTLs (*C-Type Lectins*), PRGP (*Peptidoglycan recognition protein*), GNBP (*Gram negative binding protein*), GALE (*galactoside-binding lectins*), LRRD (*Leucine-Rich Repeat Domain*), e FBN (*Fibrinogen-like domain immunolectins*)^{31, 33, 38, 39}.

Modulação e amplificação de sinais

As serino-proteases participam de uma cascata proteolítica de sinais e são componentes chave para amplificar sinais e ativar respostas efetoras desencadeadas por receptores de reconhecimento de padrões, os quais reconhecem moléculas não próprias potencialmente patogênicas. Em artrópodes, membros dessa família de serino-proteases podem ser identificados pelo domínio N-terminal CLIP³⁶.

A amplificação do sinal pelas serino-proteases é estreitamente regulada por Serpinas (*Serino protease inhibitors*), que agem como um substrato irreversível suicida que, ao se ligarem covalentemente à essas enzimas, as inibem⁴⁰. Desta forma, as serpinas são importantes para modular diversas respostas imune em insetos, e desempenham um papel relevante em mosquitos vetores diante das infecções por *Plasmodium*⁴². De acordo com Osta e colaboradores (2004)³⁸, as serpinas estão relacionadas principalmente ao mecanismo de melanização, embora esteja claro que em alguns casos possuem importância também para a lise do parasita⁴².

Vias de transdução de sinais

As vias de transdução de sinais comunicam o reconhecimento dos patógenos e a amplificação desses sinais com a ativação transcricional. Em insetos, respostas contra microorganismos ocorrem principalmente por duas vias, Toll e Imd, que controlam a regulação da maioria dos genes do sistema imune e se mostram bem conservadas em mosquitos^{33,43}. Em mosquitos, uma terceira via, JAK/STAT, também contribui na resposta imune e sabe-se que é ativada após a infecção por bactérias^{36,44}.

A via Toll é ativada pelos receptores de mesmo nome e é amplamente estudada em *Drosophila*. Os receptores Toll são transmembrana e reconhecem, principalmente, fungos e bactérias gram-positivas⁴³. Após o reconhecimento, o domínio intracelular de Toll interage com um adaptador (MyD88, Tube ou Pelle) e promove a degradação da proteína Cactus, que

inibe o fator de transcrição Rel. Uma vez que Cactus é degradado, Rel age induzindo a expressão de diversos genes antifúngicos e anti-bactérias gram-positivas ⁴⁴.

A via Imd é responsável por reações contra bactérias gram-negativas e esse tipo de infecção induz a síntese de diversos peptídeos antimicrobianos ⁴⁴. Assim como na via Toll, um fator de transcrição da família Rel, denominado *Relish*, é utilizado na ativação dos genes, no entanto *Relish* não é inibido por Cactus ⁴⁴. O receptor responsável pelo reconhecimento dos padrões dos patógenos e conseqüentemente, pelo início da via Imd, permanece desconhecido, embora a grande semelhança desta via com a via TNF- α em mamíferos, forneça informações importantes ⁴⁴.

A via JAK/STAT é bem elucidada em vertebrados, e nesses animais, membros das quinases JAK são ativados pela interação das citocinas com seus receptores, e isso resulta na ativação de fatores de transcrição da família STAT ⁴⁵. Esse processo resulta na resposta imune contra vírus e bactérias e na regulação da resposta imune adquirida ⁴⁵. Componentes da família STAT foram identificados em *Drosophila* e em *A. gambiae*, e apresentam importância na resposta imune contra bactérias ⁴⁴.

Sistema de resposta efectoras

Após o reconhecimento dos patógenos, a modulação, a amplificação e a transdução dos sinais, ocorre a transcrição de genes relacionados às respostas efectoras. Duas categorias de sistemas efetores estão bem estabelecidas: a síntese de peptídeos antimicrobianos e o sistema de melanização dependente de fenol-oxidase ³³.

Em mosquitos, são conhecidas três famílias de peptídeos antimicrobianos: defensinas, cecropinas e gambicinas, sendo que essas foram identificadas em *A. gambiae* e, portanto, é possível que tal classificação possa se diferenciar para outros mosquitos ³⁴. Os peptídeos antimicrobianos são majoritariamente produzidos no corpo gorduroso e hemócitos, sendo frequentemente sintetizados também por barreiras epiteliais, como na traquéia, no intestino anterior e nos túbulos de Malpighi ³⁴.

As defensinas são eficazes principalmente contra bactérias gram-positivas enquanto que as cecropinas possuem um amplo espectro de atividade abrangendo bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de alguns fungos ³⁴. As gambicinas, por sua vez, foram identificadas somente em mosquitos e experimentos *in vitro* demonstraram que o peptídeo maduro possui atividade contra bactérias, fungos filamentosos e *P. berghei* ⁴⁶.

A melanização é uma resposta imune eficiente mediada por fenoloxidase (PO). Em 1986, Collins e colaboradores selecionaram geneticamente mosquitos *A. gambiae* resistentes à

infecção por *Plasmodium* por meio da melanização de oocistos²⁸. Acredita-se que patógenos e parasitas imobilizados por essa cápsula de melanina são mortos pela produção de radicais livres e intermediários tóxicos de quinona sintetizados durante a formação da cápsula³⁶.

1.4.2 Resposta celular

Fagocitose

Os hemócitos são encontrados circulando na hemocele e aderidos em tecidos como o corpo gorduroso e o intestino do mosquito e apresentam função importante na defesa contra bactérias. São as principais células fagocíticas, sendo responsáveis pelo engolfamento e destruição dos microorganismos³⁶.

Em 2001, Levashina e colaboradores demonstraram que a proteína TEP1 (*Thioester-containing protein 1*), além de relacionada à opsonização de patógenos, possui função relevante na fagocitose de bactérias (ver abaixo).

Encapsulação por hemócitos

Essa linha de defesa é utilizada principalmente contra patógenos cujo tamanho não permite a fagocitose³⁶. A encapsulação consiste na agregação de hemócitos ao redor do patógeno, seguida pela deposição de melanina, formando-se uma cápsula³⁶.

1.4.3 FBN9

FBN9 (*Fibrinogen domain immunelectin family*) é um receptor de reconhecimento de padrões (Ensembl: AGAP011197), estudado por Dong e colaboradores em 2006³⁹. Trata-se de um membro da família dos FBNs, com 282 resíduos de aminoácidos, que apresenta um domínio Fibrinogênio C (Pfam: PF00147)³³. Foi demonstrado que FBN9 teve a expressão do RNA mensageiro induzida em *A. gambiae* alimentados com sangue infectado com *P. falciparum*, ou com soluções contendo *E. coli* ou *S. aureus*, e, no entanto, a expressão deste gene permaneceu inalterada na infecção com *P. berghei*³⁹. Além disso, quando o gene que codifica FBN9 foi silenciado em *A. gambiae*, foi observado aumento na sobrevivência de *P. falciparum*, *P. berghei*, *E. coli* e *S. aureus*, o que indica que essa proteína atua defendendo os mosquitos contra estes microorganismos³⁹.

1.4.4 TEP 1

As proteínas contendo o motivo tioéster são filogeneticamente relacionadas e podem ser divididas em três famílias: os fatores do sistema de complemento e as α_2 macroglobulinas (ambos presentes em vertebrados), e as Teps (*Thioester-containing proteins*) de invertebrados ³¹. Em insetos, embora muitas dessas proteínas ainda não possuam função esclarecida, sabe-se que geralmente possuem um motivo tioéster conservado e desempenham importante papel no sistema imune e também como inibidor universal de proteases ^{33,47}. Esse motivo conservado, após a ativação proteolítica, é utilizado para se ligar covalentemente ao alvo promovendo a opsonização dos mesmos, o que pode acarretar a fagocitose ou a destruição por meio do complexo de ataque à membrana ^{33,36}. As Teps têm sido estudadas em diversos organismos, e no genoma de *A. gambiae* foram identificadas um total de 15 Teps, sendo a Tep1 alvo de vários estudos ^{33,47-50}.

Tep1 (Emsembl: AGAP010815) é uma proteína formada por 1355 resíduos de aminoácidos, que apresenta cinco domínios da família das Alpha-macroglobulinas. É secretada pelos hemócitos, sendo necessária para promover fagocitose de bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de promover a lise (algumas vezes seguida pela encapsulação) de *Plasmodium* ^{31,48}. O silenciamento de Tep1 por RNAi é capaz de converter *A. gambiae* refratários à infecção por *P. berghei*, em mosquitos susceptíveis e, em mosquitos naturalmente susceptíveis, promove um aumento no número de parasitas que se desenvolvem ⁵¹.

Obbard e colaboradores ⁵² demonstraram que Tep1 apresenta alto índice de polimorfismo em uma região funcional e concluíram que essa proteína se encontra sob pressão seletiva em *A. gambiae*.

Apesar da grande importância destes genes identificados, a literatura não apresenta estudos em vetores brasileiros sobre Teps, FBN9 e os outros genes relacionados à resposta imune.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de muitos esforços, a malária continua causando grande impacto na saúde da população mundial. Isso é atribuído a diversos fatores, entre eles, falhas nas políticas de controle, falta de uma vacina eficaz, e o crescimento da resistência dos parasitas às drogas, assim como dos vetores aos inseticidas^{3,4,39}. Nesse contexto, há necessidades de novas estratégias, agrupadas principalmente em três categorias: proteção pelo desenvolvimento de uma vacina, profilaxia e tratamento com novas drogas antimaláricas, e/ou bloqueio da transmissão.

O bloqueio da transmissão consiste no desenvolvimento de novos inseticidas, assim como na prevenção da picada do mosquito com mosquiteiros e repelentes, e ainda, bloqueando (quimicamente ou através da manipulação genética) o desenvolvimento do parasita no vetor, reduzindo assim sua capacidade de transmiti-lo³⁸.

A interação parasito-vetor é complexa e determina, por exemplo, que das mais de 400 espécies de mosquitos anofelinos existentes, apenas 40 são importantes vetores da malária humana no mundo²⁹. Da mesma forma, outros parasitas do mesmo gênero, como o *Plasmodium gallinaceum*, agente da malária aviária, somente se desenvolvem em mosquitos *Aedes* ou *Culex* spp. Desta forma, as relações que determinam a competência vetorial de um mosquito são muito importantes para uma maior compreensão sobre a transmissão da doença⁵³.

Diversos genes relacionados à resposta imune de *A. gambiae* contra *P. falciparum* e *P. berghei* foram identificados e caracterizados. Esses genes podem ser alvos fundamentais para o bloqueio da transmissão, seja pela manipulação genética ou por métodos químicos. O estudo destes genes permitirá um conhecimento minucioso desta interação resultante de um processo de co-evolução tão bem estabelecido. Apesar disso, não há genes relacionados à resposta imune identificados em vetores brasileiros, e a resposta contra *P. vivax* ainda é pouco estudada e com resultados insuficientes.

Finalmente, estudos sobre a imunidade de insetos e sua interação com patógenos apresentam grande relevância para o melhor entendimento da evolução da resposta imune. Isso se deve ao fato de grande parte dos mecanismos serem conservados durante a evolução, e, além disso, como não se conhece detalhadamente a natureza das moléculas do *Plasmodium* capazes de induzir a resposta imune inata a gerar sinais necessários para a resposta adaptativa em vertebrados, os invertebrados se tornam uma ferramenta valiosa. Dessa forma, a

elucidação da natureza molecular do reconhecimento do *Plasmodium* em mosquitos pode ser a chave para o desenvolvimento de novos adjuvantes para vacinas contra malária⁵⁴.

Neste contexto, este trabalho apresenta grande relevância, pois enfoca a identificação de genes relacionados com a resposta imune em vetores brasileiros de plasmódios e sua relação com o *P. vivax*, assuntos que ainda apresentam poucos dados na literatura. Esta pesquisa é necessária não somente para esclarecer aspectos específicos da imunidade dos anofelinos brasileiros, mas também para permitir uma comparação com os resultados já existentes em outras espécies e ampliar o conhecimento na área de resposta imune em mosquitos e da evolução da resposta imune de modo geral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os genes FBN9 e TEP1 em vetores brasileiros de malária, analisando sua conservação, expressão gênica em resposta à infecção por *Plasmodium vivax*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter exemplares de mosquitos vetores brasileiros das espécies: *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. nuneztovari* e *A. aquasalis*.
- ✓ Amplificar e obter a sequência parcial dos genes FBN9 e TEP1 nestas espécies de anofelinos.
- ✓ Analisar as sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas e compará-las com as sequências já depositadas nos bancos de dados.
- ✓ Estudar a filogenia desses genes
- ✓ Comparar os níveis de expressão dos genes selecionados, em *A. aquasalis* infectados com *P. vivax* e em mosquitos controle.

4 METODOLOGIA

4.1 Manutenção da colônia de *A. aquasalis*

Os mosquitos foram mantidos no insetário do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou, com a umidade de 70%, temperatura de 26° C e fotoperíodo de 12 horas. As larvas eram mantidas em água desclorada misturada com água do mar filtrada (proporção de 10:1 v/v). As bandejas com as larvas eram lavadas três vezes por semana e as larvas eram alimentadas com ração de peixe (Tetramim e Goldfish) trituradas, peneiradas e misturadas na proporção de 1:1. Os adultos eram mantidos com solução de açúcar a 10%. Para que as fêmeas realizassem a oviposição, as mesmas eram deixadas em jejum por 6 horas e alimentadas em camundongos suíços anestesiados. Dois dias após essa alimentação, recipientes escuros com água eram colocados na gaiola, onde permaneciam por 48 horas para que as fêmeas realizassem a postura dos ovos. Após esse período, o recipiente com os ovos era retirado da gaiola e os ovos transferidos para bandejas de plástico com água.

Nos experimentos realizados no Amazonas, as larvas de mosquitos foram transportadas em tubos de 50 ml (Falcon) com 25 ml de água e 50 larvas em cada tubo. Esses tubos foram acondicionados em caixas de isopor e em Manaus, os mosquitos foram mantidos no Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane da mesma maneira como descrito acima.

4.2 Coleta de mosquitos

Os mosquitos das espécies *A. darlingi*, *A. albitarsis* e *A. nuneztovari* foram coletados durante o mês de março de 2008. As coletas foram realizadas em Manaus, no bairro Puraquequara (Sítio Cristo Vivo), ao final da tarde, por meio de atração humana e capturadores, além disso, também foram coletados mosquitos nas paredes dos currais. Os mosquitos coletados foram colocados em gaiolas e mantidos com algodão umedecido em solução com açúcar a 10% até a identificação.

Larvas também foram coletadas no bairro Tarumã, em Manaus. As larvas foram mantidas no laboratório até que se tornassem adultos e fossem identificados.

As amostras de mosquitos *A. braziliensis* foram enviadas por colaboradores de Rondônia, enquanto que os mosquitos *A. aquasalis* utilizados foram provenientes de nossa colônia.

4.3 Identificação morfológica dos mosquitos

Os mosquitos coletados foram levados para o Laboratório de Malária e Dengue no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foi realizada a identificação morfológica individualmente de acordo com a chave de identificação descrita por Consoli e Oliveira (1994) ⁶. Os mosquitos identificados como membros da mesma espécie foram separados em grupos, anestesiados em gelo e colocados em tubos de 1,5 ml para armazenamento à -20°C.

4.4 Extração de DNA dos mosquitos

Os mosquitos de cada espécie foram separados em grupos de 10 a 20 mosquitos e a extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Para 10 mosquitos, os mesmos eram colocados em tubos de 1,5 ml, macerados juntamente com 200 µl do tampão de homogeneização (0,1M Tris-HCl pH 9,1; 0,2M Sacarose; 0,05M EDTA; 0,1M NaCl; 0,05% SDS)⁵⁵ e submetidos a uma rápida centrifugação para abaixar o precipitado. As reações foram incubadas a 65°C por 30 minutos e em seguida 1 µl de Proteinase K 20mg/ml (Gibco) foi adicionada e os tubos foram incubados a 52°C por 3 horas, sendo que a cada 30 minutos os tubos eram manualmente agitados. Posteriormente, 200 µl de fenol tamponado foram adicionados aos tubos e os mesmos foram submetidos à agitação por 10 minutos em um homogeneizador. Após esta etapa, as reações foram centrifugadas a 13.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 200 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1 v/v) e novamente as amostras foram homogeneizadas por 10 minutos e submetidas à centrifugação nas mesmas condições anteriores. A parte aquosa foi transferida para um tubo estéril, contendo 200 µl de clorofórmio, os tubos foram centrifugados a 13.000 x g por 15 minutos a 4°C e a parte aquosa foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado adicionando-se 200 µl de isopropanol e centrifugando as amostras a 13.000 x g por 15 minutos a 4°C. O isopropanol foi retirado e 1 ml de etanol 75% foi adicionado ao sedimento de DNA. Os tubos foram agitados e centrifugados sob as mesmas condições anteriores, o etanol foi retirado e os tubos foram deixados abertos para a evaporação do etanol. Finalmente, o sedimento foi ressuspensionado com 100 µl de tampão EB (Qiagen) (10mM Tris-Cl, pH 8,5).

De acordo com a quantidade de mosquitos utilizados, o volume dos reagentes era ajustado proporcionalmente.

4.5 Identificação molecular dos mosquitos

A identificação molecular se fez necessária para confirmação da identificação morfológica. Além disso, a identificação morfológica não possibilita a determinação da espécie de mosquitos adultos pertencentes ao complexo *A. albitarsis*, o que é possível apenas com o auxílio de ferramentas moleculares.

Para a identificação molecular foram sequenciadas as regiões ITS2 (*Ribosomal Internal Transcribed Spacer 2*) de cada uma das espécies utilizando os iniciadores descritos por Porter e Collins (1991)⁵⁶ CP16 (5' GCGGGTACCATGCTTAAATTTAGGGGGTA 3') e CP17 (5'GCGCCGCGGTGTGAACTGCAGGACACATG 3'). A amplificação destas regiões nos diferentes exemplares foi realizada com 0,2mM de cada iniciador; 0,2mM de dNTPs; 1,5 µl de tampão 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,4, 1,5mM MgCl₂, 1mg/ml gelatina); 1U de Taq Polimerase (Invitrogen), 1,0 µl do DNA e água estéril (Sigma) para um volume final de 15 µl. A reação de PCR foi realizada em 25 ciclos de 94°C 1 minuto, 50°C 2 minutos e 72°C 2 minutos²⁴.

Parte dos produtos das PCRs (5 µl) foi utilizada para eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (5µg/ml) para visualização do material amplificado. O restante dos produtos foi purificado com *ExoSAP-IT* (USB) (1 µl da enzima para cada 5 µl da reação) e aquecidos a 37°C por 15 minutos seguido por 80°C por 15 minutos, sendo esta segunda etapa necessária para a inativação da enzima.

Nas amostras de *A. albitarsis*, o produto de PCR amplificado com os iniciadores CP16 e CP17 foi utilizado clonado em *pGEM-T easy* (Promega)⁵⁷ seguido pela transformação de bactérias TOP10 através de choque térmico⁵⁸. As bactérias foram submetidas à PCR de colônia e todas as reações positivas foram sequenciadas. As metodologias de clonagem e sequenciamento a partir das PCRs de colônia encontram-se detalhadas no item 4.8. Utilizamos este método diferenciado para *A. albitarsis*, pois como se trata de um complexo de espécies indistinguíveis morfológicamente, caso mais de uma espécie estivesse no mesmo *pool*, isto poderia ser detectado.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado 1 µl do produto de PCR purificado com *ExoSAP-IT*, 0,33µM de cada iniciador, 4 µl do kit de sequenciamento (*DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Amersham) completando-se com água estéril para um volume final de 10 µl. As reações foram colocadas em placas de 96 poços e a reação de amplificação foi realizada em um termociclador em 35 ciclos de 95°C 20 segundos, 50°C 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Após a reação, foi adicionado a cada poço 1 µl de 7,5M acetato de amônio e 30 µl de etanol 96% para a precipitação do produto. A placa foi agitada em um vórtex e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as placas foram centrifugadas por 45 minutos a 10.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado invertendo-se a placa, sendo adicionados ao sedimento 100 µl de etanol 70%. Novamente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante foi descartado centrifugando rapidamente a placa invertida sobre papel de filtro. O sedimento foi solubilizado com 10 µl de tampão de amostra (70% formamida, 1mM EDTA) para o sequenciamento automático no equipamento *MegaBace 500* (Amersham Bioscience).

Para a análise das sequências foram utilizados os eletroferogramas gerados como arquivos de saída pelo *MegaBace* através do pacote de programas *Phred/Phrap/Consed*. O programa *Phred*⁵⁹ foi utilizado para nomeação das bases e atribuição de valor de qualidade às mesmas. O agrupamento das diversas sequências correspondentes foi realizado com o programa *Phrap* e isto permitiu a geração das sequências consenso, a partir de diversas sequências complementares e de reações de sequenciamento distintas. Com a ferramenta *Cross_Match*, as regiões correspondentes às sequências do vetor foram removidas e finalmente, o resultado foi visualizado no programa *Consed*⁶⁰, no qual as sequências consenso foram editadas selecionando-se apenas as regiões de alta qualidade. Essas regiões de alta qualidade das sequências consenso foram empregadas para as buscas de similaridade através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra o banco de dados das sequências ITS2 dos anofelinos brasileiros.

O banco de dados de ITS2 dos anofelinos brasileiros foi gerado a partir das sequências obtidas do *GenBank* depositadas por Marreli e colaboradores (2005)²⁴ e por Li & Wilkerson (2005)²¹. Essas sequências foram unidas e formatadas para a geração de um banco de dados com o programa *Formatdb*.

Os resultados das buscas de similaridades das ITS2 sequenciadas contra o banco de dados gerado foram analisados para permitir a identificação molecular das espécies utilizadas neste trabalho.

4.6 Desenho dos iniciadores degenerados

A identificação dos genes de imunidade em anofelinos brasileiros foi baseada nas sequências dos genes selecionados de *A. gambiae* e em seus ortólogos que identificamos em *A. aegypti*. Os bancos de dados completos dos genes dessas espécies foram obtidos no formato EMBL a partir do *Ensembl*⁶¹ (versão de fevereiro de 2006). A partir destes arquivos,

geramos um banco de dados de aminoácidos e um com as sequências nucleotídicas, para cada uma das espécies (*A. gambiae* e *A. aegypti*). As sequências das proteínas FBN9 e TEP1 de *A. gambiae* foram adquiridas através dos seus números de acesso AGAP011197 e AGAP010815, respectivamente ³⁹. Essas sequências de proteínas foram utilizadas para realizar um *BlastP* local contra as sequências de proteínas de *A. aegypti*. Os primeiros *hits* encontrados com alto valor de *score* e baixo valor de *e-value* foram listados e utilizados para realizar um *blast* recíproco contra as proteínas de *A. gambiae*. As proteínas de *A. aegypti* que tiveram a proteína FBN9 ou Tep1 de *A. gambiae* como primeiro *hit* neste *blast* recíproco foram consideradas suas respectivas ortólogas.

Os domínios nos genes em *A. aegypti* e em *A. gambiae* foram analisados utilizando a ferramenta para visualização e anotação de genes *Artemis* ⁶² para confirmação de que os domínios presentes em *A. gambiae* estavam também presentes no provável gene ortólogo de *A. aegypti*.

As sequências das proteínas de *A. gambiae* foram alinhadas com as respectivas sequências ortólogas identificadas em *A. aegypti* utilizando o programa Clustal W ⁶³ para um alinhamento global. As regiões conservadas foram analisadas e utilizadas para o desenho dos iniciadores degenerados baseando-se na sequência de aminoácidos (Tabela 1). As informações de *Codon Usage* de *A. aquasalis* ⁶⁴ também foram consideradas para o desenho dos iniciadores. A degeneração dos iniciadores significa o número de diferentes iniciadores no *pool* sintetizado, e esse valor encontra-se representado na tabela 1.

Para evitar desenhar os iniciadores para FBN9 em regiões comuns a todas as proteínas da família dos fibrinogênios, alinhamos 49 FBNs presentes em *A.gambiae* (números de acesso: AGAP011307; AGAP005848; AGAP001554; AGAP011277; AGAP011276; AGAP010772; AGAP012539; AGAP010773; AGAP010775; AGAP010774; AGAP009184; AGAP011223; AGAP011225; AGAP010811; AGAP011230; AGAP011226; AGAP010762; AGAP010763; AGAP012916; AGAP010760; AGAP010759; AGAP011224; AGAP011231; AGAP011239; AGAP010869; AGAP010761; AGAP011197; AGAP011228; AGAP010531; AGAP012000; AGAP007041; AGAP006914; AGAP004918; AGAP004916; AGAP004917; AGAP006743; AGAP004998; AGAP012650; AGAP006790; AGAP009728; AGAP004996; AGAP002005; AGAP012446; AGAP004997; AGAP012651; AGAP004999; AGAP000806; AGAP007031 e AGAP009556) e as regiões conservadas presentes em grande parte destas proteínas não foram utilizadas no desenho dos iniciadores.

Tabela 1: Iniciadores degenerados desenhados.

Gene	Nome	Sequência (5'---- 3')	Degeneração
FBN9	5fbn_deg4	AAYCARGCNCAYYTNGARAA	256
	3fbn_deg4	CCANCCICCCICRAAYTTNGTYTG	32
TEP1	5step_deg1	GGHTGYGGHGARCARAAYATG	144
	3step_deg1	CCRTTNCGNARNCCICCYTG CAT	128
	5step_deg2	ACVCARGAYACVTTYGTNGG	288
	3step_deg2	GTRTTRTARTARTCRTANAC	128

4.7 Amplificação dos genes selecionados em diversas espécies de anofelinos.

Utilizando os iniciadores degenerados desenhados para cada gene, realizamos PCRs com 0,5mM de cada iniciador, 7,5 µl de PCR *Master Mix* 2X (Promega), 1 µl de DNA e água estéril para completar um volume final de 15 µl. Primeiramente realizamos uma reação com os seguintes parâmetros de ciclagem: 94°C por 5 minutos, 15 ciclos (94° C por 30 segundos, 50° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto), sendo que a temperatura de anelamento diminuía um grau, a cada ciclo. Após esses 15 ciclos, foram adicionados mais 20 ciclos de 94° C 30 segundos, 50°C 30 segundos e 72°C 1 minuto.

Parte dos produtos destas reações (5 µl) eram utilizados para visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Caso nenhuma banda fosse visualizada, 1 µl da reação era utilizado como amostra para uma segunda reação com os mesmos iniciadores e as seguintes condições para a reação: 94°C 5 minutos e 35 ciclos de 94°C 30 segundos, 50°C 30 segundos e 72°C 1 minuto. Os produtos desta segunda reação também eram visualizados em gel de agarose.

4.8 Sequenciamento dos genes TEP e FBN9 nas diferentes espécies de anofelinos brasileiros.

Os produtos de PCR que apresentaram somente uma banda foram diretamente utilizados para a clonagem no vetor *pGEM-T easy*, no entanto, quando mais uma banda era visualizada do gel, a banda do tamanho esperado era extraída do gel de agarose e o DNA era purificado utilizando o kit *Qiaex II* (Qiagen). Os DNAs resultantes do processo de purificação eram dosados no equipamento *NanoDrop* e clonados em vetores *pGEM-T easy* em uma proporção molecular inserto/ vetor de 3:1. Caso a transformação de bactérias não funcionasse, essa proporção era modificada para 8:1. Para definir a quantidade de inserto a ser utilizada, a

seguinte fórmula foi empregada: [quantidade do vetor (ng) x tamanho do inserto (kb)/ tamanho do vetor) x 3/1 (ou 8/1)].

Desta maneira, eram adicionados ao DNA do inserto 25ng de *pGEM-T*, 5 µl do tampão da enzima 2X (60mM Tris-HCl pH 7,8, 20mM MgCl₂, 10mM DTT, 2mM ATP, 10% polietileno glicol), 1,5U de T4 DNA ligase e água estéril para um volume final de 10 µl.

Os produtos desta ligação foram utilizados para transformação de bactérias competentes TOP10 através de choque térmico⁵⁸.

As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (100 mg/ml), IPTG (100 mg/ml) e X-Gal (20 mg/ml) e algumas colônias brancas foram selecionadas para a realização da PCR de colônia. Nesta PCR, foram empregados os iniciadores T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') e SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'), que se ligam a regiões do vetor, sob as seguintes condições de ciclagem: 94°C 2 minutos; 35 ciclos de 94°C 30 segundos, 45°C 30 segundos e 72°C 1 minuto; e 5 minutos a 72°C para a extensão final. Parte do produto destas reações foi visualizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

As reações PCR-positivas que apresentavam o tamanho correto do amplicom foram selecionadas para a purificação com *ExoSAP-IT*, seguida de sequenciamento. A purificação foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.5.

Os iniciadores SP6 e T7 também foram utilizados na reação de sequenciamento sob as condições de ciclagem: 35 ciclos de 95°C 20 segundos, 50°C 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os produtos destas reações foram precipitados e preparados para o sequenciamento no *MegaBace* e os eletroferogramas resultantes foram analisados utilizando o pacote de programas *Phred/Phrap/Consed*, adotando a mesma metodologia descrita no item 4.5.

As sequências consenso de alta qualidade geradas foram submetidas a um *BlastX* contra o banco de dados de *A. gambiae*. As sequências que obtiveram como primeiro *hit* a proteína alvo de *A. gambiae*, foram consideradas como ortólogas. O sequenciamento destes genes gerou, além das sequências parciais de FBN9 e Tep1, a sequência de outra Tep em *A. aquasalis*. Como esta proteína também possui os domínios relacionados com a resposta imune, esta Tep foi incluída no estudo. Visto que não foi possível identificar com exatidão qual seria a Tep correspondente a esta proteína em *A. gambiae*, esta proteína será denominada em nosso trabalho como TepX.

4.9 Análise da conservação das sequências identificadas

As sequências dos genes alvo obtidas a partir do DNA dos anofelinos brasileiros foram alinhadas no programa *BioEdit*⁷² utilizando o *Clustal W*⁶³ de acordo com os seguintes parâmetros: cobertura, número de sítios nucleotídicos polimórficos e número de codons polimórficos, porcentagem de mutações sinônimas e não-sinônimas, bem como de transições e transversões, além da localização das regiões sequenciadas em relação à proteína de *A. gambiae* e a presença de domínios nestas regiões.

Além disso, as sequências de FBN9 dos anofelinos brasileiros, juntamente com as 60 sequências de FBN9 das espécies do Complexo *Gambiae* depositadas no *GenBank* por Parmakelis e colaboradores (2008)¹², foram analisadas no programa *MEGA*⁶⁵ no que se refere à *dN*, *dS* e à razão *dN/dS*. Para calcular as taxas de substituições sinônimas e não-sinônimas foi utilizado o método de Nei-Gojobori⁶⁶ com a correção de Jukes-Cantor⁶⁷.

4.10 Infecção de *A. aquasalis* com *P. vivax*

As infecções foram realizadas em Manaus em junho de 2007 e em março de 2008. Os mosquitos foram deixados sem açúcar por aproximadamente 3 horas e alimentados com sangue de pacientes infectados com *P. vivax*. Para a coleta do sangue infectado aguardamos os pacientes nos postos de diagnóstico de malária em Manaus e em municípios localizados nas proximidades de Manaus. Os pacientes positivos eram explicados sobre o projeto e questionados sobre o desejo de contribuir. Os pacientes que concordaram assinaram um termo de consentimento e foi coletado aproximadamente 3 ml de sangue. Esses procedimentos foram realizados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética do CPqRR (parecer nº 07/2008). Foi realizado esfregaço do sangue dos pacientes para verificação da presença de gametócitos e apenas as amostras que continham gametócitos foram utilizadas para a alimentação dos mosquitos. Após a alimentação, os mosquitos foram deixados com açúcar no ambiente de criação da colônia e 28 horas depois os mosquitos foram dissecados. Os mosquitos tiveram seus intestinos e as carcaças (todos os outros tecidos do mosquito) dissecados, sendo agrupados em *pools* de 10 a 20 mosquitos e mantidos em 100 µl de *Trizol* (Invitrogen) e armazenados a -70° C. Durante todo o processo de dissecação, o material que já havia sido dissecado permaneceu em gelo seco.

4.11 Extração do RNA

As amostras de intestino e carcaça foram maceradas em 500 µl de *trizol* e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados em cada tubo 100 µl de clorofórmio, as amostras foram agitadas vigorosamente, incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação a parte aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo e a fase orgânica foi armazenada para posterior extração do DNA. Para a precipitação do RNA foram adicionados 250 µl de isopropanol, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida, centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 1 ml de etanol 75%. O etanol foi adicionado às amostras e homogeneizado utilizando um vortex. As amostras foram centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e os tubos foram deixados abertos, por 10 minutos, para que o sedimento fosse seco. O RNA foi então eluído em 20 µl de água livre de RNase e DNase (Sigma) tratada com 0,1% de DEPC (Dietilpirocarbonato).

4.12 Síntese de cDNA

Inicialmente, o RNA (1 µg) foi tratado com a enzima RQ1 DNase (Promega). Foram utilizadas 2U da enzima, 2 µl do tampão da enzima (400mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM MgSO₄, 10mM CaCl₂) e água tratada com 0,1% de DEPC para completar um volume final de 20 µl. Essas reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em seguida foram adicionados 2 µl de solução de parada da reação (*Stop Solution*) e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 65°C para inativação da DNase.

Para as reações de transcrição reversa o RNA tratado foi dividido em 2 tubos com 10 µl em cada, sendo 0,5 µg de RNA por tubo. Em cada um dos tubos foram adicionados 10 mM de oligo dT e 10 mM de dNTPs, as amostras foram incubadas a 65°C por 2 minutos e imediatamente após esse período foram transferidas para o gelo. Logo em seguida foram acrescentados a cada reação 4 µl do tampão da 1ª fita 5X (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) e 2 µl de DDT a 0,1M e os tubos foram homogeneizados e incubados por 2 minutos a 42°C. Para a síntese do cDNA foi adicionado a um dos tubos 200U da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega), o outro tubo permaneceu sem a enzima para o controle RT- e verificação de possíveis contaminações com DNA. Posteriormente as reações

foram incubadas por 50 minutos a 42°C e em seguida a transcriptase reversa foi inativada pela incubação a 70°C por 15 minutos.

A qualidade dos cDNAs era sempre verificada anteriormente aos demais experimentos através da amplificação do gene constitutivo RP49⁶⁸ (sequência dos iniciadores na tabela 2).

4.13 Quantificação da expressão de Tep1 e TepX em *A. aquasalis* e infectados com *P. vivax*.

Para determinar se a infecção com *P. vivax* afetaria a expressão dos genes de resposta imune selecionados em *A. aquasalis*, inicialmente iniciadores específicos para cada gene foram desenhados a partir das sequências obtidas através do sequenciamento. Para o desenho destes iniciadores específicos o programa *Oligo*⁶⁹ foi utilizado e os seguintes parâmetros foram priorizados: quantidade de G-C entre 30 e 80%; temperatura de anelamento próxima de 60°C; repetições de 4 ou mais nucleotídeos foram evitadas, bem como G/C na extremidade 3'; iniciadores que formavam grampos ou dímeros foram evitados e procurou-se não haver mais de 2 bases G ou C entre os 5 últimos nucleotídeos⁷⁰. Desta forma, foram desenhados 1 par de iniciadores para cada gene cuja sequência foi obtida (FBN9, Tep1 e TepX), e como controle endógeno foi selecionado o gene RP49⁶⁸ (Tabela 2).

Foi utilizado o método de quantificação relativa pela comparação das curvas padrões e para isso, cada gene alvo foi normalizado com o controle endógeno RP49, e as amostras de mosquitos infectados foram normalizadas com as amostras do calibrador (mosquitos não infectados). Esse método foi escolhido devido à diferença na eficiência dos iniciadores (ver resultados). Amostras de carcaça e intestinos foram colocadas em placas separadas. Foi utilizada a condição padrão de ciclagem (95°C 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 95°C 15 segundos e 60°C 1 minuto), o reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix* e o equipamento *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

Curvas padrões foram construídas para os genes alvo e para o RP49 com as amostras de mosquitos não infectados utilizando-se diferentes diluições (1; 0,2; 0,04; 0,008; 0,0016). Todas as reações foram em triplicata. Os valores obtidos foram analisados no software *7000 System* e para geração da curva padrão. Com base nestas curvas as quantidades de cDNA das amostras de mosquitos infectados eram calculadas e para que pudessem ser comparados, esses valores foram normalizados.

As quantidades obtidas na reação dos genes alvos com DNA de mosquitos infectados foram normalizadas dividindo-se esse número pela quantidade encontrada no controle endógeno (RP49). O mesmo foi realizado com as amostras de mosquito não infectado

(calibrador). Em seguida o valor encontrado na normalização da reação com mosquito infectado foi dividida pelo normalizador do calibrador. Desta forma, pode ser encontrado o valor que demonstra, com base no calibrador, quantas vezes o gene alvo é expresso. Neste caso o valor não possui unidade e a quantidade expressa é em relação ao calibrador⁷¹.

Tabela 2: Iniciadores para a avaliação da expressão dos genes de resposta imune. Tm = Temperatura de anelamento. Pb= pares de bases. Sequências dos iniciadores do gene RP49 retiradas de Gentile e Colaboradores (2005) ⁶⁸.

Gene	Nome	Sequência (5'---- 3')	Tm	Tamanho do amplicom
FBN9	fbn_real-timeF	CCCTGCAACGCCGTCAGA	60°C	95pb
	fbn_real-timeR	AACCAGGCGCATTTAGAGAA	60°C	
TEP1	tep1_real-timeF	ATGTACTTTGCTGCCGTTTT	56°C	92pb
	tep1_real-timeR	GATGGTTCGTTCCGGTGTCT	58°C	
TEPX	tepx_real-timeF	GAATAGTGTCCAAAGCCAAAC	60°C	118pb
	tepx_real-timeR	CCAGGTGCTTCCGCTCTTG	60°C	
RP49	5aquaexpRP	GCTATGATAAGCTCGCTCCTGC	60°C	189pb
	3aeaquaRP1b	TCATCAGCACCTCCAGCTC	58°C	

4.14 Análise da filogenia do gene FBN9

As sequências parciais de nucleotídeos referentes ao gene FBN9 foram obtidas de *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. nuneztovari* e *A. albitarsis* (Amazonas e Rondônia) conforme metodologia descrita anteriormente no item 4.8. Outras 16 sequências de FBN9 de seis espécies de anofelinos pertencentes ao complexo *A. gambiae* descritas na literatura foram também analisadas ¹². As sequências referentes às espécies do complexo *A. gambiae* foram obtidas no *GenBank* a partir dos seus respectivos números de acesso: *A. arabiensis* (Gi:167861637 e Gi:167861647); *A. quadriannulatus* (Gi:167861749 e Gi:167861735); *A. merus* (Gi:167861725 e Gi:167861721); *A. melas* (Gi:167861701 e Gi:167861697); *A. bwambae* (Gi:167861667 e Gi:167861663); *A. gambiae* (Gi:167861689; Gi:167861685; Gi:167861683; Gi:167861679; Gi:167861677; Gi:167861673) ¹². As múltiplas sequências de cada espécie se referem às espécimes ou mesmo aos diferentes alelos em uma mesma amostra (identificados como A e B).

O total de 21 sequências de nucleotídeos referentes às 10 espécies selecionadas (Tabela 3) foram alinhadas utilizando-se os parâmetros convencionais do programa *BioEdit* ⁷², que adota o mesmo algoritmo implementado no *Clustal W* ⁶³. A escolha pela utilização das sequências de nucleotídeos se justifica pela alta conservação observada nas sequências de aminoácidos das respectivas proteínas das espécies selecionadas neste trabalho, o que resultaria em um conjunto de dados pouco informativo. As regiões 5' e 3' das sequências de *A. gambiae* ausentes nos fragmentos seqüenciados das espécies dos anofelinos brasileiros, foram removidas do alinhamento final. Desta forma, o alinhamento contendo 365 sítios nucleotídicos foi utilizado, sendo que esta região corresponde a uma cobertura de 42,90% do gene FBN9 de *A. gambiae*.

O alinhamento foi convertido em formato *Nexus* ⁷³ utilizando-se o programa *Clustal X* ⁷⁴ e subsequentemente empregado nas análises bayesianas adotando-se o método de amostragem *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) implementado no programa *MrBayes* versão 3.1 ⁷⁵. As análises de MCMC foram realizadas em quatro cadeias (1 *cold* e 3 *heated chains*) por 1.500.000 gerações, retirando-se uma amostra a cada 1000 gerações com 25% das amostras iniciais descartadas como *burn-in*. Adotou-se o modelo GTR (*General Time Reversible*) assumindo uma distribuição gama com taxa de variação entre os sítios e uma proporção de sítios invariáveis (GTR + inv + gamma) ⁷⁶. Os valores de probabilidade a posteriori (pp) iguais ou superiores a 0,80 indicam os agrupamentos significativamente identificados na análise. O arquivo contendo a árvore consenso foi visualizado e editado no

programa *FigTree*. A sequência de *A. nuneztovari* foi utilizada como grupo externo na construção da árvore filogenética.

Tabela 3: Sequências utilizadas no estudo da filogenia de FBN9.

Nome da Sequência	Número de acesso	Espécie	Procedência
<i>A. aquasalis</i>	-----	<i>A. aquasalis</i>	Brasil (colônia CPqRR)
<i>A. darlingi</i>	-----	<i>A. darlingi</i>	Brasil (Manaus)
<i>A. albitarsis</i> _AM	-----	<i>A. marajoara</i>	Brasil (Manaus)
<i>A. albitarsis</i> _RO	-----	<i>A. marajoara</i>	Brasil (Porto Velho)
<i>A. nuneztovari</i>	-----	<i>A. nuneztovari</i>	Brasil (Manaus)
167861637_ARA087_B 167861647_ARA125_A	Gi: 167861637 Gi: 167861647	<i>A. arabiensis</i>	Camarões (Kousseri)
167861689_GAM72_A 167861685_GAM69_A 167861683_GAM66 167861679_GAM15_A 167861677_GAM13_B 167861673_GAM07_B	Gi: 167861689 Gi: 167861685 Gi: 167861683 Gi: 167861679 Gi: 167861677 Gi: 167861673	<i>A. gambiae</i>	Camarões (Mbebé e Nyabéssan)
167861749_QUA24_B 167861735_QUA16	Gi: 167861749 Gi: 167861735	<i>A. quadriannulatus</i>	África do Sul (Parque Nacional Kruger)
167861725_MER563_A 167861721_MER562_A	Gi: 167861721 Gi: 167861721	<i>A. merus</i>	Moçambique (Furvela)
167861701_MEL22 167861697_MEL15	Gi: 167861701 Gi: 167861697	<i>A. melas</i>	Camarões (Ipono)
167861663_BWA17 167861667_BWA18_B	Gi: 167861663 Gi: 167861667	<i>A. bwambae</i>	Uganda (Bwamba)

5 RESULTADOS

5.1 Identificação dos mosquitos

Os mosquitos adultos de três espécies diferentes (*A. darlingi*, *A. albitarsis* e *A. nuneztovari*), coletados no estado do Amazonas, foram identificados de acordo com a chave proposta por Consoli e Oliveira (1994)⁶. Os mosquitos que recebemos de Rondônia foram identificados morfológicamente como pertencentes à espécie *A. braziliensis*.

As regiões de ITS2 das espécies identificadas morfológicamente e de *A. aquasalis* (colônia) foram sequenciadas e as sequências geradas foram analisadas utilizando-se o pacote de programas Phred/Phrap/Consed conforme descrito na metodologia. As regiões consenso resultantes contendo apenas regiões de alta qualidade, possuíam aproximadamente 500 pb e foram utilizadas para um BlastN contra o Banco de Dados gerado a partir das sequências de ITS2 dos vetores de malária da Amazônia²⁴ e das sequências de ITS2 das espécies do Complexo Albitarsis²³.

O BlastN contra as sequências de ITS2 dos anofelinos vetores de malária na Amazônia²⁴ permitiu a confirmação da identificação morfológica de *A. darlingi*, *A. albitarsis* (Amazonas) e de *A. nuneztovari*. Além disso, o resultado obtido possibilitou a detecção de um erro cometido na identificação morfológica da espécie proveniente de Rondônia. A espécie que teria sido descrita como *A. braziliensis* foi molecularmente identificada como *A. albitarsis*.

No entanto, este Blast não possibilitou a determinação das espécies do Complexo Albitarsis. Para isso, foi realizado um BlastN contra as sequências de ITS2 depositadas no *GenBank* por Li e Wilkerson (2007)²³ referentes às diferentes espécies do Complexo Albitarsis.

O resultado deste último Blast demonstrou que *A. albitarsis* coletado no Amazonas e *A. albitarsis* coletado em Rondônia pertenciam à espécie *A. marajoara*. Os resultados destas análises encontram-se representados na tabela 4. Os valores de *Score* são fornecidos de acordo com os alinhamentos gerados baseando-se nas substituições, tamanho do alinhamento, *gaps* e identidade entre as sequências. Quanto melhor o alinhamento, maior a pontuação obtida no *Score*. O *e-value* é determinado como *Expectation value* e trata-se de um parâmetro de confiança. Quanto menor o valor do *e-value*, menor a probabilidade do alinhamento em questão ter sido encontrado ao acaso no banco de dados, e não devido à uma real similaridade⁷⁷.

Tabela 4: Identificação molecular das espécies identificadas morfológicamente.

Amostra de acordo com a identificação morfológica	Sequência encontrada no resultado do BlastN	% identidade	Comprimento do alinhamento	e-value	score
<i>A. aquasalis</i>	AF462376.1 <i>A. aquasalis</i> ^a	99	459	0.0	870
<i>A. albitarsis</i> _AM	AF462385.1 <i>A. albitarsis</i> ^a	99	476	0.0	928
	AY828339.1 <i>A. marajoara</i> ^b	99	356	0.0	698
<i>A. braziliensis</i> _RO	AF462385.1 <i>A. albitarsis</i> ^a	99	478	0.0	932
	AY828339.1 <i>A. marajoara</i> ^b	99	356	0.0	698
<i>A. nuneztovari</i>	AF461749.1 <i>A. nuneztovari</i> ^a	99	487	0.0	936
<i>A. darlingi</i>	AF462388.1 <i>A. darlingi</i> ^a	99	531	0.0	1045

^a Sequência referente ao artigo de Marrelli e colaboradores (2005)²⁴ no qual são estudadas ITS2 dos anofelinos vetores de malária na Amazônia.

^b Sequência referente ao artigo Li e Wilkerson (2007)²³ a partir do qual foram depositadas as sequências de ITS2 das diferentes espécies do Complexo Albitarsis.

5.2 Amplificação de FBN9 e Tep1 nos anofelinos brasileiros.

Os prováveis ortólogos de Tep1 e FBN9 foram identificados em *A. aegypti*, através das buscas de similaridades. Utilizando o programa Artemis⁶², os domínios destas proteínas foram anotados nas sequências encontradas em *A. aegypti* para confirmação de que as mesmas correspondem às proteínas ortólogas.

A proteína ortóloga a FBN9 em *A. aegypti* (número de acesso no *GenBank*: AY432284.1) possui o mesmo domínio Fibrinogênio C (Pfam: PF00147) que o FBN9 de *A. gambiae* e ambas apresentam várias regiões conservadas (Figura 3).

Na proteína identificada em *A. aegypti* como ortóloga de Tep1 (*GenBank*: AAEL001794) foram encontrados 5 domínios da família das Alpha-2-Macroglobulinas (Pfam: PF01835, PF07703, PF00207, PF7678 e PF07677), além de um domínio Alpha-Macroglobulina com Ligação Tioéster (Pfam: PF10569), sendo todos estes domínios também presentes em Tep1 de *A. gambiae*. O alinhamento destas duas sequências encontra-se representado na figura 4.

As sequências das proteínas FBN9 e Tep1 de *A. gambiae* foram alinhadas com suas prováveis ortólogas e as regiões conservadas foram utilizadas para o desenho dos iniciadores degenerados, conforme representado nas figuras 3 e 4

As PCRs realizadas com os iniciadores degenerados permitiram inicialmente a amplificação de Tep1 e FBN9 em *A. aquasalis*, *A. albitarsis* (AM), *A. albitarsis* (RO), *A. darlingi* e *A. nuneztovari* (Figura 5).

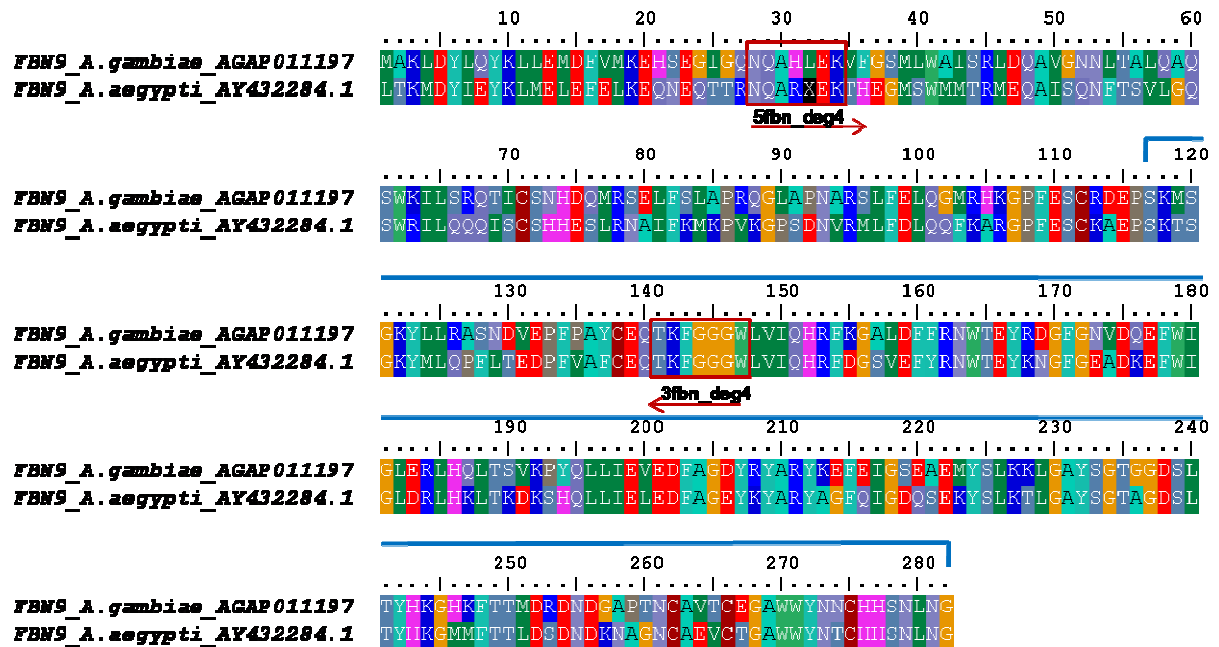
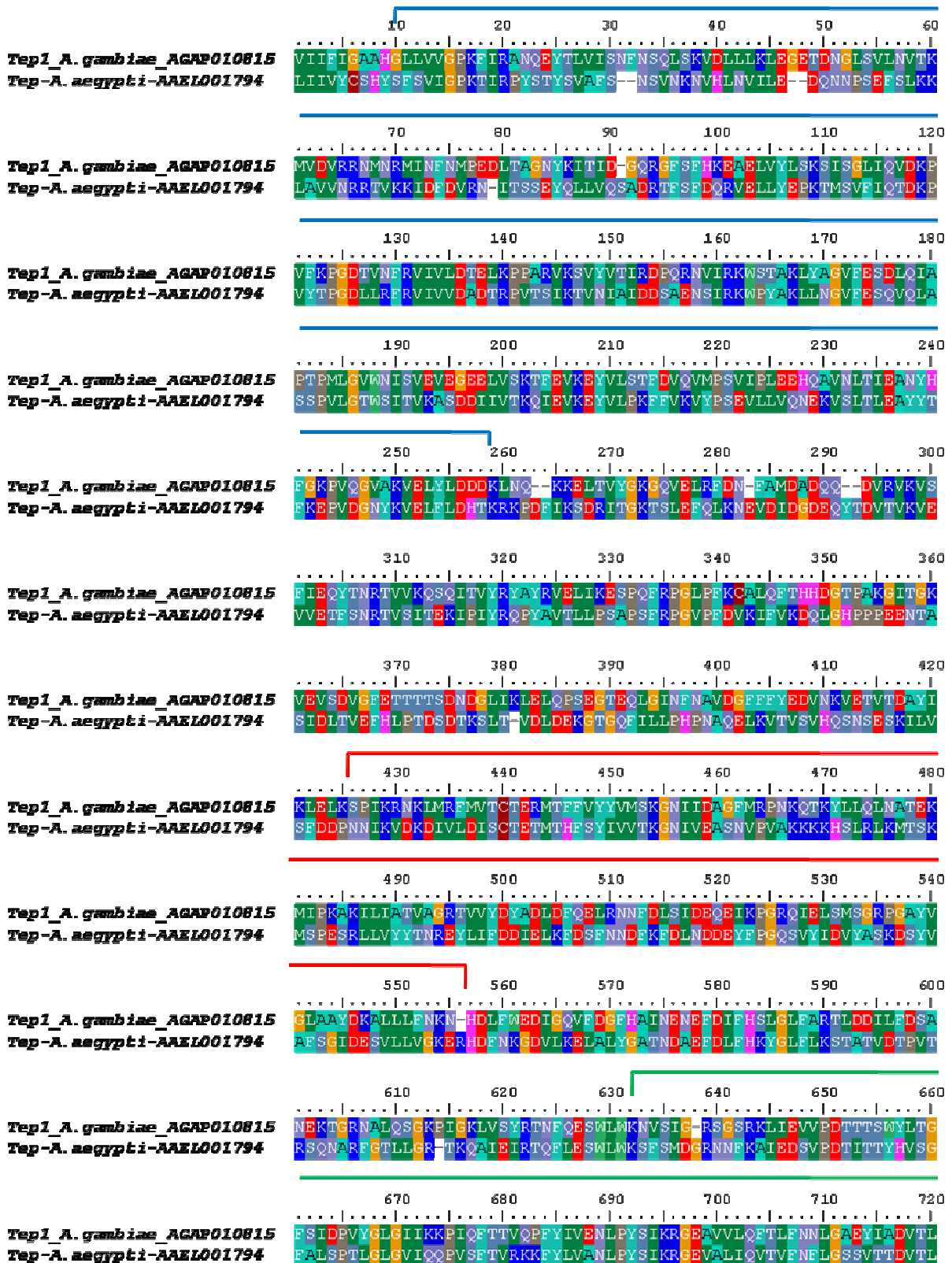


Figura 3: Alinhamento da seqüência da proteína FBN9 de *A. gambiae* com sua provável ortóloga identificada em *A. aegypti*. Os retângulos destacam as regiões utilizadas para o desenho dos iniciadores degenerados e as setas indicam o sentido dos iniciadores. A barra azul indica a região correspondente ao domínio Fibrinogênio C (Resíduos 117 ao 282).



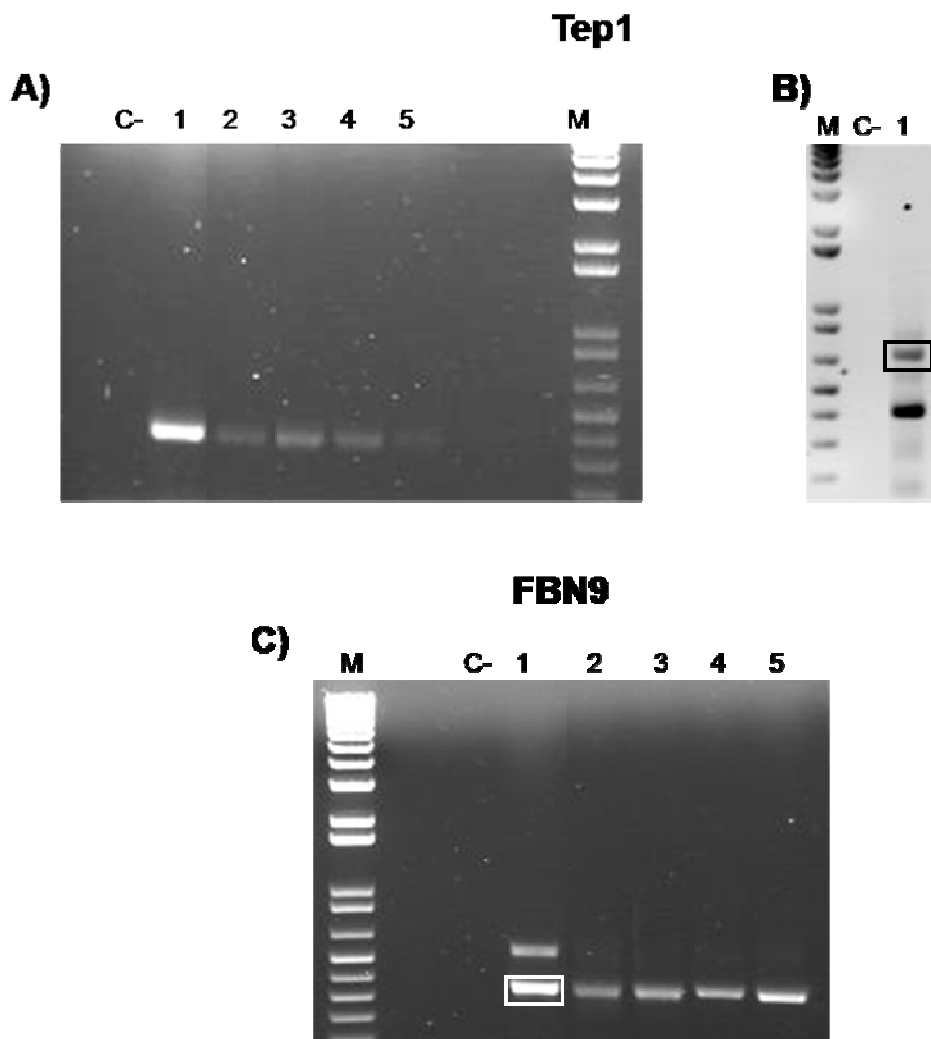


Figura 5: Géis com os produtos das PCRs realizadas com os iniciadores degenerados. C-= Controle Negativo; 1= DNA de *A. aquasalis*; 2= DNA de *A. darlingi*; 3= DNA de *A. albitarsis* AM; 4= DNA de *A. albitarsis* RO; 5= DNA de *A. nuneztovari*, M= Marcador *1kb plus ladder* (Invitrogen). A) Iniciadores 5step_deg1 e 3 tep_deg1. Tamanho esperado do amplicon: 375 pb. B) Iniciadores 5step_deg2 e 3tep_deg2. Tamanho esperado do amplicon: 675 pb. C) Iniciadores 5fbn_deg4 e 3fbn_deg4. Tamanho esperado do amplicon : 390 pb. As bandas marcadas com um retângulo foram cortadas do gel e o DNA foi purificado para a clonagem.

5.3 Sequenciamento dos genes alvo.

Os produtos da clonagem dos amplicons em *pGEM-T* foram transformados em bactérias TOP10 e os produtos confirmados pelos PCRs de colônia foram submetidos ao sequenciamento.

O sequenciamento e as análises dos resultados permitiram obter as sequências de FBN9 em *A. aquasalis*, *A. darlingi*, *A. albitarsis* AM, *A. albitarsis* RO e *A. nuneztovari*. Os três primeiros resultados obtidos pelas buscas de similaridade utilizando o algoritmo Blast foram sumarizados na tabela 5. Pela análise da tabela observa-se que para as sequências de todas as espécies, quando realizado o BlastX contra o banco de dados de *A. gambiae*, foram encontrados como primeiro *hit* FBN9 de *A. gambiae*, sendo que os outros dois *hits* (AGAP011224 e AGAP011231) correspondem a proteínas ainda não estudadas mas que possuem o domínio Fibrinogênio C (Pfam: PF00147). Observa-se também a grande diferença entre o primeiro *hit* e os demais, indicando que o gene ortólogo a FBN9 de *A. gambiae* foi identificado em todas as espécies alvo.

As sequências geradas a partir dos produtos das PCRs com os iniciadores 5step_deg1 e 3stepdeg1, quando submetidas ao BlastX contra o banco de dados de *A. gambiae*, encontrou, em todos os casos, dois *hits* muito similares. Estes *hits* correspondem à Tep1 (AGAP01815) e Tep4 (AGAP01812), e um terceiro hit com Tep15 (AGAP008364). Em *A. aquasalis* e em *A. nuneztovari*, o primeiro *hit* corresponde à Tep1 e nas demais espécies corresponde à Tep4, no entanto, devido ao alto grau de conservação entre estas sequências não é possível determinar com precisão a proteína Tep identificada (Tabela 6).

O sequenciamento do produto da PCR de *A. aquasalis* com os iniciadores 5step_deg2 e 3 Tep_deg2 (Figura 5-B), mostrou que uma das sequências obtida apresentava 81,91% de identidade com outra Tep de *A. gambiae* (AGAP008366) que não se tratava de Tep1 (Tabela 7). Apesar desta Tep de *A. gambiae* não possuir identificação como uma proteína desta família, esta apresenta, os domínios Componente do Complemento Alpha-Macroglobulina (Pfam: PF07678) e Alpha 2 Macroglobulina (Prosite:PS00477). Trata-se de um gene composto por dois éxons, e a proteína correspondente possui 247 resíduos de aminoácidos. Como várias proteínas desta família são identificadas como importantes na resposta imune de diversos organismos^{39,47,78} decidimos estudar esta proteína identificada e já que esta proteína de *A. gambiae* não está anotada nos referimos a ela neste trabalho como TepX. Para uma análise mais aprofundada, neste trabalho, TepX foi estudada somente em *A. aquasalis*.

Tabela 5: Resultado do BlastX realizado com as sequências obtidas a partir da amplificação com os iniciadores de FBN9, contra o banco de dados de *A.gambiae*.

Sequência obtida e submetida ao BlastX	Resultado encontrado no BlastX ^a	% identidade	Comprimento do alinhamento	e-value	score
<i>A. aquasalis</i>	AGAP011197 - FBN9	78,51	120	1,00E-53	200
	AGAP011224	45,79	107	3,00E-18	87
	AGAP011231	43,52	108	1,00E-14	75.5
<i>A. darlingi</i>	AGAP011197 - FBN9	78	121	7,00E-53	202
	AGAP011224	46	107	3,00E-18	87.0
	AGAP011231	44	108	8,00E-15	75.9
<i>A. albitarsis_AM</i>	AGAP011197 - FBN9	78	121	2,00E-53	203
	AGAP011224	46	107	9,00E-19	89.0
	AGAP011231	44	108	4,00E-15	77.0
<i>A. albitarsis_RO</i>	AGAP011197 - FBN9	77	121	9,00E-53	201
	AGAP011224	45	107	3,00E-18	87.0
	AGAP011231	44	108	4,00E-15	77.0
<i>A. nuneztovari</i>	AGAP011197 - FBN9	77	121	9,00E-53	201
	AGAP011224	44	107	6,00E-18	86.3
	AGAP011231	43	108	6,00E-15	76.3

^a Três resultados com maior *score* e menor *e-value* obtidos no BlastX

Tabela 6: Resultado do BlastX realizado com as sequências obtidas a partir da amplificação com os iniciadores de TEP1 (5tep_deg1 e3tep_deg1), contra o banco de dados de *A.gambiae*.

Sequência obtida e submetida ao BlastX	Resultado encontrado no BlastX ^a	% identidade	Comprimento do alinhamento	e-value	score
<i>A. aquasalis</i>	AGAP010815 - Tep1	59,68	124	5,00E-39	156
	AGAP010812 - Tep4	58,54	123	2,00E-37	150
	AGAP008364 - Tep15	47,54	122	5,00E-28	119
<i>A. darlingi</i>	AGAP010812 - Tep4	60	123	4,00E-39	156
	AGAP010815 - Tep1	58	124	2,00E-37	150
	AGAP008364 - Tep15	45	122	5,00E-28	119
<i>A. albitarsis_AM</i>	AGAP010812 - Tep4	67	126	5,00E-49	189
	AGAP010815 - Tep1	69	126	1,00E-48	188
	AGAP008364 - Tep15	51	124	1,00E-33	139
<i>A. albitarsis_RO</i>	AGAP010812 - Tep4	68	125	5,00E-49	189
	AGAP010815 - Tep1	70	125	9,00E-49	188
	AGAP008364 - Tep15	52	123	1,00E-33	138
<i>A. nuneztovari</i>	AGAP010815 - Tep1	70	124	1,00E-48	188
	AGAP010812 - Tep4	68	123	4,00E-47	183
	AGAP008364 - Tep15	50	122	7,00E-32	132

^a Três resultados com maior *score* e menor *e-value* obtidos no BlastX

Tabela 7: Resultado do BlastX realizado com as sequências obtidas a partir da amplificação com os iniciadores de Tep1 (5tep_deg2 e3tep_deg2), contra o banco de dados de *A.gambiae*.

Sequência obtida e submetida ao BlastX	Resultado encontrado no BlastX ^a	% identidade	Comprimento do alinhamento	e-value	score
<i>A. aquasalis</i>	AGAP008366 - TepX	81,91	94	2,00E-40	160
	AGAP008364 - Tep15	69,09	110	1,00E-38	155
	AGAP010815 - Tep1	45,05	111	2,00E-19	91,3

^a Três resultados com maior *score* e menor *e-value* obtidos no BlastX

Por meio do sequenciamento obtivemos regiões do gene FBN9 de *A. aquasalis*, *A. darlingi*, *A. nuneztovari* e *A. albitarsis* (AM e RO) e estas sequências foram analisadas conforme descrito na metodologia. As sequências obtidas de FBN9 são compostas por 363 nucleotídeos, que correspondem a 120 aminoácidos, localizados na porção inicial, dos 282 resíduos totais que compõem esta proteína (nucleotídeos 82 a 442 do gene e aminoácidos 28 a 148 da proteína). Isto equivale a uma cobertura de 42,55% e a região sequenciada apresenta parte do domínio Fibrinogênio C (PF0147), característico de FBN9 (31 aminoácidos, sítios 90 a 120) (Figura 6).

As sequências referentes à Tep1/Tep4 foram obtidas em *A. aquasalis*, *A. darlingi*, *A. nuneztovari* e *A. albitarsis* (AM e RO). Essas sequências são compostas por 366 nucleotídeos, que correspondem a 122 aminoácidos dos 1348 aminoácidos que compõe Tep1, o que equivale a uma cobertura de 9,05%. As sequências dos anofelinos brasileiros se alinham entre os resíduos 862 e 895 da proteína de *A. gambiae*, região na qual estão inseridos os domínios Componente do Complemento Alpha-2-Macroglobulina (Pfam: PF07678) e o domínio Alpha-Macroglobulina formando uma Ligação Tioéster (Pfam: PF07678). A figura 7 representa a região alinhada entre as sequências obtidas nos anofelinos brasileiros e Tep1 e Tep4 de *A. gambiae*.

As sequências referentes à TepX (AGAP008366) foram obtidas apenas em *A. aquasalis*, e esta sequência apresenta uma cobertura de 39,24% da proteína completa de *A. gambiae* e se localiza na porção final, entre os resíduos 146 a 237. Dentro da região alinhada foi observado 81,91% de identidade e estão presentes parte do domínio Macroglobulina A2 (PROSITE: PS00477) e o domínio Componente do Complemento Alpha-2-Macroglobulina (Pfam: 07678) (Figura 8).

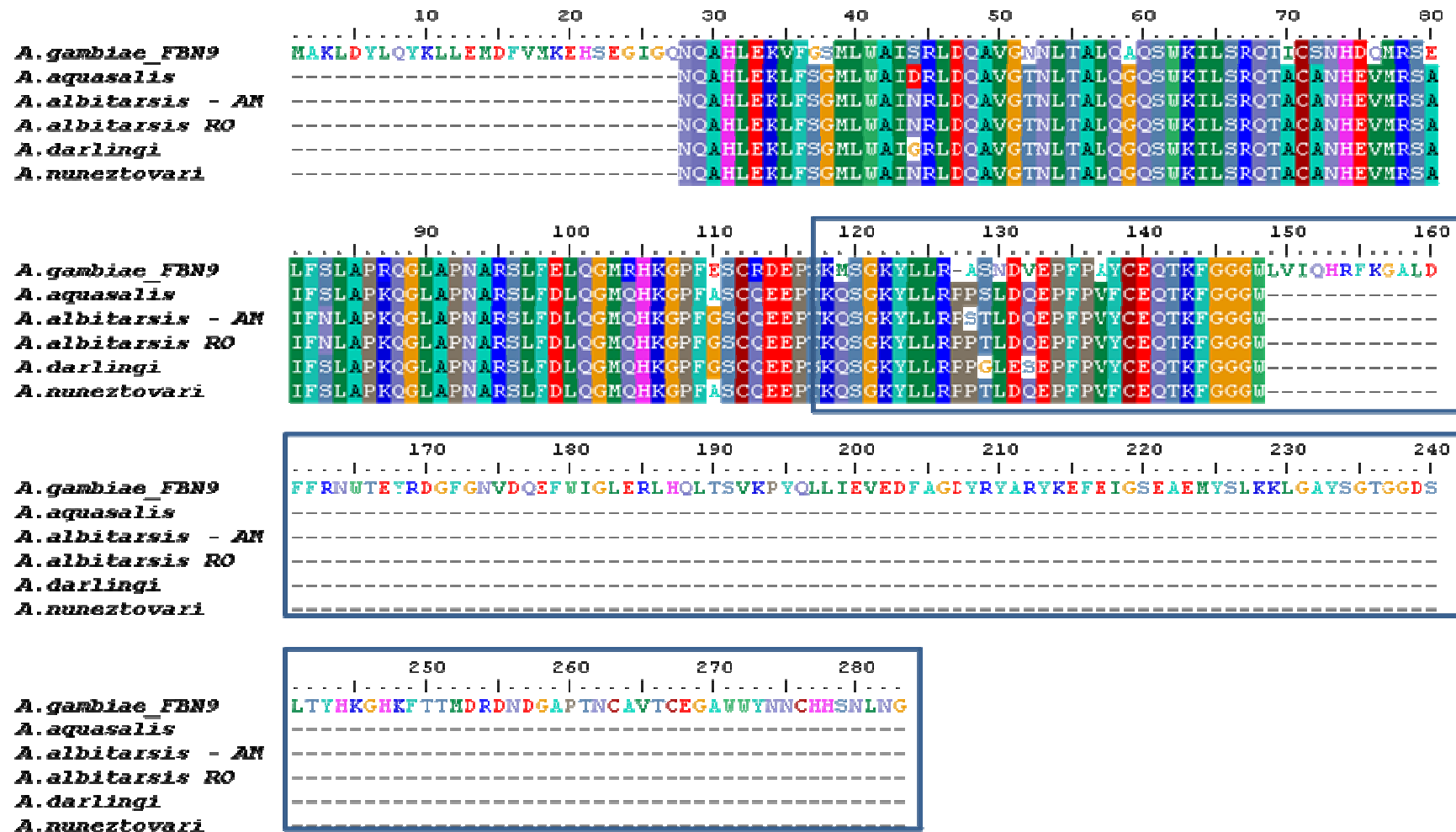


Figura 6: Alinhamento utilizando o algoritmo Clustal entre as sequências encontradas nos anofelinos brasileiros e a sequência referência de *A. gambiae* (AGAP011197). A região correspondendo ao domínio fibrinogênio C encontra-se destacada com o retângulo azul.

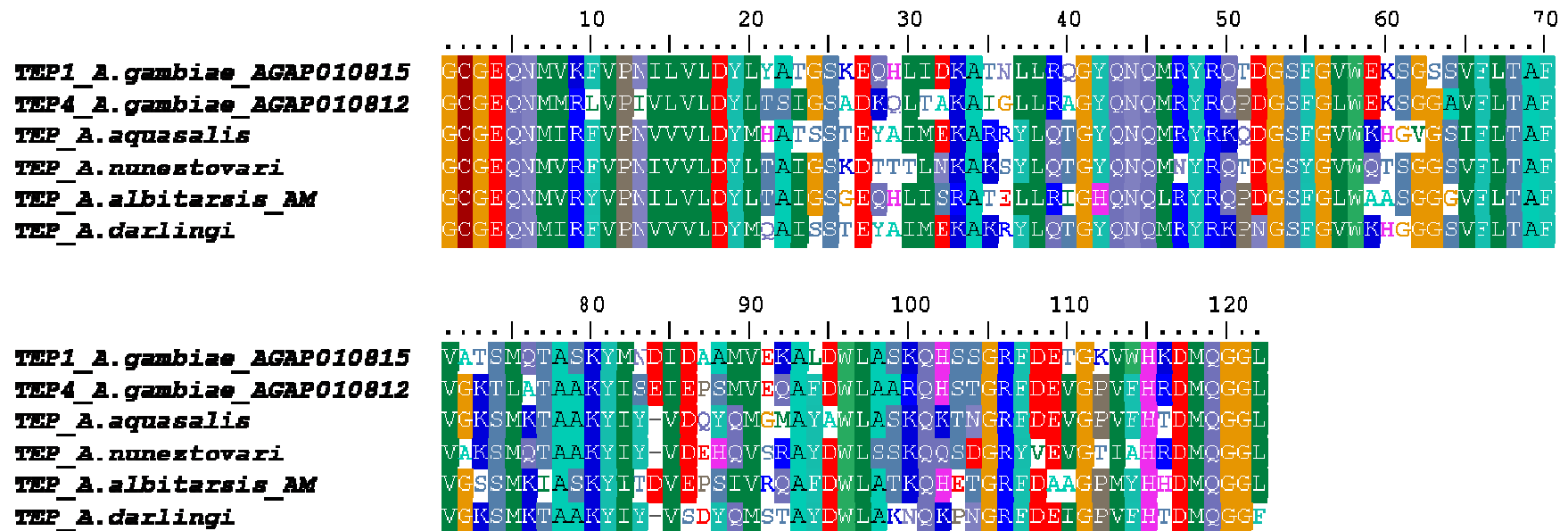


Figura 7: Alinhamento das sequências de Tep1-Tep4 obtidas nos vetores brasileiros e as regiões correspondentes de Tep1 e Tep4 de *A. gambiae*.

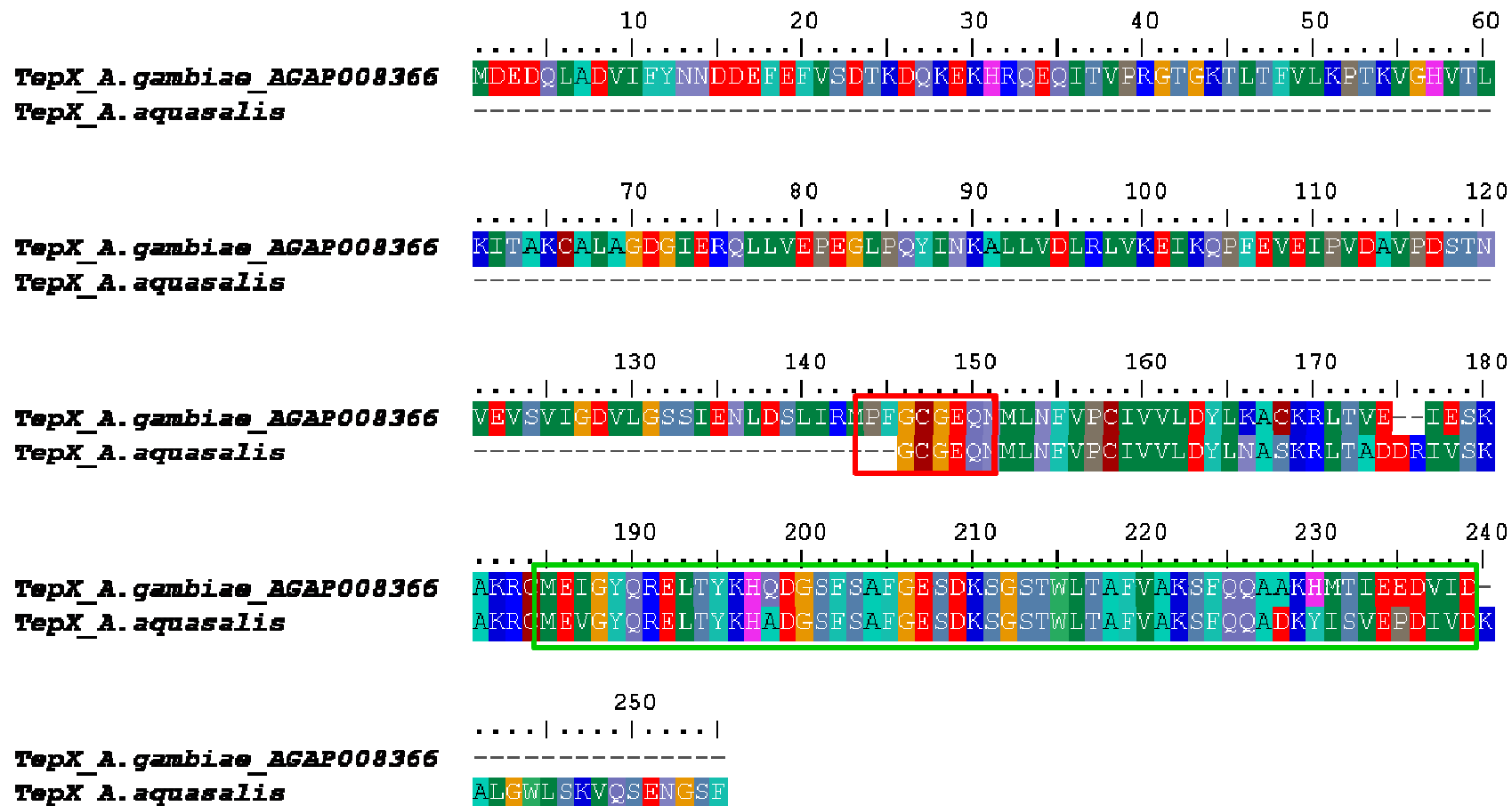


Figura 8: Representação do Alinhamento de TepX de *A. gambiae* (AGAP008366) e TepX identificada em *A. aquasalis*. Os domínios Macroglobulina A2 (PROSITE: PS00477) e Componente do Complemento Alpha-2-Macrobulina (Pfam: PF07678) encontram-se destacados com os retângulos vermelho e verde, respectivamente.

5.4 Análise da conservação entre as sequências

5.4.1 FBN9

No fragmento analisado das sequências de FBN9 dos anofelinos brasileiros estudados, foram identificados 79 nucleotídicos polimórficos, dos quais 9 correspondem à primeira base do codon (11,33%), 6 correspondem à segunda base do codon (7,59%) e 64 correspondem à terceira base do codon (81,01%). A maior frequência de mutações na terceira base reflete um maior número de substituições sinônimas. Dos 72 codons polimórficos encontrados, 64 resultam em substituições sinônimas e 8 em substituições não-sinônimas. Em 7 sitios há possibilidade de mais de 2 bases e nestes casos foi considerado um evento de transição e um de transversão. No total, foram observadas 61 transições e 25 transversões (taxa transição/transversão 2,44).

Quando inserimos nesta comparação de FBN9 das espécies brasileiras, a região correspondente de FBN9 de *A. gambiae* (Número de acesso no *Ensembl*: ENSANGT00000011248)⁶¹, foram identificados 128 nucleotídicos polimórficos, dos quais 24 correspondem à primeira base do codon (18,75%), 18 correspondem à segunda base do codon (14,06%) e 86 correspondem à terceira base (67,18%). Foram observados 104 codons polimórficos, dos quais 75 resultam em substituições sinônimas e 29 resultam em substituições não sinônimas. Em 22 sitios há possibilidade de mais de 2 bases, e no total foram identificadas 91 transições e 59 transversões (taxa transição/transversão 1,5).

Utilizando o programa *MEGA*⁶⁵, analisamos as 60 sequências de FBN9 das 6 espécies do complexo *A. gambiae*¹² obtidas no *GenBank*, juntamente com as 5 sequências das 4 espécies de anofelinos brasileiros que obtivemos. Para isso, as regiões das sequências de *A. gambiae* correspondentes às regiões sequenciadas nos anofelinos brasileiros foram selecionadas para o alinhamento.

Foram calculadas as taxas de substituições não-sinônimas e sinônimas através do método de Nei-Gojobori⁶⁶ com a correção de Jukes-Cantor⁶⁷. Baseado nos valores de d_N e d_S gerados, foram calculadas as razões entre d_N e d_S e estes resultados podem ser visualizados na tabela 8. A razão dN/dS encontrada para em toda a região analisada (nucleotídeos 1 a 364) foi 0,07476, enquanto que na região anterior ao domínio (nucleotídeos 1 a 270) foi 0,06567 e na região correspondente ao domínio (nucleotídeos 271 a 364) a razão dN/dS foi 0,10801. Foi realizado um Teste de Máxima Verossimilhança para verificar se as razões dN/dS são significativamente diferentes entre as regiões anterior ao domínio, a região do domínio e considerando a região completa estudada e o resultado demonstrou que não existe diferença estatisticamente significativa.

Tabela 8: Resultado do cálculo de d_N e d_S realizado no programa *MEGA*. Valores de d_N e d_S expressos juntamente com o erro padrão.

Sequência FBN9	Região da sequência de nucleotídeos	$d_N \pm EP^a$	$d_S \pm EP^a$	d_N / d_S
Região total sequenciada	sítios de 1 a 364	0,024 ± 0,004	0,321 ± 0,043	0,07476
Anterior ao domínio Fibrinogênio C	sítios de 1 a 270	0,022 ± 0,004	0,335 ± 0,047	0,06567
Correspondente ao domínio Fibrinogênio C	sítios de 271 a 364	0,031 ± 0,012	0,287 ± 0,051	0,10801

^a Os valores de d_N e d_S foram calculados utilizando o método de Nei-Gojobori com correção de Jukes-Cantor. Foi realizado um Teste de Máxima Verossimilhança para verificar se as razões d_N/d_S são estatisticamente diferentes. $P > 0,05$.

5.4.2 TepX

No alinhamento entre as sequências de nucleotídeos de TepX de *A. aquasalis* e sua região correspondente em TepX de *A. gambiae*, foram observados 73 sítios polimórficos, dos quais 12 correspondem à primeira base do codon (16,44%), 9 correspondem à segunda base do codon (12,32%) e 52 correspondem à terceira base do codon (71,23%). A maior frequência de mutações na terceira base reflete um maior número de substituições sinônimas. Dos 58 codons polimórficos encontrados, 44 resultam em substituições sinônimas e 14 em substituições não-sinônimas. É observado também um *indel* de 6 nucleotídeos seguidos, os quais estão presentes em *A. aquasalis* e ausentes em *A. gambiae*. O alinhamento evidencia 33 transições e 40 transversões (taxa transição/transversão 0,8).

5.5 Análise filogenética de FBN9

O alinhamento das sequências de nucleotídeos selecionadas neste trabalho demonstrou alta conservação entre as diferentes espécies. Como mencionado anteriormente, essa região alinhada corresponde a 42,55% do gene FBN9.

A árvore filogenética apresentada na figura 9 foi obtida pela análise bayesiana implementada no programa *MrBayes*⁷⁵. A topologia da árvore descrita neste trabalho sugere a presença de dois grupos de sequências distintas com valor estatístico significativo ($pp=1$). Um dos grupos representa os anofelinos brasileiros (indicados em rosa na Figura 9) e o outro corresponde aos anofelinos africanos do complexo *A. gambiae* (indicados em azul).

Todas as relações filogenéticas do grupo dos anofelinos brasileiros apresentaram suporte estatístico significativo formando um clado bem definido (Figura 9). As sequências de *A. albitarsis* provenientes do Amazonas (AM) e de Rondônia (RO) estão mais proximamente relacionadas (pp=1) bem como as sequências de *A. aquasalis* com *A. nuneztovari* (pp=0,97). A sequência de *A. darlingi* está mais próxima a este grupo do que daquele representando os anofelinos africanos.

Dentre os anofelinos africanos do Complexo Gambiae, somente as relações filogenéticas com valores de probabilidade posterior superiores a 0,80 serão discutidas aqui conforme descrito na metodologia. Os diferentes isolados de *A. melas* formam um clado (indicado em roxo; pp=0,91), assim como os isolados de *A. quadriannulatus* e *A. merus* (vermelho; pp=0,92). Dois dos isolados de *A. gambiae* juntamente com um isolado de *A. arabiensis* (azul; pp=0,81) estão também indicados. Os isolados de *A. gambiae* e *A. arabiensis* formam outro clado (azul; 0.8), porém a relação entre essas sequências não foi elucidada claramente. As relações filogenéticas entre as demais sequências não apresentaram suporte estatístico e, portanto, são consideradas não resolvidas.

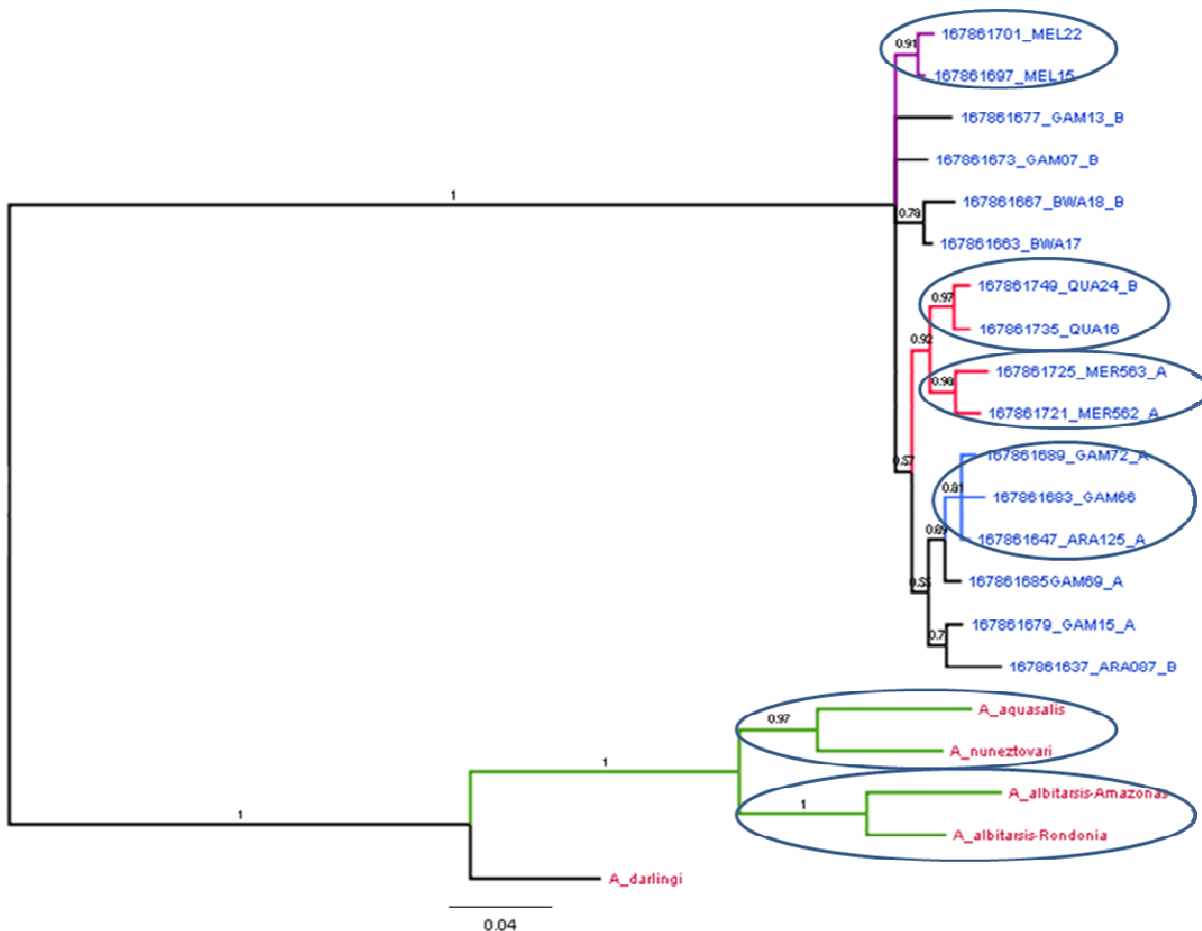


Figura 9: Árvore filogenética de sequências parciais do gene FBN9 de 10 espécies de anofelinos. As espécies de anofelinos brasileiros (presente trabalho) e africanos¹² estão indicadas em rosa e azul, respectivamente. No caso das espécies do complexo *A. gambiae*, as abreviaturas se referem a: MEL=*A. melas*; GAM=*A. gambiae*, BWA=*A. bwambae*; QUA=*A. quadriannulatus*; MER=*A. merus*; ARA=*A. arabiensis*. Valores de probabilidade a posteriori (pp) representados. Agrupamentos com pp igual ou superior a 0.80 estão destacados pelos ramos coloridos e/ou círculo.

5.6 Quantificação da expressão do RNA mensageiro de *Tep1* e *TepX* em *A. aquasalis* infectados e não infectados com *P.vivax*

A quantificação relativa do cDNA sintetizado a partir do RNA mensageiro pode ser realizada de duas formas, pela comparação das Cts ou baseada em Curva Padrão.

Para a realização da quantificação relativa utilizando o método de Comparação de Cts é necessário que os iniciadores utilizados tenham eficiência aproximadamente igual. A inclinação de uma curva padrão (*Slope*) é utilizada para estimar a eficiência de uma reação de PCR em Tempo Real. Uma curva padrão com um valor de inclinação de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência.

Para calcular a eficiência, construímos uma curva padrão com cada iniciador, e utilizamos a fórmula: $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$. A tabela XX representa os valores encontrados

Tabela 9: Eficiência dos iniciadores utilizados no PCR em tempo real.

Gene	Iniciadores	Slope	R2	Eficiência
RP49	5aquaexpRP 3aeaquaRP1b	-3,99383	0,995143	77,98%
FBN9	fbn_real-timeF fbn_real-timeR	0,772458	0,524574	-----
Tep1	tep1_real-timeF tep1_real-timeR	-5,30284	0,975801	54,37%
TepX	tepx_real-timeF tepx_real-timeR	-2,79798	0,909472	42,96%

Os iniciadores para a PCR em Tempo Real apresentaram eficiência diferenciada, mesmo após modificações em diversos parâmetros, como condições de ciclagem, concentração de cDNA e condições na síntese do cDNA, conforme sugerido pelo manual ⁷¹. Mesmo o iniciador RP49, que se encontra publicado como um controle endógeno para *A. aquasalis*, não apresentou a eficiência recomendada para se realizado o método de comparação de Cts. Em todos os testes, FBN9 apresentou curvas padrões inconstantes e valores de inclinação positivos, desta forma, a quantificação não foi realizada para este gene, sendo indicado o desenho de outros iniciadores degenerados para este objetivo.

Desta forma, foi escolhido o método de Quantificação Relativa Baseado em Curva Padrão. De acordo com o manual da *Applied Biosystem*, este método necessita de menos validação, já que a eficiência dos iniciadores alvos e o do controle endógeno não necessitam ser equivalentes. É considerado um método que apresenta resultados acurados de quantificação, e é indicado para quando se deseja estudar pequena quantidade de genes, já que a presença das curvas padrões em todas as placas acarreta em maior quantidade de reagentes.

Os resultados obtidos por esta quantificação encontram-se representados nas tabelas 10, 11 e 12. Foi encontrado que Tep1 é 4,73 vezes mais expressa em carcaças de mosquitos infectados em relação aos controles, conforme apresentado na figura 10. Já TepX, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa entre a expressão na carcaça de mosquitos infectados e não infectados, nos intestinos de mosquitos infectados, é 6,512 vezes mais expressa em relação à intestinos controles (Figura 11).

Tabela 10: Quantificação relativa da expressão de Tep1 em carcaças de mosquitos *A. aquasalis* infectados e não-infectados através de PCR em tempo real.

Amostra	TEP1 ng total	RP49 ng total	TEP1 normalizado por RP49	TEP1 relativo à carcaça controle
Carcaça controle	757	498		
	737	400		
	563	461		
Média ± DP^a	685,66 ± 106,70	453 ± 49,49	1,51 ± 0.2844	-----
Carcaça infectada	1950	291		
	2040	286		
	2080	271		
Média ± DP^a	2023,33 ± 66,58	282,66 ± 10,40	7,15 ± 0,35	4,73 ± 0,23

^a Média das triplicatas

Tabela 11: Quantificação relativa da expressão de TepX em carcaças de mosquitos *A. aquasalis* infectados e não-infectados através de PCR em tempo real.

Amostra	TEPX ng total	RP49 ng total	TEPX normalizado por RP49	TEPX relativo à carcaça controle
Carcaça controle	482	284		
	385	313		
	507	368		
Média ± DP^a	458 ± 64,44	321,66 ± 42,66	1,423 ± 0,2752	-----
Carcaça infectada	259	191		
	262	197		
	288	184		
Média ± DP^a	269,66 ± 15,94	190,06 ± 6,50	1,418 ± 0.0968	0.996 ± 0.068

^a Média das triplicatas

Tabela 12: Quantificação relativa da expressão de TepX em intestinos de mosquitos *A. aquasalis* infectados e não-infectados através de PCR em tempo real.

Amostra	TEPX ng total	RP49 ng total	TEPX normalizado por RP49	TEPX relativo ao intestino controle
Intestino controle	403	246		
	359	213		
	455	214		
Média ± DP^a	405,66 ± 48,05	224,33 ± 18.77	1,808 ± 0.26	-----
Intestino infectado	1260	115		
	1260	105		
	1210	96,8		
Média ± DP^a	1243,33 ± 28,86	105.6 ± 9,11	11,774 ± 1,049	6,512 ± 0.58

^a Média das triplicatas

As curvas utilizando Tep1 e os intestinos como amostra não apresentaram reprodutibilidade entre os experimentos, sendo necessários maiores validações para a quantificação de Tep1 nestas amostras.

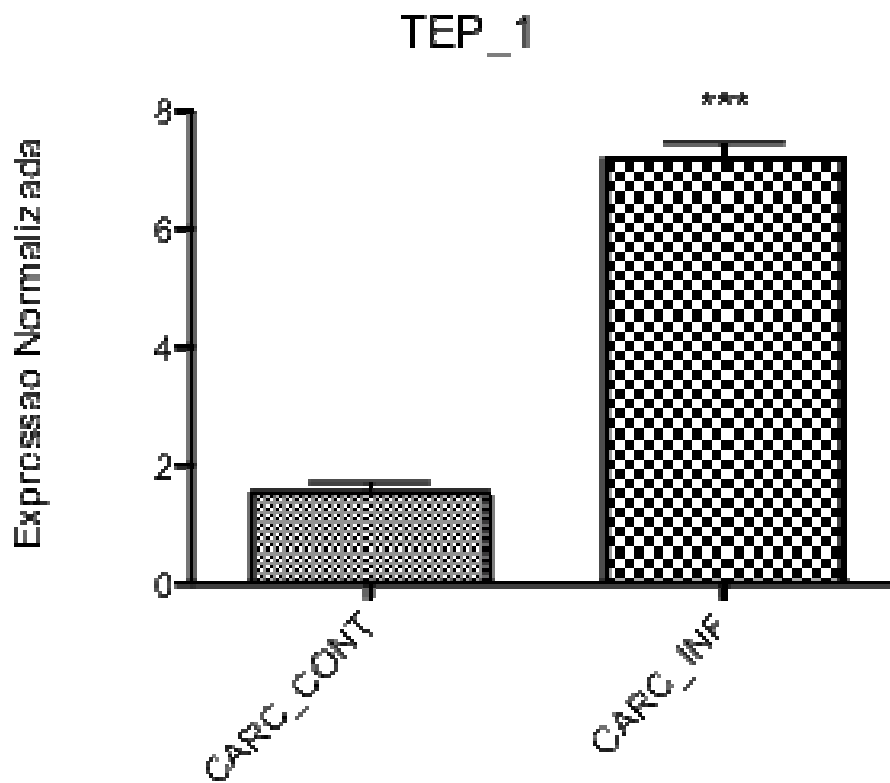


Figura 10: Expressão de TEP1 em carcaças de mosquitos infectados com *P.vivax* e mosquitos controle. Esta expressão foi normalizada pela expressão do controle endógeno RP49. *** $P < 0,001$, de acordo com o Teste t realizado.

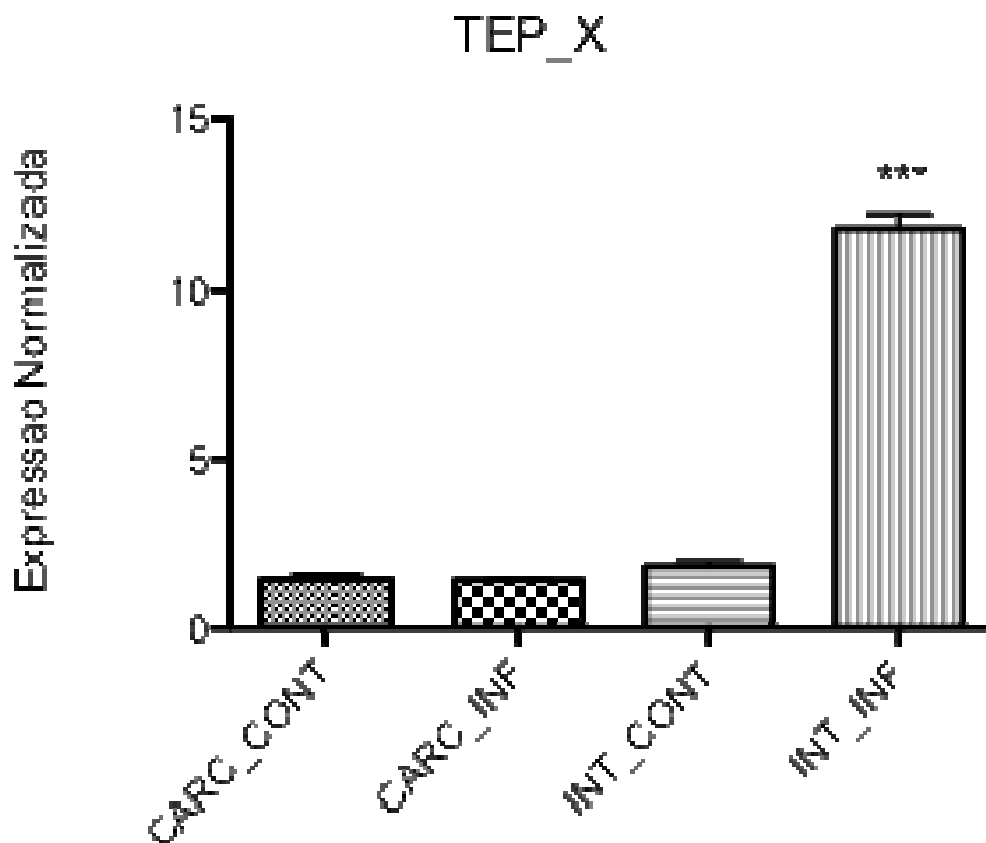


Figura 11: Expressão de TepX em carcaças e intestinos de mosquitos infectados com *P.vivax* e de mosquitos controle. Esta expressão foi normalizada pela expressão do controle endógeno RP49. *** $P < 0,001$, de acordo com o Teste t realizado.

6 DISCUSSÃO

6.1 Identificação dos mosquitos

A identificação molecular dos mosquitos permitiu a determinação da espécie do Complexo Albitarsis e também possibilitou a correção do erro cometido na identificação morfológica da espécie coletada em Rondônia.

De acordo com a chave de identificação de Consoli e Oliveira (1994)⁶, as espécies de *A. braziliensis* e *A. albitarsis* são separadas apenas pela presença ou ausência de tufos póstero-laterais no tergito abdominal II e pela coloração das escamas do tergito VIII (em *A. braziliensis* as escamas são brancas e em *A. albitarsis* são brancas e amareladas).

Visto que as características que distinguem estas duas espécies são extremamente sutis, é necessário que esta identificação seja realizada por um técnico experiente e a confirmação molecular deve ser realizada. Além disso, sabe-se que frequentemente durante a coleta e o transporte para o laboratório os mosquitos podem perder as escamas, o que torna a identificação ainda mais difícil. Assim, a identificação molecular é uma ferramenta muito importante para esclarecer as dúvidas da identificação morfológica.

O alinhamento das sequências de FBN9 obtidas dos anofelinos brasileiros nos permitiu observar alta identidade entre as sequências das espécies identificadas como *A. braziliensis* (Rondônia) e *A. albitarsis* (Amazonas), embora algumas diferenças pudessem ser notadas. Esta alta identidade entre FBN9 das duas espécies não era esperada, visto que as espécies *A. braziliensis* e *A. albitarsis* não estão filogeneticamente mais próximas entre si do que em relação às outras espécies²⁴. Este resultado nos indicou a necessidade da confirmação das espécies através da análise molecular. Assim, a utilização desta metodologia demonstrou que a espécie *A. braziliensis* teria sido erroneamente identificada e que se tratava de *A. marajoara*, uma espécie do Complexo Albitarsis. Podemos concluir que a utilização da identificação molecular foi imprescindível para a correta identificação de uma das espécies estudadas.

A identificação molecular também possibilitou a determinação da espécie do Complexo Albitarsis coletada no Amazonas como *A. marajoara*. Trata-se de um

importante resultado que concorda com a distribuição geográfica das espécies proposta em trabalhos anteriores^{20,22}.

6.2 Análise das sequências parciais dos genes

6.2.1 FBN9

A frequência de mutações na terceira base do codon é maior que as mutações na primeira e na segunda base, tanto na análise entre os anofelinos brasileiros quanto na análise em que foi adicionada a sequência de *A. gambiae*. Este predomínio de mutações na terceira base resulta em um maior número de substituições sinônimas, visto que esta posição está relacionada à maior redundância do código genético. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Pamakelis e colaboradores (2008)¹² ao analisar o gene FBN9 em 60 sequências obtidas a partir de 6 espécies do complexo *A. gambiae*. Pamakelis e colaboradores¹² observaram alta diversidade nucleotídica e grande número de substituições sinônimas em relação às substituições não-sinônimas. Além disto, este grupo também demonstrou que não ocorriam indícios de seleção positiva em FBN9¹², embora em *Drosophila*, haja evidências de que os receptores de reconhecimento de padrões se encontram sob pressão de seleção positiva⁷⁹.

Nossos resultados mostram que o número de substituições sinônimas é consideravelmente maior do que o número de substituições não-sinônimas, o que resulta em uma razão $dN/dS < 1$. Podemos inferir isso seja uma consequência da ação da seleção natural negativa ou purificadora, limitando as alterações na proteína sugerindo que esta região tenha importância na manutenção da função e/ou da estrutura da proteína. Ao comparar as razões dN/dS entre toda a região estudada, a região anterior ao domínio Fibrinogênio C e a região que faz parte deste domínio, não foram encontradas diferenças significativas, o que não nos permite afirmar que estas regiões estejam submetidas a diferentes graus de pressão seletiva.

Em *A. gambiae*, FBN9 foi descrito com importante função no sistema imune³⁹, atuando como receptor de reconhecimento de padrões. Essa alta conservação existente entre a proteína desta espécie e as proteínas dos anofelinos brasileiros, sugere que ambas possam desempenhar a mesma função. Este indício da conservação da função entre FBN9 de *A. gambiae* e FBN9 das espécies brasileiras é de fundamental relevância pois trata-se da primeira informação a respeito da resposta imune do anofelinos

brasileiros. Estudos da expressão de FBN9 em mosquitos infectados com *Plasmodium* e o silenciamento de FBN9 para observação do efeito na infecção de parasitas (*Plasmodium*, bactérias e fungos) são extremamente relevantes e devem ser conduzidos para uma melhor elucidação do papel de FBN9 na imunidade dos anofelinos brasileiros.

6.2.2 Tep1

As regiões sequenciadas obtidas a partir das PCRs com os iniciadores desenhados para Tep1 não nos permitiu definir com precisão de qual Tep se trata a identificada no nosso trabalho. A alta conservação entre Tep1 e Tep4, especialmente na região cuja sequência foi obtida nos anofelinos brasileiros, torna esta determinação complicada, além da utilização de apenas uma pequena parte da sequência para análise (9,05%). Tentativas foram realizadas para o desenho de iniciadores nas regiões de Tep1 que não apresentam correspondentes em Tep4, mas, no entanto, não encontramos em *A. aegypti* um ortólogo a Tep4 com as mesmas características. Dessa forma, não obtivemos uma sequência ortóloga de comparação para definir regiões conservadas específicas de cada uma destas proteínas.

Cohuet e colaboradores (2008)⁸⁰ analisaram os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) em 72 genes relacionados à resposta imune e 37 genes não relacionados à imunidade, em *A. gambiae* e *A. arabiensis*. Análise da diversidade nucleotídica ao longo dos cromossomos de *A. arabiensis* e de duas formas de *A. gambiae*, demonstraram que a região correspondente ao gene codificador de Tep1 apresentou a maior diversidade genética entre todos os genes analisados. Além disso, Obbard e colaboradores (2008)⁵² demonstraram que entre os diferentes alelos de Tep1 sequenciados, além da grande diversidade nucleotídica, observa-se alta diversidade no que se refere à sequência de aminoácidos. Este trabalho mostrou evidências de seleção positiva em Tep1, e sugere que Tep1 seria uma quimera de Tep5 e Tep6.

Todos estes fatores dificultaram a análise de Tep1, no entanto, reforçaram a extrema importância no estudo deste gene. Métodos para a amplificação da sequência completa de Tep1 devem ser buscados para que análises de polimorfismos sejam realizadas também entre as espécies brasileiras.

6.2.3 TepX

A sequência obtida de TepX em *A. aquasalis* demonstrou alto valor de identidade (81,91%) com a sequência de *A. gambiae*, além de um número mais elevado de substituições sinônimas em relação às substituições não sinônimas. Além disso, são observadas mais transversões do que transições. Esses resultados podem sugerir que TepX possua uma função ou estrutura importante, e que isto seja conservado entre *A. gambiae* e *A. aquasalis*. O sequenciamento de TepX em outras espécies de anofelinos brasileiros é importante e permitirá uma análise mais completa sobre a conservação deste gene.

6.3 Quantificação da expressão dos genes alvo

A quantificação de Tep1 demonstrou que Tep1 é 4,73 vezes mais expressa em carcaças infectadas com *P.vivax* do que nas carcaças controle. Isto indica que Tep1 pode estar envolvida também na resposta imune dos vetores brasileiros ao *Plasmodium* e trata-se da primeira informação obtida a respeito de genes de imunidade que respondem ao *P. vivax*. O corpo gorduroso é um órgão importante na resposta imune dos mosquitos, pois além de apresentarem grande quantidade de hemócitos, são responsáveis pela síntese de peptídeos anti-microbianos. Quando os mosquitos são dissecados em intestino e carcaça, o corpo gorduroso faz parte da carcaça, desta forma, é provável que o corpo gorduroso seja responsável pelo aumento da expressão de Tep1, que é secretada por hemócitos, na carcaça³⁴. A quantificação da expressão de Tep1 nos intestinos não foi possível neste estudo, porém deverá ser buscada em estudos posteriores.

TepX demonstrou um resultado surpreendente, pois apesar de não apresentar diferença estatística em sua expressão em carcaças de mosquitos infectados e carcaças controle, foi observado que em intestinos infectados TepX é 6,512 vezes mais expressa em relação a intestinos controles. No entanto, ainda não existem estudos sobre esta proteína em *A. gambiae* e trata-se de um gene promissor para futuras pesquisas.

Há ainda grande importância na determinação da expressão de FBN9, e novos iniciadores devem ser desenhados para que seu envolvimento com a resposta imune seja comprovado.

6.4 Filogenia de FBN9

Entre os seis subgêneros incluídos no gênero *Anopheles*, *Kerteszia*, *Lophopodomyia*, *Nyssorhynchus* e *Stheomyia* são encontrados somente na América do Sul ¹¹. O subgênero *Cellia* é encontrado somente no Velho Mundo e o subgênero *Anopheles* é cosmopolita ¹¹. Os vetores brasileiros dos parasitas da malária pertencem principalmente ao subgênero *Nyssorhynchus*, embora algumas espécies estejam incluídas em *Kerteszia*. As espécies estudadas neste trabalho (*A. aquasalis*, *A. darlingi*, *A. albicans* e *A. nuneztovari*) fazem parte do subgênero *Nyssorhynchus*. Já *A. gambiae* pertence ao subgênero *Cellia* ¹¹. A biogeografia destes subgêneros está relacionada à filogenia, e estudos morfológicos e moleculares utilizando rDNA, mtDNA e genes nucleares de cópia única sugerem que Anophelinae possua origem monofilética, assim como os subgêneros *Cellia* + *Anopheles*, e *Nyssorhynchus* + *Kerteszia* são considerados táxons irmãos ^{11,81}. Estudos indicam que a família Anophelinae teve origem no Novo Mundo, que a primeira irradiação do subgênero *Anopheles* teria ocorrido anteriormente à perda da conexão entre África e América do Sul, há aproximadamente 95 milhões de anos, e como *Cellia* está ausente no Novo Mundo, acredita-se que a irradiação deste subgênero tenha sido desencadeada após o Eoceno posterior ¹¹.

O estudo filogenético de genes abordando espécies dos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Cellia*, se torna interessante visto que estes dois subgêneros, apesar de possuírem biogeografias distintas, são parte de um grupo monofilético.

A análise bayesiana das sequências parciais do gene FBN9 sugere fortemente dois grupos ou clados distintos, um formado pelos anofelinos brasileiros e outro pelos anofelinos africanos. As relações entre as sequências dos anofelinos brasileiros foi muito bem resolvida. Apesar das sequências dos anofelinos africanos representarem o mesmo complexo de espécies, a relação entre elas não foi totalmente resolvida (Figura 9).

As relações evidenciadas em nossa análise bayesiana é comparável às propostas por Parmakelis e colaboradores (2008)¹². Nesse trabalho, os autores também realizaram uma análise bayesiana para comparar 60 sequências do gene FBN9 das 6 espécies do complexo *A. gambiae*. As análises de MCMC foram realizadas em quatro cadeias (1 *cold* e 3 *heated chains*) por 3.000.000 gerações, e foi adotado o modelo GTR+gamma (Comunicação pessoal). Além do número de gerações (1.500.000 versus 3.000.000), o

que diferencia nossa análise da realizada nesse artigo é o fato do nosso modelo considerar os sítios invariantes (GTR+inv+gamma versus GTR+gamma).

O conjunto de dados analisados por Parkamelis e colaboradores (2008)¹² inclui alelos do gene FBN9, além de múltiplos isolados das espécies selecionadas. Como em nossos resultados, nas análises realizadas por Parkamelis e colaboradores (2008)¹², as diferentes sequências de *A. melas* foram agrupadas (pp=0.99) assim como as de *A. merus* e *A. quadriannulatus* (pp=1). Os isolados de *A. gambiae* e *A. arabiensis* formam vários clados ao longo da árvore sugerindo que sua origem não seja monofilética¹². A topologia da árvore obtida pela análise bayesiana de sequências parciais do gene FBN9 do nosso trabalho (Figura 9) concorda com outra árvore gerada para as espécies de anofelinos brasileiros publicada na literatura²⁴. Nesse artigo, os autores propõem uma árvore filogenética para as 16 espécies de anofelinos brasileiros, vetores de malária na Amazônia, baseando-se no método de *Neighbour-joining* e usando-se as sequências de ITS2. Nossos dados são congruentes com os de resultados de Marrelli e colaboradores (2005)²⁴, especialmente com relação ao clado formado por *A. aquasalis* e *A. nuneztovari*.

Um estudo mais aprofundado e informações conclusivas sobre a congruência entre as árvores dos distintos genes deve ser realizado utilizando-se sequências de FBN9 de todas as 16 espécies utilizadas no estudo de ITS2, além de abordar a mesma metodologia para as duas análises.

Apesar desta aparente concordância entre as relações apresentadas na árvore de FBN9 das espécies brasileiras e a árvore filogenética destas espécies, o mesmo não se observa para as espécies do complexo *A. gambiae*, visto que a topologia encontrada na árvore de FBN9 não se reproduz na árvore proposta para a filogenia das espécies deste complexo descrita por Besansky e colaboradores (1994)⁸² propõem uma árvore filogenética para algumas espécies do complexo *A. gambiae* baseando-se nos dados de DNA mitocondrial e ITS, e utilizando o método de máxima parsimônia. Nesta árvore, *A. gambiae* e *A. arabiensis* formam um grupo único bem apoiado estatisticamente e separado das demais espécies. Isso não é observado na árvore de FBN9 publicada por Parkamelis e colaboradores (2008)¹², na qual os isolados de *A. gambiae* e *A. arabiensis* encontram-se distribuídos em vários grupos da árvore como mencionado anteriormente. Além disso, na árvore de FBN9, *A. merus* e *A. quadriannulatus* formam um grupo único, que não é corroborado pela árvore de espécies descrita por Besansky e colaboradores (1994)⁸².

Essa diferença entre árvore de espécies e árvore de genes ocorre frequentemente e tem sido amplamente discutida na literatura ^{83,84}. Uma possibilidade de se contornar este problema é obtendo-se uma árvore de reconciliação ^{85,86}.

Análises futuras, utilizando toda a sequência de FBN9 dos anofelinos brasileiros devem ser realizadas para confirmação dos resultados e complementação das informações sobre as relações desta proteína entre as diferentes espécies. No entanto, os resultados encontrados em nossas análises, no que se refere aos anofelinos do complexo *A. gambiae*, nas quais utilizamos apenas um fragmento de FBN9, não apresentaram grandes diferenças com a topologia da árvore gerada por Parmakelis e colaboradores (2008) ¹², usando-se a sequência completa do gene. Isso indica que os resultados que encontramos possuem informações importantes e provavelmente refletem a mesma topologia da árvore gerada com toda a sequência, embora esta análise ainda seja extremamente necessária em estudos posteriores.

A realização deste trabalho indica interessantes relações entre FBN9 de diferentes espécies e requer análises futuras para confirmação e adição de informações aos resultados já obtidos. Seria importante, por exemplo, repetir as análises utilizando a sequência completa do gene FBN9 e ainda, utilizar mais espécies de vetores brasileiros de malária, com vários isolados de cada espécie. Outra possibilidade seria testar diversos outros parâmetros e modelos para as análises filogenéticas e comparar as diversas topologias geradas.

A resposta imune é formada pelo conjunto de diversos genes, que se relacionam a diferentes processos relacionados à imunidade. Visto que na literatura, estudos sobre a resposta imune nos anofelinos brasileiros são inexistentes, dados sobre FBN9, como sua estrutura, conservação e filogenia, fornecem informações valiosas que impulsionam o aprofundamento do estudo desta proteína, bem como de outros genes descritos em espécies do Velho Mundo.

Em conjunto, a realização destas etapas poderia contribuir enormemente para a melhor compreensão da evolução do gene FBN9 em anofelinos e ampliar o conhecimento da resposta imune em vetores brasileiros de malária.

7 CONCLUSÕES

- As sequências parciais de FBN9 foram obtidas em *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. darlingi* e em *A. nuneztovari*.
- As sequências de FBN9 obtidas demonstram alto grau de conservação entre as proteínas das diferentes espécies.
- A razão dN/dS das sequências parciais de FBN9 sugerem que presença de seleção natural negativa, o que indica que esta proteína possa ter importante função e/ou estrutura.
- A árvore filogenética de FBN9 realizada com as sequências obtidas e sequências de FBN9 das espécies do complexo *A. gambiae* obtidas nos bancos de dados demonstram que os anofelinos brasileiros e os anofelinos africanos formam dois grupos distintos e bem apoiados estatisticamente.
- A expressão de Tep1 se mostrou maior em carcaças de mosquitos infectados com *P. vivax* em relação à mosquitos não infectados, o que sugere um papel na resposta imune contra esta infecção.
- A expressão de TepX não foi alterada nas carcaças de mosquitos infectados, no entanto, nos intestinos destes mosquitos, TepX teve a expressão induzida.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Cox-Singh J, Singh B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol.* 2008; 24 (9): 406-410.
2. WHO. World Malaria Report 2008.
3. Silveira AC, Rezende D F. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil. Organização Pan-Americana de Saúde; 2001.
4. WHO. World Malaria Report 2005.
5. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica do Brasil 2008.
6. Consoli RAGB, Oliveira RL. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. FIOCRUZ; 1994.
7. Marquardt WC, editor. *Biology of Disease Vectors*. 2ª Edição. Elsevier Academic Press; 2004.
8. Rocha JAM, Oliveira SB, Póvoa MM, Moreira LA, Krettli AU. Malaria Vectors in Areas of *Plasmodium falciparum* Epidemic Transmission in the Amazon Region, Brazil. *Rev. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008; 78 (6): 872-877.
9. Scarpassa VM, Tadei WP, Suarez MF. Population structure and genetic divergence in *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60 (6):1010-1018.
10. Herrera S, Suarez MF, Sanchez GI, Quinones ML, de Herrera M. Uso de La técnica radioinmunoensayo IRMA em *Anopheles* de Colombia para La detección de esporozoitos de *Plasmodium*. *Colombia Medica* 18: 2-6.
11. Krywinski J, Besansky NJ. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Annu. Rev. Entomol.* 2003; 48: 111-139.
12. Parmakelis A, Slotman MA, Marshall JC, Awono-Ambene PH, Antonio-Nkondjio C, Simard F, Caccone A, et al. The molecular evolution of four anti-malarial immune genes in the *Anopheles gambiae* species complex. *BMC Evolutionary Biology* 2008; 8: 79-93.
13. Tadei WP, Thatcher BD. Malaria Vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the Subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev. Inst. Med trop. S. Paulo* 2000 Mar-Apr; 42 (2): 87-94.

14. Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 59 (2): 325-335.
15. Zimmerman RH. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1992; 87 (3): 371-383.
16. Deane L. Malaria Vectors in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1986; 81: 5-14.
17. Berti J, Zimmerman R, Amarista J. Adult abundance, biting behavior and parity of *Anopheles aquasalis*, Curry 1932 in two malarious áreas os Sucre State, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1993; 88 (3): 363-369.
18. Silva ANM, Santos CCB, Lacerda RNL, Santa Rosa EP, Souza RTL, Galiza D, ET AL. Laboratory colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belém, Pará, Brazil. *J. Med. Entomol.* 2006; 43 (1): 107-109.
19. Mirabello L, Conn JE. Population analysis using the nuclear white gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. *Med. Vet. Entomol.* 2008; 22 (2): 109-119.
20. Wilkerson RC, Gaffigan TV, Lima JB. Identification of Species Related *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1995 Nov-Dec; 90 (6): 721-732.
21. Li C, Wilkerson RC. Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2005 Aug; 100 (5): 495-500.
22. Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn, JE. Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: Incongruence between Randon Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. *Ann. Entomol. Soc. Am* 2005; 98 (6): 908-917.
23. Li C, Wilkerson RC. Intragenomic rDNA ITS2 Variation in the Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Complex (Diptera: Culicidae). *Journal of Heredity* 2007; 98 (1): 51-59.
24. Marrelli MT, Floeter-Winter LM, Malafrente RS, Tadei WP, Lourenço-de-Oliveira R, Flores-Mendoza C, et al. Amazonian malaria vector anopheline

- relationships interpreted from ITS2 rDNA sequence. *Medical and Veterinary Entomology* 2005; 19: 208-218.
25. Brochero HHL, Li C, Wilkerson RC. A Newly Recognized species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreño, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 76 (6): 1113-1117.
 26. Su X, Hayton K, Wellems T. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Mem Nature Review Genetics* 2007 Jul; 8: 497-506.
 27. Chen Y, Weng Z-H, Zheng L. Innate immunity against malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Insect Science.* 2008; 15: 45-52.
 28. Brennan JD, Kent M, Dhar R, Fujioka H, Kumar N. *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97 (25): 13859-13864.
 29. Collins FH, Sakai RK, Vernick KD, Paskewitz S, Seeley DC, Miller LH, et al. Genetic selection of a *Plasmodium* refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* 1986; 234: 607-610.
 30. Blandin S, Levashina E. Mosquito immune responses against malaria parasites. *Current Opinion in Immunology* 2004; 16: 16-20.
 31. Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Languaux M, Kafatos FC. Conserved role of complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 2001; 104: 709-718.
 32. Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science* 2004; 303: 2030-2032.
 33. Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002; 298: 159-165.
 34. Levashina EA. Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2004; 34: 673-678.
 35. Hillyer JF, Christensen BM. Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005; 53 (6): 689-698.
 36. Michel K, Kafatos FC. Mosquito immunity against *Plasmodium*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2005; 35: 677-689.

37. Dimopoulos G, Müller H-M, Levashina E, Kafatos FC. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Current Opinion in Immunology* 2001; 13:79-88.
38. Osta MA, Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Innate immunity vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *The Journal of Experimental Biology* 2004; 207: 2551-2563.
39. Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *Plos pathogens* 2006; 2 (6): 513-525.
40. Danielli A, Kafatos FC, Loukeris TG. Cloning and characterization of four *Anopheles gambiae* serpin isoforms, differentially induced in the midgut by *Plasmodium berghei* invasion. *The journal of biological chemistry* 2003; 278 (6): 4184-4193.
41. Michel K, Suwanchaichinda C, Morlais I, Lambrechts L, Cohuet A, Awono-Ambene PH, et al. Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103 (45): 16858-16863.
42. Abraham EG, Pinto SB, Ghosh A, Vanlandingham DL, Budd A, Higgs S, et al. An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102 (45): 16327-16332.
43. Gregório E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response em *Drosophila*. *EMBO J* 2002; 21(11): 2568-2579.
44. Hoffmann JA, Reichhart J-M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology* 2002; 3 (2): 121-126.
45. Barillas-Mury C, Han YS, Seeley D, Kafatos FC. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J* 1999; 18 : 959-967.
46. Vizioli J, Bulet P, Hoffmann JA, Kafatos FC, Muller H-M, Dimopoulos GG. A novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98 (22): 12630-12635.
47. Blandin S, Levashina EA. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Molecular Immunology* 2004; 40: 903-908.

48. Moita LF, Wang-Sattler R, Michel K, Zimmermann T, Blandin S, Levashina EA, Kafatos FC. In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. *Immunity* 2005; 23: 65-73.
49. Stroschein-Stevenson SL, Foley E, Farrell PH, Johnson AD. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol* 4 2006; 87-99.
50. Zhang H, Song L, Li C, Zhao J, Wang H, Gao Q, et al. Molecular cloning and characterization of a thioester-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molecular Immunology* 2007; 44: 3492-3500.
51. Blandin S, Shiao S-H, Moita L F, Janse C J, Waters AP, Kafatos FC, Levashina EA. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* 116: 661-670, 2004.
52. Obbard DJ, Callister DM, Jiggins FM, Soares DC, Yan G, Little TJ. The evolution of TEP I, an exceptionally polymorphic immunity gene in *Anopheles gambiae*. *BMC Evolutionary Biology* 2008; 8: 274-284.
53. Shahabuddin M, Kaidh T, Aikawa M, Kaslow DC. *Plasmodium gallinaceum*: mosquito peritrophic matrix and the parasite-vector compatibility. *Experimental Parasitology* 1995; 81: 386-393.
54. Barillas-Mury C, Wikel B, Han YS. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2000; 30: 424-442.
55. Beaty BJ, Marquardt WC, editores. *Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado; 1996.
56. Porter CH, Collins FH. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 45: 271-279.
57. Technical Manual pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems. Promega. Revised 5/07.
58. Van Die IM, Bergmans HE, Hoekstra WP. Transformation in *Escherichia coli*: studies on the role of the heat shock in induction of competence. *J. Gen. Microbiol.* 1983; 129(3): 663-670.

59. Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research* 1998; 8: 175-185.
60. Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 1998; 8: 195-202.
61. <http://www.ensembl.org>
62. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 2000; 16: 944-945.
63. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(22): 4673-4680.
64. <http://www.kazusa.or.jp/codon>
65. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. *MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0* *Molecular Biology and Evolution* 2007; 24: 1596-1599.
66. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 1986; 3(5): 418-426.
67. Jukes TH, Cantor CR. *Evolution of protein molecules. Mammalian protein metabolism.* Academic Press, New York, 1969.
68. Gentile C, Lima JB, Peixoto AA. Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2005; 100(6): 545-547.
69. Rychlik W, Rhoads RE. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17: 8543-8551.
70. ABI PRISM 7000 sequence detection System – User guide. Applied Biosystems, 2003.
71. Guide to performing relative quantification of gene expression using real-time quantitative PCR. Applied Biosystems, 2008.

72. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids, Symp. Ser 1999; 41: 95-98.
73. Maddison DR, Swofford DL, Maddison WP. Nexus: an extensible file format for systematic information. Syst Biol 1997 Dec; 46(4): 590-621.
74. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997; 25(24): 4876-4882.
75. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. 2001; 17(8): 754-755.
76. <http://mrbayes.csit.fsu.edu/wiki>
77. Blast Guide. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/guide.html>
78. Zhang H, Song L, Li C, Zhao J, Wang H, Gao Q, et al. Molecular cloning and characterization of a thioester-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Molecular Immunology 2007; 44: 3492-3500.
79. Sackton TB, Lazzaro BP, Schlenke TA, Evans JD, Hultmark D, Clark AG. Dynamic evolution of the innate immune system in *Drosophila*. Nature Genetics 2007; 39(12): 1461-1468.
80. Cohuet A, Krishnakumar S, Simard F, Morlais I, Koustos A, Fontenille D, et al. SNP discovery and molecular evolution in *Anopheles gambiae*, with special emphasis on innate immune system. BMC Evolutionary Biology 2008; 9: 227.
81. Krywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ. Toward Understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: Insights from nuclear single-copy genes and the weight of evidence. Syst. Biol. 2001; 50(4): 540-556.
82. Besansky NJ, Powell JR, Caccone A, Hamm DM, Scott JA, Collins FH. Molecular Phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994 Jul; 91: 6885-6888.
83. Rosenberg NA. The Probability of Topological Concordance of Gene Trees and Species Trees. Theoretical Population Biology 2002; 61: 225-247.

84. Arvestad L, Berglund AN, Lagergren J, Sennblad B. Bayesian gene/species tree reconciliation and orthology analysis using MCMC. *Bioinformatics* 2003; 19(1): 7-15.