



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



IÊDA FERREIRA DE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES QUE CODIFICAM
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE *Aedes aegypti* EM
RESPOSTA À INFECCÃO POR *Wuchereria bancrofti***

RECIFE
2008

Iêda Ferreira de Oliveira

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES QUE CODIFICAM
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE *Aedes aegypti* EM RESPOSTA
À INFECÇÃO POR *Wuchereria bancrofti***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres
Dra. Tereza Magalhães

RECIFE
2008

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

O48e Oliveira, Iêda Ferreira de.

Expressão diferencial de genes que codificam peptídeos antimicrobianos de *aedes aegypti* em resposta à infecção por *wuchereria bancrofti*/ Iêda Ferreira de Oliveira. — Recife: I. F. Oliveira, 2008.

114 f.: il.

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

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres, Coorientadora: Dra. Tereza Magalhães.

1. Aedes - Imunologia. 2. Culex. 3. Wuchereria bancrofti. 4. Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos. 5. Transferrina. 6. Transcrição Genética. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Magalhães, Tereza. III. Título.

CDU 595.7

Iêda Ferreira de Oliveira

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES QUE CODIFICAM
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE *Aedes aegypti* EM RESPOSTA
À INFEÇÃO POR *Wuchereria bancrofti***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 24/03/2008

BANCA EXAMINADORA

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Tereza Magalhães
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dedico este trabalho a Deus e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

A Tomé (Mô) pelo amor, apoio e compreensão que sempre demonstrou nesses dois anos e em tantos outros.

Aos meus familiares e amigos, especialmente Jacileide, Gérson, D. Elma, Sr. Marco, Iara, Elsa, Karlos Diogo, Cibele e Sárah pela cumplicidade e pelo carinho.

À minha orientadora Constância, por seu companheirismo, palavras de ânimo e paciência. Por todo o empenho e aprendizado, mesmo que agora, um pouco distante.

À minha co-orientadora “Teca”, meu agradecimento especial. A sua presença, em grande parte, tornou possível não só a execução e conclusão deste trabalho, mas contribuiu para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

À Maria Alice e Cláudia, pelo apoio e entusiasmo, principalmente nos momentos ao lado do microscópio, durante as longas dissecções.

À Dra. Cássia Docena do NPT/CPqAM pela sua contribuição na etapa do sequenciamento de genes realizada neste estudo.

Aos demais pesquisadores e colegas do Departamento de Entomologia, pela amizade e companheirismo.

À equipe do insetário do CPqAM, pela obtenção e manutenção das colônias de mosquitos.

Aos pesquisadores Dr. Luís Alves e Dr. Fábio Brayner e ao técnico Sérgio, pela assistência prestada na ocasião das coletas de amostras sanguíneas e alimentação dos mosquitos.

A Gilvan M. da Silva, pelo trabalho gráfico com as fotografias.

Ao CPqAM, pela infra-estrutura. À CAPES e ao CNPq/PAPES IV pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca, por aceitar o convite.

A todos os que contribuíram, de uma forma ou de outra, para viabilização e finalização deste trabalho.

“O segredo de ir em frente é começar.”

(Sally Berger)

OLIVEIRA, Iêda Ferreira. **Expressão diferencial de genes que codificam peptídeos antimicrobianos de *Aedes aegypti* em resposta à infecção por *Wuchereria bancrofti***. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

RESUMO

No Brasil, a filariose linfática causada por *Wuchereria bancrofti* ainda é um grave problema de saúde pública. O mosquito *Culex quinquefasciatus* é o principal vetor nas áreas onde este nematódeo tem periodicidade noturna, enquanto *Aedes aegypti* é uma espécie naturalmente refratária. Os mecanismos responsáveis pela refratariedade a *W. bancrofti* nesta espécie de mosquito são desconhecidos. Desse modo, estudos sobre a resposta imune de *Ae. aegypti* à *W. bancrofti* são importantes para compreender os mecanismos que limitam o desenvolvimento deste patógeno nesta espécie de mosquito. O objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de expressão temporal dos genes defensina, cecropina e transferrina de *Ae. aegypti* infectados artificialmente com *W. bancrofti*, assim como observar o desenvolvimento do filarídeo neste mosquito comparado com *Cx. quinquefasciatus*. Fêmeas de *Ae. aegypti* Rec Lab e *Cx. quinquefasciatus* CqSF foram alimentadas artificialmente com amostras de sangue venoso de voluntários infectados e não infectados com *W. bancrofti*. Após o repasto sanguíneo, foi extraído o RNA total de *pools Ae. aegypti* - tanto do grupo controle, quanto do grupo infectado, coletados nos seguintes tempos: 2h, 24h, 48h, 72h e 7 dias. Os RNAs foram submetidos a reações de RT-PCR em tempo real com *primers* específicos para os genes da defensina, cecropina, transferrina e rpL8 (controle endógeno), separadamente e em duplicata. A expressão relativa destes genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Nas observações microscópicas, a cabeça, tórax e abdômen de mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foram dissecados durante os 15 dias pós-infecção, a fim de avaliar a migração, o desenvolvimento e o movimento dos parasitas. Os resultados mostraram que a transcrição da defensina, cecropina e transferrina aumentou em *Ae. aegypti* logo após a infecção com *W. bancrofti*, apresentou picos às 2h (cecropina) ou 24h (defensina e transferrina), e diminuiu a partir de 48h. Os picos de transcritos imunes coincidiram com o período de migração da microfilária para o tórax de *Ae. aegypti*, que ocorreu nas primeiras 24h. Após a migração, vermes filarídeos diferenciaram-se em larvas de primeiro estágio salsichóide, mas interromperam o desenvolvimento a partir desse momento, diferentemente de *Cx. quinquefasciatus*, cujo desenvolvimento de *W. bancrofti* foi normal. É possível que defensina, cecropina e transferrina estejam envolvidas na resposta imune de *Ae. aegypti* à infecção por *W. bancrofti*.

Palavras-chave: *Aedes* – Imunologia. *Culex*. *Wuchereria bancrofti*. Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos. Transferrina. Transcrição Genética.

OLIVEIRA, Iêda Ferreira. **Differential expression of antimicrobial peptides genes of *Aedes aegypti* in response to *Wuchereria bancrofti* infection.** 2008. Dissertation (Master of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

ABSTRACT

In Brazil, lymphatic filariasis is caused by *Wuchereria bancrofti* and is still a serious Public Health problem. The mosquito *Culex quinquefasciatus* is the main vector in areas where this nematode has nocturnal periodicity, while *Aedes aegypti* is a naturally refractory species. The mechanisms responsible for refractoriness of this mosquito to *W. bancrofti* are unknown. Thus, studies of the immune response of *Ae. aegypti* to *W. bancrofti* is crucial to understand the mechanisms that limit the development of this pathogen in this mosquito. This work aimed to assess the temporal expression pattern of defensin, cecropin and transferrin genes in *Ae. aegypti* artificially infected with *W. bancrofti*, as well as to observe the filarial development in the mosquito compared to *Cx. quinquefasciatus*. *Ae. aegypti* Rec Lab and *Cx. quinquefasciatus* CqSF females were artificially fed with samples of venous blood from volunteers infected and non-infected with *W. bancrofti*. After a bloodmeal, total RNA was extracted from pools of *Ae. aegypti* from both control and infected groups that were collected at the following time points: 2h, 24h, 48h, 72h, 7 days. The RNAs were subjected to Real Time RT-PCR reactions using specific primers for defensin, cecropin, transferrin, and rpL8 (endogenous control) genes, separately, and in duplicates. The relative expression of these genes was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. As for microscopy observation, the head, thorax, and abdomen of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes were dissected during 15 days following the infected bloodmeal, to assess migration, development, and movement of parasites. Results showed that transcription of defensin, cecropin, and transferrin was up-regulated in *W. bancrofti*-infected *Ae. aegypti* soon after infection, peaking at 2h (cecropin) or 24h (defensin and transferrin), and starting decreasing at 48h. The peak of immune transcripts coincided with migration of microfilariae to *Ae. aegypti* thorax, which occurred at the first 24h. After migration, a few filarial worms in *Ae. aegypti* may differentiated into the sausage-shaped first larval stage but stopped developing after that, differently than in *Cx. quinquefasciatus*, where *W. bancrofti* development was normal. It is possible that defensin, cecropin and transferrin are involved in the immune response of *Ae. aegypti* to infection by *W. bancrofti*.

Key words: *Aedes* – Immunology. *Culex*. *Wuchereria bancrofti*. Antimicrobial Cationic Peptides. Transferrin. Transcription, Genetic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Pacientes acometidos por filariose linfática, apresentando elefantíase (A) e hidrocele (B).	18
Figura 2 –	Ciclo de vida de <i>Wuchereria bancrofti</i> .	21
Figura 3 –	<i>Culex quinquefasciatus</i> (A) e <i>Aedes aegypti</i> (B).	23
Figura 4 –	Alinhamento das seqüências de aminoácidos da região madura de defensas de <i>Aedes aegypti</i> (<i>defA</i> , <i>defB</i> e <i>defC</i>) e <i>Ae. albopictus</i> (<i>defD</i>), deduzidas a partir das suas respectivas seqüências de DNAc.	32
Figura 5 –	Visualização do esquema de alimentação artificial das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> com sangue humano e membrana suína	44
Figura 6 –	Desenvolvimento de <i>Wuchereria bancrofti</i> em <i>Culex quinquefasciatus</i> .	56
Figura 7 –	Desenvolvimento de <i>Wuchereria bancrofti</i> em <i>Aedes aegypti</i> .	57
Figura 8 –	Melanização de <i>Wuchereria bancrofti</i> em <i>Aedes aegypti</i> .	58
Figura 9 –	Gel de agarose 1,5%, mostrando a presença de DNA de <i>Wuchereria bancrofti</i> em <i>Aedes aegypti</i> 24h pós-infecção (infecção 100%).	59
Figura 10 –	Gel de agarose 1,5%, mostrando a presença de DNA de <i>Wuchereria bancrofti</i> em <i>Aedes aegypti</i> 24h pós-infecção (infecção 60%).	59
Figura 11 –	Gel de agarose 2,0%, mostrando os fragmentos produzidos por RT-PCR com os <i>primers</i> para <i>rpL8</i> (1), defensiva (2), cecropina (3) e transferrina (4).	60
Gráfico 1 –	Validação do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$.	62
Gráfico 2 –	Expressão relativa dos genes defensiva, cecropina e transferrina ao longo do tempo, em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> infectadas, quando comparadas a fêmeas não infectadas com <i>Wuchereria bancrofti</i> , após infecção 60% e 100%.	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Distribuição de larvas de *Wuchereria bancrofti* (com ou sem movimento) na cabeça, tórax e abdômen de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* ao longo de 10 dias pós-alimentação em sangue infectado (Parasitemia = 300 mf/ml). Observações de tecido fresco em microscopia óptica. 54
- Tabela 2 – Distribuição de larvas de *Wuchereria bancrofti* (com ou sem movimento) na cabeça, tórax e abdômen de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* ao longo de 15 dias pós-alimentação em sangue infectado (Parasitemia = 700 mf/ml). Observações de tecido fresco em microscopia óptica. 54
- Tabela 3 – Porcentagem de mosquitos infectados com *Wuchereria bancrofti* segundo o estágio do desenvolvimento, ao curso de 10 dias pós-infecção. Parasitemia = 300 mf/ml. 55
- Tabela 4 – Porcentagem de mosquitos infectados com *Wuchereria bancrofti* segundo o estágio do desenvolvimento, ao curso de 15 dias pós-infecção. Parasitemia = 700 mf/ml. 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Ae.</i>	Gênero <i>Aedes</i>
Amp	Ampicilina
<i>An.</i>	Gênero <i>Anopheles</i>
<i>B.</i>	Gênero <i>Brugia</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
<i>cec</i>	Gene cecropina
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
C _T	Cycle threshold
<i>Cx.</i>	Gênero <i>Culex</i>
d	Dia
Da	Dalton
DEC	Dietilcarbamazina
<i>def</i>	Gene defensina
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
DOPA	3,4-di-hidroxifenilalanina
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid
EST	Expressed Sequence Tag
Fe ⁺³	Íon ferro na forma oxidada
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>f^m</i>	Gene envolvido na susceptibilidade de <i>Ae. aegypti</i> a alguns filarídeos
<i>Fw</i>	<i>Primer forward</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPELF	Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis
h	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
IgG ₄	Imunoglobulina G4
Imd	Via da Imunodeficiência
KCl	Cloreto de Potássio
kg	Quilograma

LB	Meio de cultura Luria Bertani
L1	Larva de filarídeo de 1º estágio larval
L2	Larva de filarídeo de 2º estágio larval
L3	Larva de filarídeo de 3º estágio larval
M	Molar
mf	Microfilária
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
pb	Pares de Base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPO	Pró-fenoloxidase
PRRs	Pattern Recognition Receptors
QA	Quantificação Absoluta
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QR	Quantificação Relativa
QTL	Quantitative Trait <i>loci</i>
RNA	Ribonucleic Acid
<i>rpL8</i>	Ribosomal Protein L8
RPM	Rotações por minuto
RT	Reverse Transcription
<i>Rv</i>	<i>Primer</i> reverse
TBE	Tris Borato Ethylene Diamine Tetracetic Acid
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris – Ethylene Diamine Tetracetic Acid
<i>transf</i>	Transferrina
U	Unidade enzimática
<i>W.</i>	Gênero <i>Wuchereria</i>
µm	Micrômetro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Filariose Linfática	17
2.1.1 Epidemiologia, Sintomas Clínicos e Diagnóstico	17
2.1.2 Tratamento, Prevenção e Controle	19
2.1.3 <i>Wuchereria bancrofti</i> Cobbold, 1877	20
2.1.4 Principais vetores de <i>Wuchereria bancrofti</i>	22
2.2 Imunidade em insetos	24
2.2.1 Órgãos e tecidos do sistema imune de insetos	24
2.2.2 O reconhecimento do corpo estranho (<i>nonself</i>)	26
2.2.3 Respostas Celulares e Respostas Humorais	28
2.2.4 Peptídeos antimicrobianos	30
2.2.4.1 <u>Defensinas</u>	30
2.2.4.2 <u>Cecropinas</u>	32
2.2.4.3 <u>Transferrinas</u>	33
2.2.5 Base genética da competência vetorial de <i>Aedes aegypti</i> a filarídeos	34
2.3 RT-PCR quantitativa para detectar expressão diferencial	35
2.3.1 Quantificação Absoluta e Quantificação Relativa	36
2.3.2 O Método Comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$	37
3 JUSTIFICATIVA	39
4 PERGUNTA CONDUTORA	40
5 HIPÓTESE	41
6 OBJETIVOS	42
6.1 Objetivo Geral	42
6.2 Objetivos Específicos	42

7 MATERIAIS E MÉTODOS	43
7.1 Manutenção das colônias de mosquitos	43
7.2 Infecção via alimentação sanguínea artificial	43
7.3 Microscopia óptica	45
7.4 Extração de DNA total	46
7.5 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detecção de <i>Wuchereria bancrofti</i>	47
7.6 Extração de RNA total	48
7.7 Desenho dos <i>primers</i> para defensina, cecropina e transferrina de <i>Aedes aegypti</i>	48
7.8 Reações RT-PCR (Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase)	49
7.9 Clonagem e reação de seqüenciamento	50
7.10 Reações de RT-PCR em Tempo Real e Análise da Expressão Relativa	50
7.11 Considerações Éticas	51
8 RESULTADOS	53
8.1 Desenvolvimento de <i>Wuchereria bancrofti</i> em <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Aedes aegypti</i>	53
8.2 Diagnóstico molecular da infecção de <i>Aedes aegypti</i> com <i>Wuchereria bancrofti</i>	58
8.3 Determinação da especificidade dos transcritos	60
8.4 Análise da expressão gênica da defensina, cecropina e transferrina	60
8.4.1 Análise da eficiência das amplificações	60
8.4.2 Análise temporal da expressão gênica	61
9 DISCUSSÃO	64
10 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE	86
Apêndice A – Artigo submetido à revista “Parasitology”	87

ANEXOS	108
Anexo A – Modelo do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), referente aos indivíduos que possuem o verme da filária no sangue.	109
Anexo B – Modelo do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), referente aos indivíduos que não possuem o verme da filária no sangue.	111
Anexo C – Parecer do CEP/CPqAM.	113
Anexo D – Carta de anuência da Dra. Constância Ayres.	114

1 INTRODUÇÃO

Os insetos estão expostos a uma variedade de microorganismos infecciosos em seus habitats durante seus ciclos de vida e, além disso, algumas espécies se alimentam de sangue humano ou animal, que ocasionalmente podem conter patógenos e/ou parasitas. Além das barreiras físicas, como o exoesqueleto quitinoso e o endotélio, os insetos possuem um sistema de defesa que, após o reconhecimento do corpo estranho (ou da infecção), é prontamente ativado. Conseqüentemente, a capacidade de reconhecimento e eliminação desses microorganismos por insetos é um aspecto crítico na transmissão de doenças por vetores biológicos.

Os mosquitos possuem um complexo sistema imune inato contra patógenos, que compreendem inúmeros componentes celulares e humorais. Apesar de haver redundância em seus mecanismos imunológicos contra diferentes invasores, eles usualmente utilizam respostas específicas para cada tipo de microorganismo.

A filariose linfática é um grave problema de saúde pública em vários países, atingindo cerca de 120 milhões de pessoas no mundo. Nas Américas, o mosquito *Culex quinquefasciatus* é o principal vetor onde *Wuchereria bancrofti*, o agente etiológico da doença, tem periodicidade noturna. Outras espécies de culicídeos também podem desempenhar o papel de hospedeiro intermediário desse filarídeo, enquanto várias outras espécies são completamente refratárias, como *Aedes aegypti*, vetor da febre amarela e dengue.

Uma vez ingerida pelo vetor, a microfilária de *W. bancrofti* migra para seu músculo torácico e desenvolve-se nos estádios subseqüentes L1, L2 e L3 (ou forma infectiva). Por outro lado, *Ae. aegypti* bloqueia o desenvolvimento do verme além do primeiro estágio (L1).

Apesar de alguns genes envolvidos no controle genético da susceptibilidade de *Ae. aegypti* a filarídeos já terem sido mapeados, pouca informação foi acumulada sobre quais são exatamente os genes e como eles atuam no mecanismo de refratariedade/susceptibilidade. Reações de melanização e encapsulação melanótica são observadas em algumas espécies de mosquitos, cujas linhagens são refratárias à infecção por esses parasitas, embora nenhuma resposta imune visível ou suficientemente forte ocorra em *Ae. aegypti*. Não obstante, sabe-se que a infecção e o desenvolvimento de *W. bancrofti* em várias espécies de mosquitos acarretam mudanças em seus componentes humorais: as moléculas envolvidas nessas respostas são induzidas e secretadas na hemolinfa pelo corpo gorduroso e por hemócitos circulantes.

Peptídeos antimicrobianos desempenham importante papel na resposta humoral de mosquitos, devido à potencial ação de bloquear o desenvolvimento de parasitas. A indução de seus respectivos transcritos pode ocorrer após infecções com patógenos e/ou parasitas. Várias dessas moléculas, como a defensina, a cecropina e a transferrina, já foram identificadas e caracterizadas em mosquitos, após sua exposição a bactérias, incluindo *Ae. aegypti*.

Todavia, a maioria dos estudos que tratam sobre a expressão de moléculas envolvidas na resposta humoral foi realizada em mosquitos expostos a bactérias e outros microorganismos, muitos dos quais não são patógenos naturais de vetores e, também, a via de infecção utilizada não foi natural. Além disso, pouco é conhecido sobre a regulação de tais moléculas após a infecção com metazoários, incluindo *W. bancrofti*.

Técnicas moleculares sensíveis e específicas usadas na detecção da expressão e caracterização de genes envolvidos na síntese de peptídeos antimicrobianos por vetores estão contribuindo para o aprofundamento de questões referentes a respostas mediadas por imunopeptídeos. Desse modo, destaca-se a importância dos estudos sobre a resposta imune inata de vetores contra parasitas e/ou patógenos, como no modelo *Ae. aegypti/W. bancrofti*, proposto neste trabalho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Filariose Linfática

A filariose linfática humana é uma doença parasitária crônica transmitida por mosquitos e de significativo impacto sócio-econômico em países endêmicos, cujos agentes etiológicos são nemátodos dos gêneros *Wuchereria* e *Brugia*. Predominantemente, a elefantíase é o sinal clássico da fase sintomática mais avançada dessa doença.

2.1.1 Epidemiologia, Sintomas Clínicos e Diagnóstico

A filariose linfática é uma doença de importância em saúde pública que afeta cerca de 120 milhões de pessoas no mundo, ao longo de 83 países localizados em regiões tropicais e sub-tropicais. Mais de 1,3 bilhões de pessoas, aproximadamente 18% da população mundial, reside em áreas de risco. Destas, um terço vive na Índia, outro terço na África e o restante na Ásia, nas ilhas do Pacífico e nas Américas. No momento, Bangladesh, República Democrática do Congo, Índia, Indonésia, Madagascar, Nigéria e Filipinas são os países com maior número de casos registrados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

Nas Américas, apenas quatro países são reconhecidamente endêmicos: Haiti, República Dominicana, Guiana e Brasil (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2007). Na década de 50, após um levantamento realizado no Brasil, casos autóctones de filariose linfática causada por *W. bancrofti* foram encontrados em 11 cidades (ROCHA; FONTES, 1998). Atualmente, essa doença apresenta distribuição urbana e focal, sendo detectada nos municípios de Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista, todos localizados na Região Metropolitana do Recife, Pernambuco (BRASIL, 2008). Os índices de prevalência no Recife variam entre as microrregiões (0,6% a 14,9%), sendo a média da cidade 6,5% (MACIEL et al., 1996).

A filariose linfática, em sua forma sintomática, é extremamente dolorosa e desfigurante. Os filarídeos são transmitidos aos humanos pela picada de um mosquito

competente infectado e desenvolvem-se em vermes adultos no interior dos vasos linfáticos, causando dano severo ou edema. O inchaço, que pode afetar os membros, mamas e genitália, deve-se à imunopatologia severa e conseqüente disfunção linfática (LAWRENCE, 2001). Acredita-se que numerosas picadas de mosquitos infectados, por um período de muitos meses a anos, são necessárias para contrair a doença (SOUTHGATE, 1992).

Apesar de geralmente ser adquirida durante a infância, suas manifestações visíveis ocorrem na idade adulta, conduzindo os indivíduos à inaptidão temporária ou permanente, mas apresenta rara mortalidade. Episódios de linfagite e linfadenite febril podem ocorrer, assim como “ataques agudos” (recorrentes de infecções bacterianas secundárias) e a síndrome da eosinofilia pulmonar tropical (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

Aproximadamente 25 milhões de homens sofrem da patologia genital (Figura 1B) e 15 milhões sofrem de linfodema ou elefantíase nas pernas (Figura 1A). Não obstante, a maioria das pessoas infectadas são microfilarêmicas assintomáticas e nunca desenvolvem os sintomas clínicos. Porém, todas possuem dano linfático sub-clínico e 40% apresentam comprometimento renal (proteinúria e hematúria) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

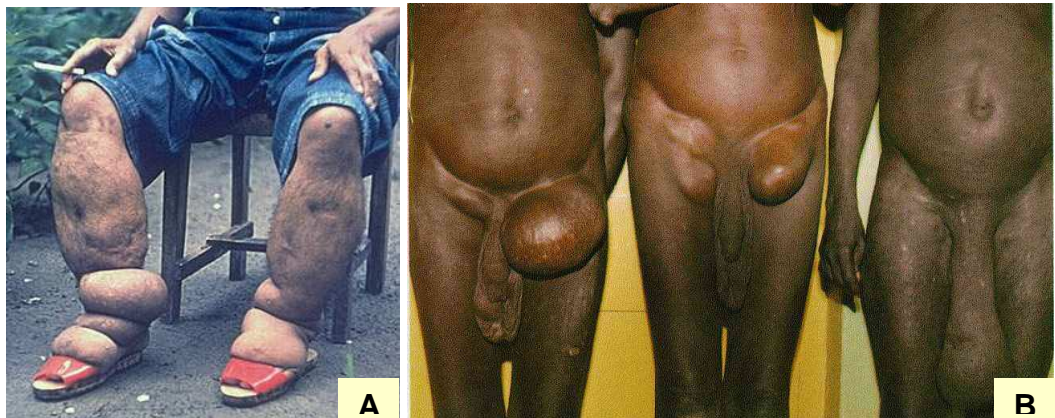


Figura 1 - Pacientes acometidos por filariose linfática, apresentando elefantíase (A) e hidrocele (B).

Fonte: Lymph Notes (2006) (A); Pathology Guy (2007) (B).

O diagnóstico padrão da infecção ativa é dado pelo método da gota espessa, que consiste na detecção e identificação da microfilaria pelo exame microscópico de esfregaço de sangue capilar da polpa digital. Técnicas sorológicas são uma alternativa, uma vez que pacientes com infecção ativa por filárias tipicamente apresentam elevados níveis do anticorpo

anti-filarídeo IgG4 no sangue, e estes podem ser detectados por ensaios de rotina. No entanto, esse método apresenta algumas desvantagens, como a ocorrência de falsos negativos, já que o linfodema pode desenvolver-se muitos anos após a infecção do paciente, e a não distinção entre os anticorpos produzidos nas infecções passadas e nas mais recentes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2007). Outra possibilidade é o diagnóstico molecular por PCR, disponível para várias espécies de filarídeos (FISCHER; BOAKYE; HAMBURGER, 2003).

2.1.2 Tratamento, Prevenção e Controle

Embora a grande maioria dos portadores de filariose linfática seja assintomática, esta funciona como fonte de infecção e, portanto, do ponto de vista epidemiológico, necessita de atenção. Além disso, os indivíduos assintomáticos ou com manifestações discretas podem apresentar alta microfilaremia, enquanto os pacientes com elefantíase ou outras manifestações clínicas crônicas podem não apresentar microfilaremia periférica ou esta ser bastante reduzida (REY, 2002). Portanto, o tratamento de pessoas microfilarêmicas requer planejamento que vise reduzir a transmissão da doença.

O tratamento usual para pacientes infectados com o filarídeo consiste na administração de dietilcarbamazina (DEC), cuja dosagem recomendada é de 6 mg/kg/dia, via oral, durante 12 dias. Adotada mundialmente há mais de 50 anos, DEC mata microfilárias e alguns dos vermes adultos. Seus efeitos colaterais geralmente são limitados e dependem do número de microfilárias no sangue. Eles incluem: reações alérgicas, vertigem, náusea, febre, cefaléia, dor nos músculos e articulações. Outra opção de tratamento é a ivermectina, que mata apenas a microfilária (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2007). Pacientes em condições crônicas não são indicados para tratamento com DEC, uma vez que eles não estão ativamente infectados com o filarídeo. Porém, requerem outras medidas, como higiene e tratamento de lesões na pele, exercício para aumentar a drenagem linfática no linfodema e cirurgia nos casos de hidrocele (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

A profilaxia da filariose linfática consiste em duas medidas básicas: o controle vetorial e o tratamento de todos os pacientes microfilarêmicos (REY, 2002). Apesar dos grandes esforços, o controle da densidade populacional de vetores é difícil, devido principalmente ao aumento da resistência a inseticidas e à abundante disponibilidade de criadouros, principalmente nos centros urbanos. A segunda abordagem é o tratamento em

massa, que consiste na administração anual de uma única dose do medicamento a comunidades inteiras localizadas em áreas endêmicas, não havendo a realização de exames prévios para indicação de microfilarêmicos. Como o tratamento químico reduz o nível de microfilárias no sangue, ele diminui, conseqüentemente, a transmissão da doença. Esta é a estratégia principal do Programa Global para Eliminação da Filariose (GPELF, “Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis”).

Em 1997, o GPELF foi iniciado com o objetivo ambicioso de erradicar esta doença até o ano de 2020. No fim de 2005, 42 países iniciaram seus respectivos programas nacionais, fornecendo tratamento em massa para aproximadamente 610 milhões de pessoas. O grau de sucesso entre os programas nacionais é variável: em algumas áreas a transmissão da doença parece ter sido interrompida, enquanto em outras, ela parece ter sido controlada. Os maiores desafios para atingir a meta do programa consistem em mapear de modo completo e preciso a distribuição e a prevalência das regiões de risco e garantir suportes técnico, financeiro e político adequados, tanto por parte de setores públicos quanto privados, em nível nacional, regional e global (GYAPONG; TWUM-DANSO, 2006).

2.1.3 *Wuchereria bancrofti* Cobbold, 1877

Há três diferentes espécies de nemátodos que podem causar filariose linfática em humanos: *W. bancrofti*, *B. malayi* e *B. timori*. No entanto, cerca de 90% das infecções no mundo é causada por *W. bancrofti* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

W. bancrofti (Spirurida: Onchocercidae) é originária do sudeste asiático e passa por diferentes formas evolutivas entre os hospedeiros intermediário e definitivo. Várias espécies de mosquitos podem atuar como hospedeiro intermediário, mas o homem é o hospedeiro vertebrado exclusivo. Muitos aspectos do seu ciclo de vida nos vasos linfáticos não são bem entendidos, principalmente devido à dificuldade de se estabelecer um modelo experimental (ANDERSON, 2000). Além disso, a cultura *in vitro* também é difícil de ser implementada (NEVES et al., 1991). A figura 2 representa o ciclo de vida de *W. bancrofti*.

A fêmea do mosquito susceptível, ao realizar hematofagia em um indivíduo infectado, eventualmente ingere algumas microfilárias de *W. bancrofti*. Ao fim de algumas horas, as microfilárias perdem a bainha no interior do tubo digestivo do mosquito ou durante a sua passagem pelo epitélio intestinal e alcançam a hemocele, onde “nadam” na hemolinfa até

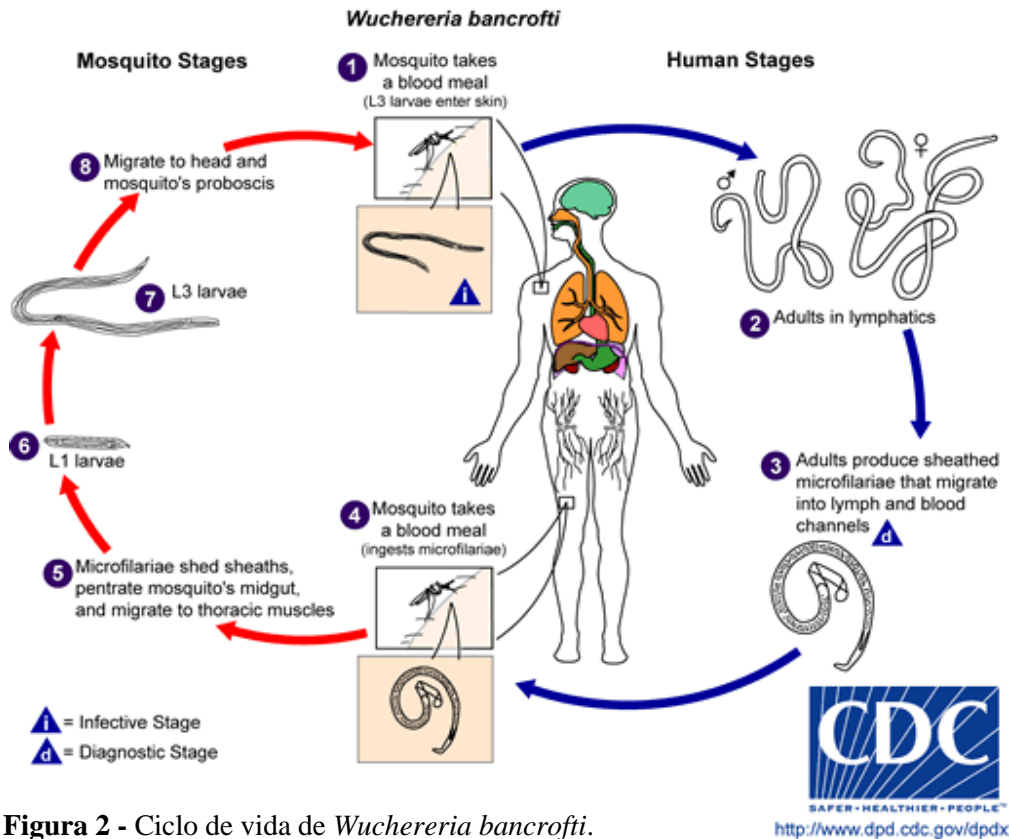


Figura 2 - Ciclo de vida de *Wuchereria bancrofti*.
Fonte: Centers for Disease Control (2007).

atingir sua musculatura torácica (NAYAR; KNIGHT, 1995). Uma vez alojadas entre as células do músculo torácico do mosquito, as microfírias perdem a mobilidade característica e passam por uma série de transformações morfológicas. Por volta do quarto dia, tais mudanças provocam seu encurtamento, tornando-as com o aspecto de salsicha (L1 salsichóide). Estas larvas medem em torno de 300 μm e, por volta do oitavo ou nono dia, sofrem a primeira muda. A partir do décimo segundo dia, a larva de segundo estágio (L2) cresce rapidamente e triplica ou quadruplica seu comprimento. Realizada a segunda muda, em torno do 15º dia após a infecção. A larva de terceiro estágio ou L3, que é a forma infecciosa, abandona os músculos torácicos e, finalmente, aloja-se na probóscide do vetor. O comprimento de uma L3 é pouco inferior a 2 mm (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006; REY, 2002; SCHACHER, 1962).

Quando a fêmea do mosquito volta a realizar hematofagia, a larva infecciosa perfura a extremidade anterior de seu lábio e penetra no epitélio do hospedeiro vertebrado por movimentos ativos. Dentro do hospedeiro vertebrado, as larvas alcançam os vasos linfáticos e realizam a migração necessária para chegar aos locais de permanência definitiva. A maturação sexual se prolonga por um ano. As fêmeas adultas medem de 8 a 10 cm de comprimento e

0,24 a 0,30 mm de diâmetro, enquanto os machos medem cerca de 4 cm por 1 mm (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006; REY, 2002).

Após o acasalamento, as fêmeas adultas produzem microfíliarias, ou seja, embriões envolvidos por uma bainha proeminente, que se estendem além de suas extremidades. As microfíliarias migram livremente, movendo-se ativamente através da linfa e do sangue do hospedeiro. Elas apresentam dimensões de 244 a 296 μm por 7,5 a 10 μm e, em alguns casos, exibem periodicidade noturna na circulação sanguínea periférica, com pico entre 23:00 e 01:00 hora. Por outro lado, algumas microfíliarias exibem periodicidade reduzida (formas sub-periódicas noturna e diurna) ou ausente no Sudeste asiático e no Pacífico Sul, onde outras espécies de mosquitos são vetores. Acredita-se que a periodicidade está sincronizada com os hábitos de sono/vigília do hospedeiro humano e parece ser controlada pela diferença de tensão do oxigênio entre sangue venoso e arterial durante dia/noite (ANDERSON, 2000).

2.1.4 Principais vetores de *Wuchereria bancrofti*

Dependendo da área geográfica, diferentes gêneros de mosquitos podem transmitir *W. bancrofti*. Na África, *Anopheles* spp. são os vetores mais comuns, enquanto nas Américas é o mosquito *Culex quinquefasciatus*. Adicionalmente, algumas espécies dos gêneros *Aedes* e *Mansonia* podem transmitir a infecção na Ásia e no Pacífico (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2007).

Certas espécies de *Anopheles* estão envolvidas na transmissão de *W. bancrofti* e diferem de acordo com a distribuição territorial. Em muitos casos, esses mosquitos também são responsáveis por transmitir malária na mesma região. Alguns vetores da forma periódica desse filarídeo incluem: *An. aconitus*, *An. anthropophagus*, *An. aquasalis*, *An. balabacensis*, *An. dirus*, *An. flavirostris*, *An. funestus*, complexo *An. gambiae*, *An. letifer*, *An. leucosphyrus*, *An. nigerrimus*, complexo *An. punctulatus*, *An. sinensis* e *An. vagus* (ANDERSON, 2000). Em geral, esses anofelinos exibem pico máximo de hematofagia durante a noite. No Brasil, *An. aquasalis* é considerado vetor secundário da filariose bancroftiana e *An. darlingi* também já foi encontrado com larvas infectivas de *W. bancrofti* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Cx. quinquefasciatus Say, 1823 (Diptera: Culicidae) (Figura 3A) é o vetor primário da filariose linfática no Brasil, causada por *W. bancrofti*. Seus criadouros preferenciais são

depósitos artificiais com águas estagnadas ricas em detritos e dejetos humanos, como valas, fossas, ralos e poços. Como este mosquito demonstra predileção por sangue humano e apresenta hábito noturno, seu horário preferencial de hematofagia coincide com o pico de circulação das microfilárias no sangue periférico. Isto facilita bastante o contato das microfilárias com este culicídeo, tornando-o mais eficaz que os outros mosquitos susceptíveis (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Algumas espécies do gênero *Aedes* são importantes vetores de *W. bancrofti*, como *Ae. togoi* (China), *Ae. poicilius* (Filipinas), *Ae. polynesiensis* e *Ae. samoanus* (Samoa e Polinésia Francesa), *Ae. pseudoscutellaris* (Fiji), *Ae. vigilax* (Nova Caledônia), *Ae. niveus* (Tailândia). Curiosamente, os mosquitos de hábito diurno *Ae. polynesiensis* e *Ae. pseudoscutellaris* são transmissores onde ocorre a forma diurna sub-periódica de *W. bancrofti* e a forma periódica noturna está ausente. Apesar de fazer parte do mesmo grupo, *Ae. aegypti* é naturalmente refratário à infecção por este parasita, embora exista uma linhagem susceptível resultante de seleção em laboratório (MACDONALD, 1962a, 1962b).

Ae. aegypti Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) (Figura 3B), vetor de dengue e febre amarela urbana, é um mosquito cosmopolita, predominantemente distribuído em países localizados nas áreas tropicais e subtropicais do globo. Por sua estreita associação com o homem, é essencialmente um mosquito urbano, sendo amplamente encontrado no Brasil (BRASIL, 2002). Demonstra predileção por criadouros artificiais de caráter temporário, representados por recipientes abandonados a céu aberto, preenchidos pelas águas das chuvas, e aqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico, como caixas d'água, tonéis, latões, cisternas e até bebedouros domésticos (CLEMENTS, 1999; SILVA, 2004). Ao contrário de *Cx. quinquefasciatus*, é uma espécie de hábito diurno e, portanto, seu horário de atividade hematofágica não coincide com a circulação da microfilária de *W. bancrofti* de periodicidade noturna presente no Brasil (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

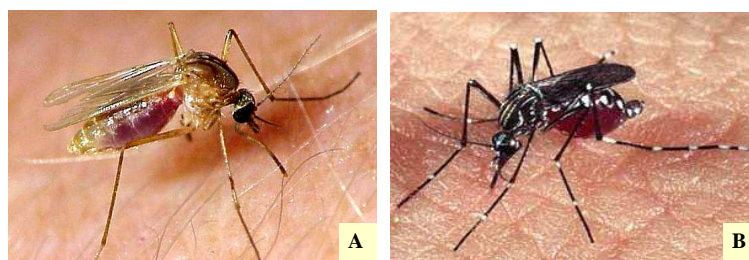


Figura 3 - *Culex quinquefasciatus* (A) e *Aedes aegypti* (B).
Fonte: Orange County Vector Control District (2008) (A);
Ciência Hoje (2007) (B).

2.2 Imunidade em insetos

Considerando os diversos ambientes em que os insetos vivem, os patógenos aos quais eles estão expostos e o sucesso com o qual colonizam quase todos os nichos da terra, compreendemos que parte deste sucesso é atribuída à sua resposta imune de auto-proteção contra a invasão de microorganismos (LOWENBERGER, 2001). Embora a resposta imune inata de insetos seja menos complexa que a resposta imune adaptativa de vertebrados, devido à ausência de linfócitos B e T de memória, ela é uma característica evoluída. Por exemplo, Watson et al. (2005) identificaram um gene pertencente à superfamília das imunoglobulinas em *Drosophila melanogaster* (*Dm*) e mostraram que somente este gene é capaz de gerar mais de 19.000 moléculas diferentes por *splicing* alternativo. A diversidade molecular gerada por este mecanismo é altamente conservada entre as principais ordens de insetos e sugere uma complexidade do sistema imune inato dos insetos até então desconhecida.

Apesar da relevância desse campo, a maior parte da informação disponível sobre imunidade de insetos é proveniente de estudos com espécies não vetoras (BRIVIO; PAGANI; RESTELLI, 2002; EVANS, 2004; GILLESPIE; BURNETT; CHARNLEY, 2000; KIM; KIM, 2005; VILJAKAINEN; PAMILO, 2005). Estudos de imunologia do organismo modelo *Dm*, por exemplo, possibilitaram significativo acúmulo de conhecimento nessa área, principalmente após o seqüenciamento de seu genoma (ADAMS et al., 2000). Recentemente, as pesquisas estão direcionadas à exploração do sistema imune de outras espécies, incluindo mosquitos, como *An. gambiae*, vetor da malária, e *Ae. aegypti*, cujos genomas também foram seqüenciados (HOLT et al., 2002; NENE et al., 2007).

2.2.1 Órgãos e tecidos do sistema imune de insetos

Para enfrentar o risco de infecção, decorrente da exposição freqüente a diversos microorganismos, os insetos desenvolveram inúmeras barreiras estruturais e um multifacetado sistema imune inato, compreendendo uma variedade de mecanismos de defesa sinérgicos. A primeira linha de defesa contra a invasão por microorganismos é representada pelas barreiras estruturais. Os insetos possuem uma rígida cutícula de natureza quitinosa que protege seus órgãos internos, assim como a hemolinfa, funcionando como excelente barreira à exposição

direta de patógenos em potencial do meio ambiente. Uma vez rompida, ela é prontamente selada pelas reações de coagulação e melanização (CHAPMAN, 1999).

A rota mais comum de entrada de um patógeno ou parasita é dada pela ingestão, principalmente em insetos hematófagos. Sabe-se que a sucção do alimento através da probóscide é dada pela ação das bombas cibarial e faríngea. No lúmen do intestino anterior de algumas espécies de mosquitos, essas bombas são delineadas por grupos ou fileiras de dentes, papilas e/ou espinhos quitinosos, formando as armaduras cibarial e faríngea, respectivamente. No caso de filarídeos, estudos mostraram que essas estruturas limitaram a intensidade média de infecção por *B. pahangi* e *W. bancrofti* em diversas espécies de mosquitos, por causar laceração letal sobre as microfilárias ingeridas em sangue infectado (ANYANWU et al., 2000; LOWRIE et al., 1989; MCGREEVY et al., 1978). O próprio ambiente do trato digestivo também pode afetar a viabilidade desses parasitas, uma vez que a coagulação do sangue ingerido pode imobilizá-los, impedindo sua migração através do epitélio intestinal. Durante esse processo, ainda pode ocorrer a formação de cristais de oxi-hemoglobina, que podem causar a morte ou injúria de microfilárias (AHID et al., 2000).

Todos os insetos hematófagos produzem a matriz peritrófica, um saco impermeável de natureza quitinosa que encobre o bolo alimentar. Em alguns casos, ela facilita a digestão e protege o epitélio intestinal do contato direto com a refeição e seus componentes tóxicos, assim como de prováveis infecções causadas por patógenos e/ou parasitas ingeridos. Entretanto, uma vez que essa estrutura é secretada após a migração da maioria das microfilárias através do epitélio intestinal do mosquito, ela não é capaz de limitar infecções por esses vermes (BARILLAS-MURY; PASKEWITZ; KANOST, 2005). Em outros casos, alguns parasitas desenvolveram um mecanismo específico para escapar da matriz peritrófica, como espécies de *Plasmodium* que utilizam a quitinase (SHAHABUDDIN et al., 1993).

Além de barreira física, os tecidos epiteliais também conferem proteção imunológica, sendo capazes de produzir componentes de defesa. O tegumento, o intestino, as glândulas salivares, os túbulos de Malpighi e os componentes do sistema reprodutivo sintetizam um conjunto de moléculas imunológicas que estão envolvidas em reações especializadas de defesa (DIMOPOULOS et al., 1997; 1998; FERRANDON et al., 1998; ONFELT; LINCOLN; NORDÉN, 2001; TZOU et al., 2000).

O corpo gorduroso, um órgão análogo ao fígado, é o maior sítio metabólico e o principal local de estocagem de glicogênio. Além disso, é o maior produtor de proteínas imunes fornecidas à hemolinfa. Ele consiste de várias camadas de células localizadas abaixo da epiderme, nos compartimentos torácico e abdominal (CHAPMAN, 1999).

O tecido onde ocorre a maioria das respostas imunes é o sangue ou hemolinfa, que consiste de hemócitos e plasma. Como o aparelho circulatório dos insetos é aberto, a hemolinfa circula na hemocele e banha diretamente os outros tecidos. O plasma contém muitos compostos químicos importantes, como nutrientes e imunopeptídeos. A porção celular da hemolinfa é composta por hemócitos circulantes. Os plasmócitos, o mais abundante tipo de hemócito (cerca de 60% da população), correspondem aos macrófagos dos mamíferos. São células amebóides, ativamente envolvidas na fagocitose, formação de nódulos, reações de encapsulação e cicatrização. Dano tecidual ou infecção causam mudanças no número de plasmátócitos circulantes (BLANDIN; LEVASHINA, 2004; PAILY et al., 2005). Por outro lado, os granulócitos são células que degranulam durante uma variedade de respostas imunes, incluindo fagocitose, formação de nódulos e encapsulação. Já os coagulócitos, esferulócitos e oenócitos ocorrem em menor frequência e suas funções são incertas. Os hemócitos estão livres, sésseis ou arranjados em agregados conhecidos por órgão hemopoiético ou fagocítico. Também têm papel em muitos aspectos do funcionamento normal do inseto, como produção de proteases envolvidas no desarranjo dos tecidos durante a metamorfose e são sítios de síntese de peptídeos antimicrobianos (CHAPMAN, 1999).

2.2.2 O reconhecimento do corpo estranho (*nonsel*)

Para o inseto responder à invasão por um microorganismo, ele necessita distingui-lo de seus próprios tecidos, processo conhecido como reconhecimento do *nonsel*. Segundo Janeway et al. (2002), este reconhecimento é resultado da interação entre os produtos codificados pelos genomas do patógeno e do hospedeiro, sob pressões seletivas conflitantes.

O sistema imune inato compreende uma variedade de mecanismos efetores que conseguem controlar a infecção. No momento, o conhecimento detalhado do sistema imune de insetos a nível molecular procede de estudos com *Dm* (KIM; KIM, 2005). Fazem parte desse processo três etapas distintas: o reconhecimento do corpo estranho, a rede regulatória e os mecanismos efetores, ou seja, as células e moléculas de defesa, que eventualmente destroem o invasor.

A resposta imune inata de insetos envolve mecanismos que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, “Pathogen Associated Molecular Patterns”), característicos de organismos microbianos, usando moléculas capazes de realizar ligação

específica, chamadas receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, “Pattern Recognition Receptors”). PAMPs são moléculas bem conservadas da superfície de microorganismos e não estão representados em hospedeiros e, dessa forma, garantem a distinção entre “self” e “nonself”. Por sua vez, PRRs podem mediar a morte do microorganismo diretamente, através da fagocitose, ou indiretamente, pela ativação da cascata serino protease, que ativa reações de defesa, como encapsulação melanótica, ou inicia vias imunes de sinalização intracelular, que regulam a transcrição de genes que codificam peptídeos antimicrobianos e outros genes efetores (HOFFMANN, 1992).

PAMPs típicos incluem lipopolissacarídeos, manoses e peptideoglicanos. Até o momento, tais moléculas não foram identificadas para outras categorias de parasitas, além de bactérias e fungos. Proteínas de reconhecimento de peptideoglicanos, por exemplo, reconhecem bactérias gram-positivas e ativam a cascata pró-fenoloxidase (PPO). Proteínas de ligação a bactérias gram-negativas são exclusivas de invertebrados e ligam-se a moléculas típicas (lipopolissacarídeos e glicanos), que estão associadas a esta classe de microorganismo (KURATA, 2006).

Após o reconhecimento, uma rede regulatória é prontamente induzida, e, eventualmente, conduz à ativação de mecanismos efetores. A análise genética em *Dm* definiu duas principais cascatas de transdução de sinal que regula a transcrição de peptídeos antimicrobianos, a via Toll e a via da imunodeficiência (Imd). A via Toll é similar à via de receptores Toll de mamíferos e de receptores de interleucina-1, enquanto a via Imd é homóloga ao receptor do fator de necrose tumoral de mamíferos (KIM; KIM, 2005). Em *Dm*, a via Toll é essencialmente disparada por infecções com fungos e bactérias gram-positivas, enquanto a via Imd é disparada por bactérias gram-negativas e, provavelmente, está direcionada para a produção de peptídeos antimicrobianos (KIM et al., 2005).

Os mecanismos efetores em insetos consistem de componentes celulares e humorais. Os primeiros incluem fagocitose (HILLYER; SCHMIDT; CHRISTENSEN, 2003, 2004; HILLYER et al., 2005b), formação de nódulos e encapsulação por hemócitos (CHRISTENSEN; FORTON, 1986); enquanto os componentes humorais incluem a via de melanização e cicatrização, provocada pelo sistema de cascata da fenoloxidase (HILLYER; CHRISTENSEN, 2005a; LAI; CHEN; HOU, 2001), a produção de peptídeos antimicrobianos (LOWENBERGER, 2001; SÖDERHALL; CERENIUS, 1998; TZOU; REICHHART; LEMAITRE, 2002; VIZIOLI; BULET; HOFFMANN, 2001; ZASLOFF, 2002) e as reações oxidativas (KUMAR; CHRISTOPHIDES; CANTERA, 2003; LANZ-MENDOZA; HERNANDEZ-MARTINEZ; KU-LOPEZ, 2002). Adicionalmente, processos bioquímicos

envolvidos conduzem à liberação de componentes citotóxicos (NAPPI; OTTAVIANI, 2000) e de inúmeras moléculas de defesa, como enzimas proteolíticas (TZOU; REICHHART; LEMAITRE, 2002). Apesar dessa divisão, as respostas celular e humoral são eventos simultâneos e interdependentes (ELROD-ERICKSON; MISHRA; SCHNEIDER, 2000).

A análise comparativa do genoma de *Dm* e *An. gambiae* mostrou a presença de 18 famílias gênicas e um grande número de genes individuais relacionados à imunidade inata, que estão envolvidos nos processos de reconhecimento, modulação e transdução de sinais ou nos sistemas efetores (CRISTOPHIDES et al., 2002). Um estudo mais recente identificou vários genes pertencentes a 31 famílias e grupos funcionais envolvidos na imunidade inata clássica ou em funções de defesa, tais como apoptose e resposta a estresse oxidativo, entre *Dm* (285 genes) e os mosquitos *An. gambiae* (338 genes) e *Ae. aegypti* (353 genes) (WATERHOUSE et al., 2007), indicando que nesta última espécie, provavelmente, houve uma expansão destas famílias gênicas.

2.2.3 Respostas Celulares e Respostas Humorais

A fagocitose é a resposta inicial de hemócitos de artrópodes a bactérias e outros invasores, como esporos de protozoários ou fungos, pequenos o suficiente para serem engolfados. Provavelmente, deve ocorrer a formação de proteínas bactericidas, mas seu modo de ação é pouco entendido (CHAPMAN, 1999). Por outro lado, respostas a infecções mais severas são mediadas pela formação de nódulos. Estes são compostos por uma frouxa associação de hemócitos. Quando em grande número, bactérias e fungos são atacados e, poucos minutos após a sua entrada na hemolinfa, são aprisionados em um coágulo produzido por numerosos granulócitos. Pouca fagocitose ocorre e, algumas vezes, as partículas tornam-se melanizadas. A intensidade da resposta varia, mas organismos mais patogênicos geralmente induzem respostas mais fortes e rápidas (CHAPMAN, 1999).

Um terceiro tipo de resposta é a encapsulação por hemócitos. Granulócitos descarregam seus conteúdos na superfície do invasor e plasmatócitos são atraídos para o local, onde se acumulam e formam uma cápsula compreendendo várias camadas de células. Uma vez as células adjacentes ao objeto tornem-se necrosadas, melanina é frequentemente produzida nesta camada, como consequência da ativação do sistema PPO. Em alguns vetores

dípteros, devido ao reduzido número de hemócitos, a melanização pode ocorrer sem a formação de uma camada celular. Isto é frequentemente chamado encapsulação melanótica humoral. Entretanto, os hemócitos estão envolvidos nos estágios iniciais, durante a formação da cápsula. A encapsulação por hemócitos já foi descrita para uma variedade de infecções por parasitas, incluindo *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Brugia*, *Dirofilaria* e *Wuchereria* (BEERNTSEN; LUCKHART; CHRISTENSEN, 1989; COLLINS et al., 1986; KAAYA et al., 1986; LIU et al., 1997; PAILY et al., 2005; TAKLE, 1988). O modo como o parasita é morto durante esse processo é conjectural.

O processo de melanização envolve uma série de reações complexas que incluem a hidroxilação da tirosina por fenoloxidasas (POs) para formar a 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA) e sua seqüencial conversão à melanina pela PO e outras enzimas (CHRISTENSEN et al., 2005). Além de ser um importante constituinte das reações de encapsulação em mosquitos, a melanina também está envolvida nos processos de cicatrização, esclerotinização cuticular e formação do córion do ovo (AHMED; HURD, 2005). Apesar de este processo ser apontado como o mecanismo de resistência de certas linhagens de *Plasmodium* (COLLINS et al., 1986), tais respostas são frequentemente insuficientes para conter o desenvolvimento de filarídeos (ALBUQUERQUE et al., 1999).

O elemento-chave da imunidade humoral é a velocidade na qual a resposta ocorre: transcritos podem ser encontrados poucos minutos após o estímulo, e suas respectivas proteínas, em horas (CASTEELS-JOSSON et al., 1994; LOWENBERGER et al., 1995, 1996, 1999a, 1999b, 1999c). Essa característica garante, muitas vezes, a rapidez na eliminação do microorganismo invasor. Peptídeos antimicrobianos desempenham um importante papel na resposta humoral. Eles são membros altamente conservados em diversos taxa, incluindo organismos unicelulares (LEIPPE, 1999), outros grupos de artrópodes (KURATA et al., 2006), plantas (BROEKAERT et al., 1995) e vertebrados, como mamíferos, aves, anfíbios e peixes (LEHRER; LICHTENSTEIN; GANZ, 1993; LEHRER; GANZ, 1996). Nos insetos, a maioria destes peptídeos apresenta de 20 a 40 aminoácidos e são rapidamente produzidos pelo corpo gorduroso, hemócitos e tecidos epiteliais logo após a infecção. Sua atividade é, na maioria dos casos, de relativa especificidade para diferentes classes de patógenos. Esse potencial modo de ação com alcance para diferentes patógenos é importante, pois restringe a probabilidade do desenvolvimento de resistência em parasitas. No caso das bactérias, o mecanismo de morte do microorganismo é dado pela desintegração da membrana bacteriana ou pela interferência de suas proteínas de membrana (OTVOS, 2000). Em dípteros, as principais classes de peptídeos antimicrobianos são: defensina, cecropina e gambicina.

2.2.4 Peptídeos antimicrobianos

Em geral, a resposta imune em insetos e, especificamente, em mosquitos, não é padronizada. Embora todos os insetos sejam capazes de produzir imunopeptídeos pertencentes à mesma família, a expressão de peptídeos específicos ou sua concentração difere entre espécies diversas, famílias e ordens de insetos (OTVOS, 2000). O nicho específico e o patógeno aos quais essas diferentes espécies são expostas rotineiramente podem desempenhar papel crítico na evolução da resposta imune.

Há alguns anos, pouca informação sobre peptídeos antimicrobianos em vetores dípteros estava disponível, pois a sua relevância na transmissão direta da doença não tinha se mostrado evidente e também devido à limitação dos métodos de obtenção de amostras adequadas de sua hemolinfa. Entretanto, técnicas moleculares sensíveis e específicas usadas na caracterização e expressão de genes envolvidos na síntese de peptídeos antimicrobianos por vetores estão contribuindo para o aprofundamento de questões referentes a respostas mediadas por imunopeptídeos (BARTHOLOMAY et al., 2003, 2004a, 2004b; DINGLASAN et al., 2005; HU; AKSOY, 2005).

2.2.4.1 Defensinas

Defensinas (*def*) de insetos foram primeiramente descritas independentemente em *Sarcophaga peregrina* (MATSUYAMA; NATORI, 1988a, 1988b) e *Phormia terranova* (LAMBERT et al., 1989). Até o momento, cerca de 30 delas foram isoladas de várias ordens de insetos, incluindo Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Trichoptera e Odonata (DIMARCQ et al., 1998). Defensinas são peptídeos catiônicos de 4 kDa que são processados por clivagem proteolítica, a partir de uma molécula precursora que inclui uma seqüência sinal, um pró-peptídeo e uma região madura. O peptídeo maduro possui aproximadamente 40 aminoácidos de comprimento e contém seis resíduos conservados de cisteína arranjados em três pontes dissulfeto intramoleculares, resultando em uma estrutura tridimensional com uma alça N-terminal, uma α -hélice e duas β -folhas antiparalelas (CORNET et al., 1995; LOWENBERGER et al., 1995).

Essa molécula foi o primeiro imunopeptídeo isolado de *Ae. aegypti* (CHALK et al., 1995a; CHALK; TOWNSON; HAM, 1995b; LOWENBERGER et al., 1995). Ela também já foi isolada de linhagens celulares de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (GAO; HERNANDEZ; FALLON, 1999), do mosquito *An. gambiae* (DIMOPOULOS et al., 1997; 1998; RICHMAN et al., 1996), e também está relacionada ao peptídeo encontrado na geléia real de abelhas, a royalisina (EVANS, 2004). Seu espectro de atividade em mosquitos é dado primeiramente contra bactérias gram-positivas (LOWENBERGER et al., 1995), embora alguns fungos e bactérias gram-negativas também ativem sua transcrição (AGUILAR et al., 2005; LAMBERTY et al., 1999). Acredita-se que seu modo de ação ocorre pela formação de canais dependentes de voltagem na membrana citoplasmática (HOFFMANN; HETRU, 1992).

Três isoformas da defensina (A, B e C) já foram reportadas em *Ae. aegypti* e seus perfis transcricionais estudados, embora as nomenclaturas atribuídas sejam contraditórias (LOWENBERGER et al., 1995; CHALK et al., 1995a). A nomenclatura é alfabética, baseada na seqüência de aminoácidos da região madura. *DefA* difere de *defB* e de *defC* por um (B) e dois (C) aminoácidos na seqüência madura (LOWENBERGER et al., 1995). *DefD*, isolada de *Ae. albopictus*, contém prolina e isoleucina no lugar de arginina e asparagina, respectivamente, ocupando a posição dos dois últimos aminoácidos da região madura do peptídeo (GAO; HERNANDEZ; FALLON, 1999). O alinhamento das seqüências de aminoácidos da região madura dessas defensinas está ilustrado na figura 4. Lowenberger et al. (1999b) sugeriram que as isoformas A e B seriam variantes alélicas de um mesmo gene, enquanto a isoforma C seria codificada por um gene diferente. Com a publicação do genoma de *Ae. Aegypti*, três defensinas foram encontradas: *defA* (Número de acesso no VectorBase: AAEL003841), *defB* (Número de acesso no VectorBase: AAEL003857) e *defC* (Número de acesso no VectorBase: AAEL003832). Estas isoformas apresentam 544pb, 707pb e 743 pb, respectivamente, e são genes diferentes, uma vez que estão localizadas em posições cromossômicas distintas. Baseado na variabilidade da seqüência sinal de *defA* em *Aedes*, pelo menos cinco diferentes polimorfismos (A1-A5) já foram definidos (CHO et al., 1996; GAO; HERNANDEZ; FALLON, 1999).

As várias isoformas da defensina mostram diferenças no perfil de expressão temporal e espacial em vetores infectados com bactérias. A isoforma C é expressa em nível basal no intestino de adultos não imune-estimulados, enquanto as isoformas A e B são fortemente transcritas no corpo gorduroso após imune ativação (LOWENBERGER et al., 1999b). Após a infecção com bactérias, as isoformas A e B foram encontradas em concentrações semelhantes (45 µM), enquanto defensina C foi encontrada em quantidade cinco vezes menor

(LOWENBERGER et al., 1999b). Adicionalmente, estudos realizados em estágios imaturos de *Ae. aegypti* revelou que defensina é constitutivamente expressa em pupas jovens, mas nenhuma expressão é detectada em larvas (LOWENBERGER et al., 1999b).

```

defA = ATCDLLSGFGVGD SACAAH CIARGNRGGGYCNSKKVCVCRN*
defB = ATCDLLSGFGVGD SACAAH CIARGNRGGGYCNSQKVCVCRN*
defC = ATCDLLSGFGVGD SACAAH CIAR RNRGGGYCNAKKVCVCRN*
defD = ATCDLLSGFGVGD SACAAH CIARGNRGGGYCNSKKVCVCP I~

```

Figura 4 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos da região madura de defensinas de *Aedes aegypti* (*defA*, *defB* e *defC*) e *Ae. albopictus* (*defD*), deduzidas a partir das suas respectivas seqüências de DNAC.

Fonte: VectorBase (2008); Gao, Hernandez e Fallon (1999).

2.2.4.2 Cecropinas

Cecropinas são pequenos peptídeos básicos (4 kDa), destituídos de resíduos de cisteína, que contêm 34-39 aminoácidos. Sua cadeia é formada por duas α -hélices anfipáticas, separadas por uma dobra que consiste de uma seqüência alanina-glicina-prolina. A carga positiva é conferida pela alta proporção de aminoácidos básicos na região N-terminal, enquanto a região C-terminal é rica em resíduos hidrofóbicos. A cecropina foi o primeiro imunopeptídeo isolado e completamente caracterizado em insetos, a partir de *Hyalophora cecropia* (HULTMARK et al., 1980). Desde então, pelo menos 20 isoformas deste peptídeo já foram identificadas em várias espécies de invertebrados (DIMARCQ et al., 1998).

Cecropinas de insetos exibem amplo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como alguns fungos (HERNANDEZ; GERENDAY; FALLON, 1994). Esse imunopeptídeo e seus derivados sintéticos exibem atividade contra *Trypanosoma* (JAYNES et al., 1988), *Plasmodium* (BOMAN et al., 1989; GWADZ et al., 1989) e *Brugia pahangi* (CHALK et al., 1995a; CHALK; TOWNSON; HAM, 1995b). Em mosquitos, já foram isoladas da hemolinfa de indivíduos *Ae. aegypti* (LOWENBERGER et al., 1999a) e *An. gambiae* (VIZIOLI et al., 2000) e do sobrenadante de cultura de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* imune-estimulados (SUN; ECCLESTON; FALLON, 1998, 1999; SUN; FALLON, 2002).

Após a injeção com bactérias, são rápida e fortemente transcritas em *Ae. aegypti* adulto, mas não são detectadas em outras fases do desenvolvimento (LOWENBERGER et al., 1999a).

Assim como a defensina, sua região codificante inclui seqüências sinal e pró-peptídeo que são removidas durante o processamento para a forma madura. A seqüência do gene que codifica o peptídeo maduro possui sete aminoácidos variáveis e é altamente conservada, sendo interrompida por um único íntron (SUN; ECCLESTON; FALLON, 1999; VIZIOLI et al., 2000). Em *Dm*, cecropina é uma família multigênica constituída por genes funcionais (*cecA1*, *cecA2*, *cecB* e *cecC*) e pseudogenes (*cecΨ1* e *cecΨ2*) (KYLSTEN; SAMAKOVLIS; HULTMARK, 1990; TRYSELIUS, 1992). Todos os genes funcionais são expressos sob infecção bacteriana, principalmente no corpo gorduroso, embora em diferentes períodos do desenvolvimento: *cecA1* e *cecA2* são expressos em larvas e adultos, enquanto *cecB* e *cecC* são expressos na fase de pupa (HULTMARK, 1993). As três isoformas (A, B e C) já foram relatadas para *Ae. albopictus* (SUN; ECCLESTON; FALLON, 1998, 1999) e apenas as isoformas A e B foram detectadas em *Ae. Aegypti* (LOWENBERGER et al., 1999a). Lowenberger (2001) sugeriu que *cecA* e *cecB* de *Ae. aegypti* seriam alelos de um mesmo gene. Uma análise mais recente no banco de dados do genoma de *Ae. aegypti* revela apenas a presença da isoforma A (VECTORBASE, 2008).

Em geral, as cecropinas de insetos são caracterizadas pela presença de resíduo de triptofano na posição 1 ou 2 e amidação na região C-terminal. Todavia, nenhuma molécula isolada de mosquito possui triptofano nesse local e apenas algumas espécies apresentam essa amidação. O espectro de atividade da cecropina de *Ae. aegypti* é similar ao de *Dm*, embora seja menos ativa que a molécula de *Dm*, que contém triptofano na posição 2 e é amidada. Supõe-se que esses fatores podem contribuir para a estabilidade ou atividade da molécula (LOWENBERGER et al., 1999a).

2.2.4.3 Transferrinas

Em vertebrados, a transferrina é uma glicoproteína de aproximadamente 80 kDa, que apresenta dois sítios de ligação ao ferro, um localizado no domínio N-terminal e outro no domínio C-terminal, que são similares, mas encontram-se separados. Ela é a maior proteína transportadora de íons ferro (Fe^{+3}) do sangue para as células que expressam o seu respectivo receptor (LOCKE; NICHOL, 1992).

Em insetos, é sugerido que a ferritina seja a proteína primária de transporte de ferro, uma vez que é predominantemente secretada no meio extracelular, ao contrário da ferritina citosólica de mamíferos, cuja função é de armazenamento (LOCKE; NICHOL, 1992). A transferrina, por sua vez, é apontada como uma molécula de efeito antibiótico, assim como a lactoferrina de humano (YOSHIGA et al., 1997; 1999). Acredita-se que insetos usam a transferrina para seqüestrar Fe^{+3} de patógenos, reduzindo, conseqüentemente, a infecção por esses microorganismos (YOSHIGA et al., 1997; 1999).

A transferrina é considerada uma proteína de fase aguda, pois, sob condições de estresse ou infecção, sua concentração pode aumentar. Em *Dm* e em *Ae. aegypti*, há um aumento na sua transcrição após injeção com bactérias (YOSHIGA et al., 1997; 1999). A inoculação de vermes filarídeos na hemocele de *Ae. aegypti* (BEERNTSEN; SEVERSON; CHRISTENSEN, 1994) e a alimentação artificial de *Cx. quinquefasciatus* com sangue infectado com *W. bancrofti* (PAILY; KUMAR; BALARAMAN, 2007) igualmente ativam a transcrição dessa imunoproteína. Em *Armigeres subalbatus* ocorre resposta similar à injeção com bactérias, embora o mecanismo de morte da microfilária de *Brugia malayi* seja dado por encapsulação melanótica (BEERNTSEN; SEVERSON; CHRISTENSEN, 1994). Transferrina também já foi identificada em *M. sexta* (BARTFELD; LAW, 1990), *S. peregrina* (KURAMA; KURATA; NATORI, 1995) e *Apis mellifera* (NASCIMENTO et al., 2004).

Algumas bactérias que são patogênicas a vertebrados apresentam receptores para transferrina, possibilitando o seqüestro de ferro, mecanismo conhecido como “iron piracy” (CORNELISSEN; SPARLING, 1994). Estes receptores interagem principalmente com o domínio C-terminal da transferrina (ALCANTARA; YU; SCHRYVERS, 1993). No entanto, a transferrina de invertebrados, em oposição à transferrina de vertebrados, apresenta apenas o domínio de ligação ao ferro da região N-terminal (NICHOL; LAW; WINZERLING, 2002). Conseqüentemente, Yoshiga et al. (1997) sugerem que insetos evoluíram esta característica para impedir a aquisição de Fe^{+3} pelo parasita.

2.2.5 Base genética da competência vetorial de *Aedes aegypti* a filarídeos

Como citado anteriormente, *Ae. aegypti* não é vetor natural de *W. bancrofti*, e a maioria das linhagens de laboratório e populações de campo são bastante refratárias ao desenvolvimento deste filarídeo. Apesar disso, uma linhagem de *Ae. aegypti* (Liverpool)

altamente susceptível à infecção por *B. malayi* e *W. bancrofti* foi selecionada em condições de laboratório (MACDONALD, 1962a, 1962b; MACDONALD; RAMACHANDRAN, 1965).

Estudos clássicos liderados por Macdonald foram os primeiros a demonstrar que a susceptibilidade a filarídeos em *Ae. aegypti* é determinada primariamente por um gene recessivo ligado ao sexo (f^m) localizado no cromossomo 1. Embora a refratariedade encontrada seja dominante sobre a susceptibilidade, penetrância incompleta pode ocorrer. Esses trabalhos também apontaram f^m como o gene primário que controla a susceptibilidade de *Ae. aegypti* a muitas espécies e a linhagens periódicas e sub-periódicas de filarídeos no músculo torácico, mas não à *Dirofilaria* sp., que exibe uma estratégia diferente de desenvolvimento (MACDONALD; RAMACHANDRAN, 1965). Esse fato sugere que, provavelmente, diferentes genes devem controlar o desenvolvimento de determinadas espécies, nos diversos tecidos.

Na década passada, a base genética molecular para susceptibilidade a filarídeos começou a ser investigada. Severson et al. (1994) identificaram dois QTLs, um no cromossomo 1 (*fsb1*), que provavelmente carrega o locus f^m , e o outro no cromossomo 2 (*fsb2*). Provavelmente, *fsb1* influencia a susceptibilidade de modo recessivo, enquanto *fsb2* parece afetar *fsb1* de modo aditivo. O efeito individual dos QTLs, incluindo as interações epistáticas, varia entre as populações de *Ae. aegypti*. Um QTL adicional (*idb1*), que é ligado a *fsb2*, influencia tanto a intensidade da infecção quanto a habilidade de penetração no epitélio intestinal (BEERNTSEN et al., 1995).

Embora o controle genético da susceptibilidade de *Ae. aegypti* a filarídeos tenha sido bem definido há mais de 40 anos, como abordado acima, os genes que controlam a susceptibilidade/refratariedade ou ambos ainda não foram identificados, e pouco é conhecido sobre seus produtos gênicos (WATTAM; CHRISTENSEN, 1992).

2.3 RT-PCR quantitativa para detectar expressão diferencial

O ensaio de PCR em tempo real é um método quantitativo capaz de monitorar passo-a-passo o progresso da PCR, ou seja, mede a quantidade de ácido nucléico alvo (DNA, RNA ou DNAc) durante cada ciclo de amplificação. Conseqüentemente, a informação é coletada durante o processo, a partir do momento em que a molécula alvo é detectada, não ao fim, após

um número fixo de ciclos (HEID et al., 1996; LOCKEY; OTTO; LONG, 1998). Esta técnica utiliza termocicladores capazes de detectar fluorescência, que amplificam e quantificam seqüências alvo-específicas simultaneamente. Dentre os kits comerciais disponíveis, destacam-se aqueles que empregam SYBR Green I, um corante fluorescente altamente específico que se liga ao DNA fita-dupla, detectando os produtos de PCR acumulados durante os ciclos. Como cada vez mais fragmentos são sintetizados ao longo da PCR, o resultado é o aumento da fluorescência, cuja intensidade é proporcional à quantidade de produto de PCR produzido durante a fase linear. Desse modo, SYBR Green I pode ser usado para monitorar a amplificação de qualquer seqüência de DNA fita-dupla e, como não requer o uso de sondas, facilita o planejamento dos ensaios e diminui seus custos. Sua principal desvantagem consiste na geração de sinais falso-positivos, devido à detecção de fragmentos inespecíficos e dímeros de *primers*.

A transcrição reversa seguida por PCR em tempo real ou RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) é uma poderosa ferramenta que pode amplificar e detectar transcritos de baixa abundância, RNA parcialmente degradado e amostras limitadas de tecido (FREEMAN; LEE; RICHARDSON, 1999; MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 1996). Essa técnica é empregada em vários estudos, como na análise do padrão de expressão diferencial em importantes processos fisiológicos e após tratamentos (BOGAN et al., 2008; MEADE et al., 2007) e na validação de ensaios com microarranjos (REYES; TIWARI; REYES, 2007; SABA; BOOTH, 2006). Entre suas vantagens, comparadas aos métodos convencionais, estão a alta sensibilidade e especificidade, boa reprodutibilidade e amplo intervalo de quantificação (PFAFFL, 2006).

2.3.1 Quantificação Absoluta e Quantificação Relativa

A Quantificação Absoluta (QA) e a Quantificação Relativa (QR) são dois diferentes métodos utilizados para analisar dados de qPCR. QA determina o número absoluto de cópias do transcrito de interesse, interpolando o sinal de PCR de amostras cuja concentração é desconhecida a uma curva padrão absoluta. Por exemplo, QA pode ser usada para correlacionar o número de cópias de um vírus com o estado de uma doença (SHAPSHAK et al., 2005). Nesse caso, o interesse é conhecer o número exato de cópias do ácido nucléico alvo em uma amostra biológica, a fim de monitorar o progresso de uma doença.

Em outras situações, é desnecessário determinar o número absoluto de cópias de um

transcrito, mas é importante registrar a mudança relativa na expressão gênica. Por exemplo, saber que um dado tratamento aumentou a expressão de um determinado gene em 2,5 vezes, em relação ao seu controle, é mais relevante do que saber que o tratamento aumentou a expressão desse gene de 1.000 para 2.500 cópias. Desse modo, QR ou quantificação comparativa analisa mudanças na expressão de um gene alvo em uma amostra biológica em relação a um grupo de referência, como um controle não tratado ou uma amostra no tempo zero em um estudo realizado ao longo do tempo.

QR não requer curva de calibração e a amostra de referência pode ser qualquer transcrito, conquanto sua sequência seja conhecida. As unidades usadas para expressar as quantidades relativas são irrelevantes, e elas podem ser comparadas entre muitos experimentos (PFAFFL, 2006). Este método pode ser aplicado para investigar pequenas mudanças fisiológicas na expressão gênica, como na resposta a um agente tóxico (VAHIDNIA et al., 2007).

Com a finalidade de padronizar a quantidade da amostra de RNA ou DNA adicionada à reação, executa-se a amplificação de um gene de expressão constitutiva ou gene de referência (controle endógeno), que pode ser co-amplificado no mesmo tubo, em um ensaio multiplex, ou ser amplificado em um tubo separado (PFAFFL, 2006). Alguns exemplos desses genes de referência são: β -actina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e RNA ribossomal.

2.3.2 O Método Comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Existem dois diferentes métodos para o cálculo da QR: o Método da Curva Padrão Relativa e o Método Comparativo C_T . Apesar da aparente diversidade, ambos os métodos podem gerar resultados equivalentes, e a escolha por qualquer um deles dependerá do desenho experimental de cada pesquisador e de suas possibilidades de trabalho.

No Método da Curva Padrão Relativa, a quantidade da amostra é expressa em relação a um padrão, como um calibrador (“grupo não tratado”). Para todas as amostras experimentais, a quantidade do gene de interesse (ou alvo) é determinada a partir da curva padrão e dividida pela quantidade do calibrador. Assim, o calibrador torna-se a amostra 1x, e a amostra de interesse é expressa como n-vezes a diferença relativa ao calibrador. Desse

modo, este método apenas requer que as diluições relativas da amostra padrão sejam conhecidas (PFAFFL, 2006).

O Método Comparativo C_T é similar ao Método da Curva Padrão, exceto pelo uso de fórmulas aritméticas para atingir o mesmo resultado. O *cycle threshold*, ou C_T , corresponde ao número de ciclos no qual a fluorescência gerada pela reação é detectada acima do background e ele está inversamente correlacionado ao logaritmo do número inicial de cópias de ácido nucleico. A quantidade da molécula alvo (gene de interesse), normalizada para um gene de referência (controle endógeno) e depois comparada a um calibrador é dada por $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Como a expressão desse gene de referência não muda entre diferentes amostras, a razão entre dois produtos de PCR variará exclusivamente de acordo com o nível de expressão gênica do gene alvo. Para a validação desse método, assume-se que as eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno sejam similares (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar das intensas pesquisas e tentativas de controle de vetores, doenças como malária, febre amarela, dengue, Doença de Chagas e filariose linfática permanecem como sérios problemas de saúde pública. Dentre os fatores apontados como responsáveis por essa situação estão a resistência de parasitas a drogas e de mosquitos a inseticidas, o crescimento urbano descontrolado e a deterioração das condições sócio-econômicas da população humana. A dinâmica de uma determinada doença transmitida por vetores na natureza depende, em parte, da competência vetorial. Na última década, a criação de mosquitos geneticamente modificados capazes de resistir a parasitas e, conseqüentemente, reduzir a transmissão de doenças, tem sido apontada como uma estratégia alternativa ao controle vetorial. Apesar de sua enorme importância, os processos co-evolucionários que envolvem as interações mosquito/parasita são pouco entendidos.

Entender as interações vetor/parasita no modelo *Aedes aegypti/Wuchereria bancrofti* é importante, uma vez que os mecanismos imunes empregados por um mosquito refratário ao filarídeo podem não ser detectados em espécies susceptíveis. É possível que, no caso de vetores competentes, o parasita tenha desenvolvido mecanismos capazes de manipular a imunidade do inseto, como conseqüência dos processos co-evolutivos entre parasita e hospedeiro. Programas de controle vetorial que dependem da manipulação genética dos vetores, requerem o entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos básicos que regulam as interações entre tais organismos. Dessa forma, a identificação e caracterização de genes e produtos gênicos envolvidos na resposta imune de vetores contra patógenos é crucial, uma vez que esses são candidatos potenciais a serem utilizados em estratégias que limitam o desenvolvimento de parasitas transmitidos por insetos.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Existe expressão diferencial de genes que codificam peptídeos antimicrobianos de *Aedes aegypti* em resposta à infecção por *Wuchereria bancrofti*?

5 HIPÓTESE

Genes codificadores de peptídeos antimicrobianos em *Aedes aegypti* infectados por *Wuchereria bancrofti* exibem expressão diferencial.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão diferencial de genes que codificam peptídeos antimicrobianos entre *Aedes aegypti* infectado e não infectado com *Wuchereria bancrofti*.

6.2 Objetivos Específicos

- a) Comparar o desenvolvimento de *W. bancrofti* em *Ae. aegypti* com o desenvolvimento no vetor natural *Culex quinquefasciatus*.
- b) Avaliar a expressão temporal dos genes defensina, cecropina e transferrina nos mosquitos *Ae. aegypti* infectados com *W. bancrofti*.
- c) Relacionar a expressão dos genes defensina, cecropina e transferrina em *Ae. aegypti* com a infecção por *W. bancrofti*.
- d) Associar os níveis de expressão dos genes defensina, cecropina e transferrina com o bloqueio do desenvolvimento de *W. bancrofti* em *Ae. aegypti*.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os trabalhos experimentais, cujas metodologias encontram-se descritas a seguir, foram desenvolvidos no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz - CPqAM/FIOCRUZ, no período de março de 2006 a janeiro de 2008.

7.1 Colônias de mosquitos

Para a realização dos experimentos de infecção via alimentação sanguínea artificial, foram utilizadas as linhagens de laboratório *Aedes aegypti* Rec Lab e *Culex quinquefasciatus* CqSF, provenientes de indivíduos coletados em áreas endêmicas para filariose bancroftiana, na Região Metropolitana do Recife. Estas colônias de mosquitos são mantidas no insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz - CPqAM/FIOCRUZ há mais de 10 anos. Adultos foram acondicionados em gaiolas (30 cm x 30 cm x 30 cm), sob condições de biossegurança, em laboratório de nível 2, em ambiente interno ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) com $85 \pm 10\%$ de umidade relativa, em um fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro) e alimentadas com solução de sacarose 10% (m/v).

7.2 Infecção via alimentação sanguínea artificial

Amostras individuais de 5 ml de sangue venoso foram obtidas de voluntários humanos portadores de filariose linfática residentes na Região Metropolitana do Recife, após a assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). As coletas foram realizadas entre às 23:00 e 24:00 horas e as amostras foram acondicionadas em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA (1 mg/ml) como anticoagulante e mantidas a 4°C até a manhã seguinte, quando era determinada sua microfilaremia. A microfilaremia (mf/ml) foi estimada pela contagem do número de microfilárias observadas em microscópio óptico a partir de $10 \mu\text{l}$ da amostra sanguínea. As lâminas foram preparadas em triplicata. Amostras sanguíneas com diferentes densidades de microfilárias foram usadas no trabalho (300, 700 e 1900 mf/ml).

A alimentação sangüínea artificial foi conduzida em fêmeas nulíparas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, segundo Albuquerque et al. (1999). As fêmeas de *Ae. aegypti* Rec Lab e *Cx. quinquefasciatus* apresentavam-se com 4 a 7 dias de emergência. Grupos de mosquitos, cuja alimentação de sacarose foi retirada 24h antes, foram alimentados durante aproximadamente uma hora com sangue humano infectado com *Wuchereria bancrofti*, aquecido em banho-maria circulante a 37°C, por meio de alimentadores de vidro cobertos por membrana de intestino de porco hidratada em solução salina (PBS, “Phosphate Buffered Saline” – NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,25 g/l, pH 7,4). A fim de evitar a agregação das microfilárias, o sangue foi agitado periodicamente com um bastão de metal adaptado. A área de superfície da mamadeira foi hidratada continuamente em PBS, a fim de manter sua flexibilidade. A figura 5 ilustra o sistema de alimentação artificial utilizado.



Figura 5 - Visualização do esquema de alimentação artificial das fêmeas de *Aedes aegypti* com sangue humano e membrana suína.
Fonte: Foto da autora.

Imediatamente após o repasto sangüíneo, o percentual de infecção foi estimado pela dissecação de dez fêmeas ingurgitadas para cada linhagem de mosquito. O intestino destes mosquitos, contendo o sangue ingerido, foi macerado sob lâmina com uma gota de PBS, coberto com lamínula e visualizado em microscópio óptico para detectar a presença da microfilária de *W. bancrofti*. Grupos controle (negativo) foram alimentados com sangue humano não infectado pelo filarídeo, obtido de doadores habitantes de área não endêmica, também após a assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). Apenas

as fêmeas ingurgitadas foram utilizadas nos experimentos e mantidas no insetário durante o período necessário, sob as condições previamente descritas.

Para este trabalho, três infecções foram realizadas. A primeira infecção foi realizada com uma microfilaremia de 1900 mf/ml, e os mosquitos alimentados foram usados apenas em experimentos de qRT-PCR e PCR para detecção de *W. bancrofti*, pois um baixo número de fêmeas ingurgitadas foi obtido, portanto, em quantidade insuficiente para as observações por microscopia óptica. Na segunda infecção, sangue com parasitemia de 300 mf/ml foi usado para alimentar os mosquitos, mas só foram coletadas fêmeas para observação microscópica. Para a terceira infecção, mosquitos foram alimentados com sangue cuja parasitemia foi igual a 700 mf/ml, e as fêmeas alimentadas foram usadas em experimentos de qRT-PCR, PCR para detecção de *W. bancrofti* e microscopia óptica. As fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* foram alimentadas com o mesmo sangue infectado usado para *Ae. aegypti*. Em cada infecção, o número de fêmeas alimentadas variou de 100 a 500 por grupo (experimental e controle).

Para os experimentos de qRT-PCR, foram coletados três *pools*, cada um contendo cinco fêmeas de *Ae. aegypti* Rec Lab, tanto do grupo infectado quanto do grupo controle, nos tempos: 2h, 24h, 48h, 72h e sete dias pós-alimentação (1ª e 3ª infecções). Para os experimentos de PCR com *primers* específicos para *W. bancrofti*, dez mosquitos do grupo infectado e dez do grupo não infectado foram coletados 24h pós-alimentação (1ª e 3ª infecções). Todo o material coletado foi armazenado a – 80°C até a extração de DNA genômico ou RNA total.

Para as observações microscópicas, grupos de cinco a dez fêmeas das linhagens de laboratório *Ae. aegypti* Rec Lab e *Cx. quinquefasciatus* CqSF foram coletados diariamente, ao longo de 10 (2ª infecção) ou 15 dias (3ª infecção) pós-alimentação.

7.3 Microscopia óptica

Fêmeas dos mosquitos *Ae. aegypti* Rec Lab e *Cx. quinquefasciatus* CqSF foram dissecadas diariamente, à fresco, para comparação do desenvolvimento de *W. bancrofti*. A espécie *Cx. quinquefasciatus* foi utilizada como controle positivo ou padrão da infecção, uma vez que é vetor natural de *W. bancrofti*.

A cabeça, o tórax e o abdômen das fêmeas foram macerados separadamente com uma gota de PBS e montados a fresco sob lâmina/lamínula, visualizados e documentados em

microscópio óptico (Coleman Modelo N200) acoplado à câmera digital (SAMSUNG SDC-415) para avaliar a presença, o estágio e o movimento de *W. bancrofti*. As observações foram realizadas sob microscópio com aumentos de 100 e 400 vezes.

A taxa de infecção diária foi estimada pela porcentagem de mosquitos contendo microfilária na cabeça, tórax e/ou abdômen. A taxa de migração correspondeu à porcentagem de microfilárias que migraram para o tórax do total visualizado, enquanto a carga parasitária no tórax foi estimada pela razão entre o número de microfilárias encontradas no tórax e o número total de mosquitos positivos. Os filarídeos foram classificados de acordo com Schacher (1962) e denominados de microfilária (mf), primeiro estágio larval jovem (L1) e primeiro estágio larval salsichóide (L1 salsichóide), segundo estágio larval (L2) e terceiro estágio larval ou larva infectiva (L3).

7.4 Extração de DNA total

Extrações de DNA genômico foram realizadas para obtenção de ácido nucléico de *Ae. aegypti/W. bancrofti* a ser utilizado na detecção molecular da porcentagem de infecção dos mosquitos *Ae. aegypti*.

A extração de DNA total das fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas e não infectadas com *W. bancrofti* foi realizada segundo o protocolo de Ayres et al. (2002). Os mosquitos foram macerados individualmente em 400 µl de tampão de lise (NaCl 0,4 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 2mM, pH 8,0), 7 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 72 µl de SDS 10% em microtubos de 1,5 ml. O macerado foi incubado à temperatura de 65°C overnight e, após esse período, 420 µl de NaCl 5M foram adicionados à suspensão. A mistura foi homogeneizada por 1 minuto, seguida de centrifugação a 13.200 RPM por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2,0 ml, no qual seu DNA foi precipitado pela adição de 800 µl de isopropanol e incubado a -20°C por 1 hora. Em seguida, foi centrifugado a 13.200 RPM por 20 minutos. O isopropanol foi descartado e o precipitado de DNA (*pellet*) foi lavado com 400 µl de etanol 70%. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13.200 RPM durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e secou-se o *pellet* em concentrador a vácuo. O DNA foi ressuscitado em 200 µl de TE (TRIS-EDTA, 1:10 mM) e armazenado a -20°C.

Para a observação da qualidade do DNA extraído, foi realizada corrida de eletroforese horizontal submersa em tampão TBE (Tris 0,089 M, Ácido Bórico 0,0089 M e EDTA 0,002 M, pH 8,3) a 120V, durante 30 minutos, em gel de agarose 0,8%, e corado com solução de brometo de etídio (5 mg/ml). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e os géis foram fotografados com câmara digital (Launch DocItLS Software®). A concentração de DNA foi estimada pela comparação com padrões eletroforéticos conhecidos do marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

7.5 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detecção de *Wuchereria bancrofti*

Os experimentos de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) foram realizados segundo Bockarie, M.J. et al. (2000), utilizando os *primers* NV1 (5′-CGTGATGGCATCAAA-3′) e NV2 (5′-CCCTCACTTACCATA-3′), descritos por Zhong et al. (1996). Esse par de *primers* amplifica a região *SspI* de *W. bancrofti*, constituída por DNA repetitivo, produzindo um fragmento de 188 pares de bases (pb). Cada tubo de reação consistiu em um volume final de 25 µl, utilizando-se a seguinte mistura: 2,5 µl de tampão 10x para Taq DNA polimerase (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM e 0,1% de Triton® X-100); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 200 pmol de cada *primer*; 2,5 U de Taq DNA polimerase (PROMEGA) e 20 ng de DNA molde de cada indivíduo. A amplificação foi realizada em um Termociclador BIOMETRA® T3000. O programa consistiu de um passo inicial de desnaturação a 92°C por 5 minutos e 40 ciclos a 92°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido por um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em tampão TBE, a 120V, durante 50 minutos, em gel de agarose 1,5%, corado com solução de brometo de etídio (5 mg/ml). As bandas foram visualizadas em transluminador de ultravioleta e os géis fotografados com câmara digital (Launch DocItLS Software®). O fragmento de 188 pb foi identificado pela comparação com padrões conhecidos do marcador de peso molecular DNA Ladder® 100 pb (Invitrogen). Para cada grupo de reações, foram realizados controles positivos e controles negativos. O controle positivo consistiu da mistura de reação (*mix*) mais extrato de DNA de *Ae. aegypti* conhecidamente infectado com *W. bancrofti*. Já os controles negativos foram de dois tipos: o primeiro consistiu do *mix* mais amostra de DNA de *Ae.*

aegypti alimentado com sangue humano não infectado com *W. bancrofti* e o segundo foi realizado com todos os componentes do *mix*, exceto DNA molde, com o intuito de checar a possibilidade de contaminação dos reagentes.

7.6 Extração de RNA total

O RNA total de cada *pool* foi extraído usando o RNAspin Mini RNA Isolation Kit® (GE Healthcare), segundo as recomendações do fabricante. Após a recuperação do RNA, as amostras foram adicionalmente tratadas com DNase (USB) a fim de garantir a remoção total de DNA genômico. A concentração e a qualidade das amostras do RNA isolado foram avaliadas por espectrofotometria aos níveis de absorbância de 260 e 280 nm (ULTROSPEC 2100 Pro).

7.7 Desenho dos *primers* para defensina, cecropina e transferrina de *Aedes aegypti*

Para o gene defensina de *Ae. aegypti*, foram desenhados *primers* que amplificam um fragmento de 96 pb localizado na região conservada da sequência *defA* publicada por Cho et al. (1996). São eles: 5'-GCCACCTGTGATCTGCTGAGCGGA-3' (*forward* - *Fw*) e 5'-GGAGTTGCAGTAGCCTCCCCGAT-3' (*reverse* - *Rv*). Os *primers* para o gene cecropina de *Ae. aegypti* foram desenhados para amplificar um fragmento de 125 pb, de acordo com a sequência publicada por Lowenberger et al. (1999a), e são: 5'-ATTTCTCCTGATCGCCGTGGCTG-3' (*Fw*) e 5'-GAGCCTTCTCGGCGGCATTGAA-3' (*Rv*). *Primers* foram desenhados para amplificar um fragmento de 109 pb do gene transferrina de *Ae. aegypti* segundo a sequência publicada por Yoshiga et al. (1997): 5'-CGGCCAGCTGGAGGATAACATTG-3' (*Fw*) e 5'-CGCTTTGAACTCGCCGAACATCTC-3' (*Rv*). *Primers* que amplificam um fragmento de 122 pb do transcrito ribossomal *rpL8* (LAN; FALLON, 1992) também foram desenhados e usados como controle endógeno nas reações de qRT-PCR. São eles: 5'-TGGGGCGTGTTATTCGTGCACAG-3' (*Fw*) e 5'-CAGGTATCCGTGACGTTCCGGCA-3'

(Rv). Todos os *primers* foram desenhados usando o software FastPCR[®].

7.8 Reações RT-PCR (Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase)

Com a finalidade de checar a especificidade dos fragmentos obtidos a partir dos *primers* desenhados na etapa anterior, foram realizadas reações de RT-PCR.

As reações de transcrição reversa (RT, “Reverse Transcription”) foram realizadas conforme as recomendações do Kit AMVCloned (Invitrogen[®]). Para cada 1 a 2 µg de RNA total, foram adicionados 1 µL de *primer* oligo dT, 2 µL de dNTPs (10 mM de cada dNTP) e 8 µL de água DEPC. Estas amostras foram incubadas a 65°C durante 5 minutos e, posteriormente, foram acondicionadas em gelo. Em seguida, foram acrescentados 4 µL de tampão de síntese de DNAc 5x, 1 µL DTT 0,1 M, 1 µL de inibidor de RNase e 1 µL da transcriptase reversa aos tubos de reação, e as amostras foram incubadas a 45°C durante 60 minutos. Após a RT, cada reação de PCR foi conduzida em um volume final de 25 µL, segundo as recomendações do kit RED Taq[™] ReadyMix[®] (SIGMA). Para cada amostra, foram adicionados 10 ng de DNAc e 0,5 µM de cada *primer*. As amostras foram amplificadas em um termociclador BIOMETRA[®] T3000 programado para as seguintes condições: uma etapa de desnaturação a 94°C por 2 min; seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 62°C por 1 min, 72°C por 1 min; e uma etapa final de 72°C por 10 min.

Os fragmentos foram separados por eletroforese em tampão TBE, a 120V, durante 50 minutos, em gel de agarose 2,0%, corado com solução de brometo de etídio (5 mg/ml). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e os géis fotografados com câmara digital (Launch DocItLS Software[®]). Os tamanhos das bandas foram estimados pela comparação com padrões conhecidos do marcador de peso molecular DNA Ladder[®] 100 pb (Invitrogen). A possibilidade de contaminação foi verificada por controles negativos realizados em cada experimento. Estes incluíam todos os reagentes descritos acima, exceto o DNAc molde. Os produtos da amplificação foram purificados com o GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit[®] (Invitrogen) e, em seguida, quantificados em espectrofotômetro a partir da leitura da absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (ULTROSPEC 2100 Pro).

7.9 Clonagem e reação de seqüenciamento

Os fragmentos obtidos por PCR foram seqüenciados, a fim de confirmar sua identidade. Para isso, eles foram clonados em um vetor pGEM-T Easy[®] (Promega), segundo os protocolos recomendados pelo fabricante. Plasmídeos recombinantes foram introduzidos em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* One Shot[®] TOP10 (Invitrogen) por transformação através de choque térmico, e as células foram semeadas em placas com meio de cultura Luria Bertani (LB), contendo ampicilina 100 µg/ml (LB/Amp). Cinco colônias transformantes foram repicadas em uma nova placa de LB/Amp e, usando a mesma ponteira de repique, foram inseridas em tubos contendo *mix* de PCR (RED Taq[™] ReadyMix[®]/SIGMA) e *primers* específicos para a seleção de colônias que continham o inserto. Após verificação dos insertos por eletroforese, uma colônia positiva de cada gene foi inoculada em 2 ml de meio LB/Amp (100 µg/ml) líquido e incubada overnight à 37°C a 250 RPM. Os plasmídeos foram purificados usando o QIAprep Spin Miniprep[®] Kit (QIAGEN). O seqüenciamento desses clones foi realizado no seqüenciador automático ABI PRISM[®] 3100 (Applied Biosystems/HITACHI), usando os *primers* universais M13F e M13R, compatíveis com o vetor pGEM T-Easy. As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e pelo programa DNASTAR.

7.10 Reações de RT-PCR em Tempo Real e Análise da Expressão Relativa

O nível de expressão dos transcritos de proteína/peptídeos antimicrobianos em fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com *W. bancrofti* foi analisado por RT-PCR quantitativa nos seguintes tempos pós-infecção: 2h, 24h, 48h, 72h e 7 dias. Todas as amostras de RNA foram normalizadas a uma determinada concentração (50 ng/µl). O kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR[®] (QIAGEN) foi usado nas reações qRT-PCR *one-step*. Cada reação continha SYBR Green Mix, transcriptase reversa, 100 ng de RNA molde, 0,5 µM de *primer Fw* e 0,5 µM de *primer Rv* (exceto os *primers* da cecropina, cuja concentração foi de 1 µM cada), em um volume final de 20 µl. As amplificações com o controle endógeno *rpL8* foram realizadas da mesma forma, só que em tubos separados em relação aos genes estudados. As amostras foram

amplificadas no termociclador Mini Opticon System for Real-Time PCR Detection® (BIORAD). O programa de PCR foi o seguinte: uma etapa inicial a 50°C por 30 minutos que permitiu a transcrição reversa; outra etapa de 15 minutos a 95°C para ativar a Taq polimerase seguida por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Controles negativos foram incluídos para detectar contaminação dos reagentes (*mix* sem molde de RNA) e presença de DNA genômico não removido pelo tratamento com DNase (*mix* sem transcriptase reversa). A especificidade da PCR foi checada após a amplificação, pela análise das curvas de dissociação dos produtos de PCR.

A expressão relativa do RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O primeiro passo consistiu na normalização dos valores de C_T de cada amostra, ou seja, na obtenção do ΔC_T ($C_{T, \text{alvo}} - C_{T, \text{rpL8}}$). Este foi calculado pelo C_T da amplificação com os *primers* do controle endógeno (*rpL8*) subtraído do C_T da amplificação com os *primers* do gene de interesse (defensina, cecropina ou transferrina). O $\Delta\Delta C_T$ foi obtido, então, pelo ΔC_T de amostras não infectadas subtraído do ΔC_T de amostras infectadas [$(C_{T, \text{alvo}} - C_{T, \text{rpL8}})_{\text{tratado}} - (C_{T, \text{alvo}} - C_{T, \text{rpL8}})_{\text{controle}}$]. Para cada intervalo, a média do $\Delta\Delta C_T$ dos três *pools* das amostras infectadas e das amostras não infectadas foi usada para calcular a expressão relativa entre os transcritos de amostras infectadas e de amostras não infectadas ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). As eficiências da amplificação dos genes de interesse e do controle endógeno foram similares, ou seja, o valor absoluto da inclinação da reta, representado pelo log da massa da amostra (ng) *versus* seu C_T foi próximo de zero. Em todos os casos, as amostras foram avaliadas em duplicata.

7.11 Considerações Éticas

Este trabalho é um sub-projeto do projeto principal intitulado “Resposta imune de *Aedes aegypti* à infecção por *Wuchereria bancrofti*”, coordenado pela Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães sob o número CAAE: 0036.0.095.000-07 (Anexo C).

As amostras de sangue humano que foram utilizadas para a infecção artificial de fêmeas dos mosquitos foram cedidas pela Dra. Constância Ayres, de acordo com a carta de anuência (Anexo D). O sangue foi coletado de voluntários, após a assinatura do respectivo

termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme os indivíduos possuísem (Anexo A) ou não (Anexo B) o verme da filária no sangue, sendo garantido o sigilo de identidade dos sujeitos da pesquisa. Todas as amostras sanguíneas foram entregues aos operadores apenas no momento da alimentação artificial, e empregadas apenas para essa finalidade. Dessa forma, o sangue ou o soro dos pacientes não foram armazenados para realização de estudos futuros.

8 RESULTADOS

8.1 Desenvolvimento de *Wuchereria bancrofti* em *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*

Um dia após a infecção artificial, a taxa média de migração das microfilárias de *Wuchereria bancrofti* para o tórax de *Aedes aegypti* Rec Lab foi de 85,7% (71,4% e 100%) e, em *Culex quinquefasciatus* CqSF, a migração foi mais lenta, com média de 33,5% (0 e 67%). No quarto dia pós-infecção, 100% das larvas ingeridas já haviam alcançado o tórax em ambas as espécies (Tabelas 1 e 2). A maioria dos mosquitos estava infectada com apenas uma larva, e o número máximo de vermes encontrados por indivíduo foi igual a quatro. Em geral, a carga parasitária foi maior em *Ae. aegypti* do que em *Cx. quinquefasciatus* (Tabelas 3 e 4).

Em *Cx. quinquefasciatus*, microfilárias foram observadas no primeiro dia pós-infecção, e apenas vermes L1 (Figura 6A) foram registrados no dia seguinte (Tabelas 3 e 4). No quarto dia pós-infecção, todos os vermes eram L1 salsichóides (Tabelas 3 e 4) e a maioria destes foi encontrada até o dia sete (Tabelas 3 e 4; Figura 6E). Do nono ao décimo terceiro dia, foram visualizadas filárias L2, todas no tórax (Tabelas 1-4; Figuras 6F a 6H). Finalmente, no décimo quinto dia, foram observados apenas filarídeos L3 no tórax e na cabeça (Tabelas 1-4; Figuras 6I e 6J).

Do mesmo modo que no mosquito *Cx. quinquefasciatus*, todos os vermes observados em *Ae. aegypti* encontravam-se no estágio de microfilária no primeiro dia pós-infecção (Tabelas 3 e 4). No segundo dia, *W. bancrofti* foi observada como microfilária ou L1 (Figura 7A). Quatro dias pós-infecção, poucas filárias L1 salsichóides foram registradas, sendo a maioria L1 (Tabelas 3 e 4; Figuras 7C e 7D). Além disso, vermes L1 salsichóides visualizados em *Ae. aegypti* apresentaram aparência muito diferente daqueles encontrados em *Cx. quinquefasciatus* (Figuras 7G e 7B). Após o quarto dia, *W. bancrofti* permaneceu no estágio L1 ou L1 salsichóide em *Aedes aegypti* (Figuras 7F a 7J), com exceção de uma microfilária visualizada no quinto dia (Figura 7E), e todas as larvas estavam alojadas no tórax do mosquito (Tabelas 1 e 2).

Em ambas as espécies, a maioria das microfilárias apresentou movimento ativo do tipo “serpente”. Em *Cx. quinquefasciatus*, L1 movimentou-se lentamente, enquanto a maioria dos vermes em *Ae. aegypti* não mostrou qualquer movimento. Quando presente, os movimentos de L1 salsichóide foram discretos em ambas as espécies de mosquitos. A maioria

dos vermes L2 apresentou movimento lento em *Cx. quinquefasciatus*, e L3 apresentou movimento muito ativo (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Distribuição de larvas de *Wuchereria bancrofti* (com ou sem movimento) na cabeça, tórax e abdômen de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* ao longo de 10 dias pós-alimentação em sangue infectado (Parasitemia = 300 mf/ml). Observações de tecido fresco em microscopia óptica.

Espécies	Dias pós-infecção	% filárias no abdômen	% filárias no tórax	% filárias na cabeça	% filárias com movimento	% filárias sem movimento
<i>Aedes aegypti</i> (Rec Lab)	1	28,6	71,4	0	100	0
	2	33	67	0	77,8	22,2
	4	0	100	0	100	0
	5	0	100	0	50	50
	6	0	100	0	50	50
	7	0	100	0	33	67
	10	0	100	0	0	100
<i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSF)	1	100	0	0	50	50
	2	60	40	0	40	60
	4	0	0	0	0	0
	5	0	100	0	100	0
	6	0	0	0	0	0
	7	0	100	0	50	50
	10	0	100	0	100	0

Fonte: Dados da autora.

Tabela 2 - Distribuição de larvas de *Wuchereria bancrofti* (com ou sem movimento) na cabeça, tórax e abdômen de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* ao longo de 15 dias pós-alimentação em sangue infectado (Parasitemia = 700 mf/ml). Observações de tecido fresco em microscopia óptica.

Espécies	Dias pós-infecção	% filárias no abdômen	% filárias no tórax	% filárias na cabeça	% filárias com movimento	% filárias sem movimento
<i>Aedes aegypti</i> (Rec Lab)	1	0	100	0	100	0
	2	0	100	0	100	0
	4	0	100	0	75	25
	5	0	100	0	37,5	62,5
	7	0	100	0	33	67
	9	0	100	0	0	100
	11	0	100	0	0	100
	13	0	100	0	0	100
	15	0	100	0	0	100
<i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSF)	1	33	67	0	83,4	16,6
	2	100	0	0	0	100
	4	0	100	0	0	100
	5	0	100	0	100	0
	7	0	100	0	100	0
	9	0	100	0	100	0
	11	0	100	0	83,4	16,6
	13	0	100	0	100	0
	15	0	33	67	100	0

Fonte: Dados da autora.

Tabela 3 - Porcentagem de mosquitos infectados com *Wuchereria bancrofti* segundo o estágio do desenvolvimento, ao curso de 10 dias pós-infecção. Observações de tecido fresco em microscopia óptica (Parasitemia = 300 mf/ml).

Espécies	Dias pós-infecção	% mosquitos infectados (n ^a)	Carga parasitária	% mf/L1	% L1 salsichóide	% L2	% L3
<i>Aedes aegypti</i> (Rec Lab)	1	60 (10)	1.2	100	0	0	0
	2	40 (10)	2	100	0	0	0
	4	20 (10)	1.5	33	67	0	0
	5	20 (10)	1	100	0	0	0
	6	20(10)	1	50	50	0	0
	7	30 (10)	1.5	100	0	0	0
	10	20 (10)	1	50	50	0	0
<i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSF)	1	50 (10)	1.2	100	0	0	0
	2	25 (10)	1.5	100	0	0	0
	4	0 (10)	0	0	0	0	0
	5	10 (10)	1	0	100	0	0
	6	0 (10)	1	0	0	0	0
	7	20 (10)	1	0	100	0	0
	10	20 (10)	1	0	50	50	0

Fonte: Dados da autora.

Nota: ^a Número total de mosquitos analisados.**Tabela 4** - Porcentagem de mosquitos infectados com *Wuchereria bancrofti* segundo o estágio do desenvolvimento, ao curso de 15 dias pós-infecção. Observações de tecido fresco em microscopia óptica (Parasitemia = 700 mf/ml).

Espécies	Dias pós-infecção	% mosquitos infectados (n ^a)	Carga parasitária	% mf/L1	% L1 salsichóide	% L2	% L3
<i>Aedes aegypti</i> (Rec Lab)	1	80 (5)	1.75	100	0	0	0
	2	40 (5)	1.5	100	0	0	0
	4	80 (5)	2	87	13	0	0
	5	60 (6)	1.5	89	11	0	0
	7	40 (5)	1.5	100	0	0	0
	9	40 (5)	1	100	0	0	0
	11	20 (5)	1	100	0	0	0
	13	30 (7)	1	50	50	0	0
	15	10 (10)	1	100	0	0	0
<i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSF)	1	80 (5)	1.5	100	0	0	0
	2	20 (5)	1	100	0	0	0
	4	20 (5)	1	0	100	0	0
	5	40 (7)	1.5	0	100	0	0
	7	60 (4)	1	0	100	0	0
	9	33 (6)	1.5	0	0	100	0
	11	80 (5)	1.5	0	0	100	0
	13	20 (5)	1	0	0	100	0
	15	33 (6)	1.5	0	0	0	100

Fonte: Dados da autora.

Nota: ^a Número total de mosquitos analisados.

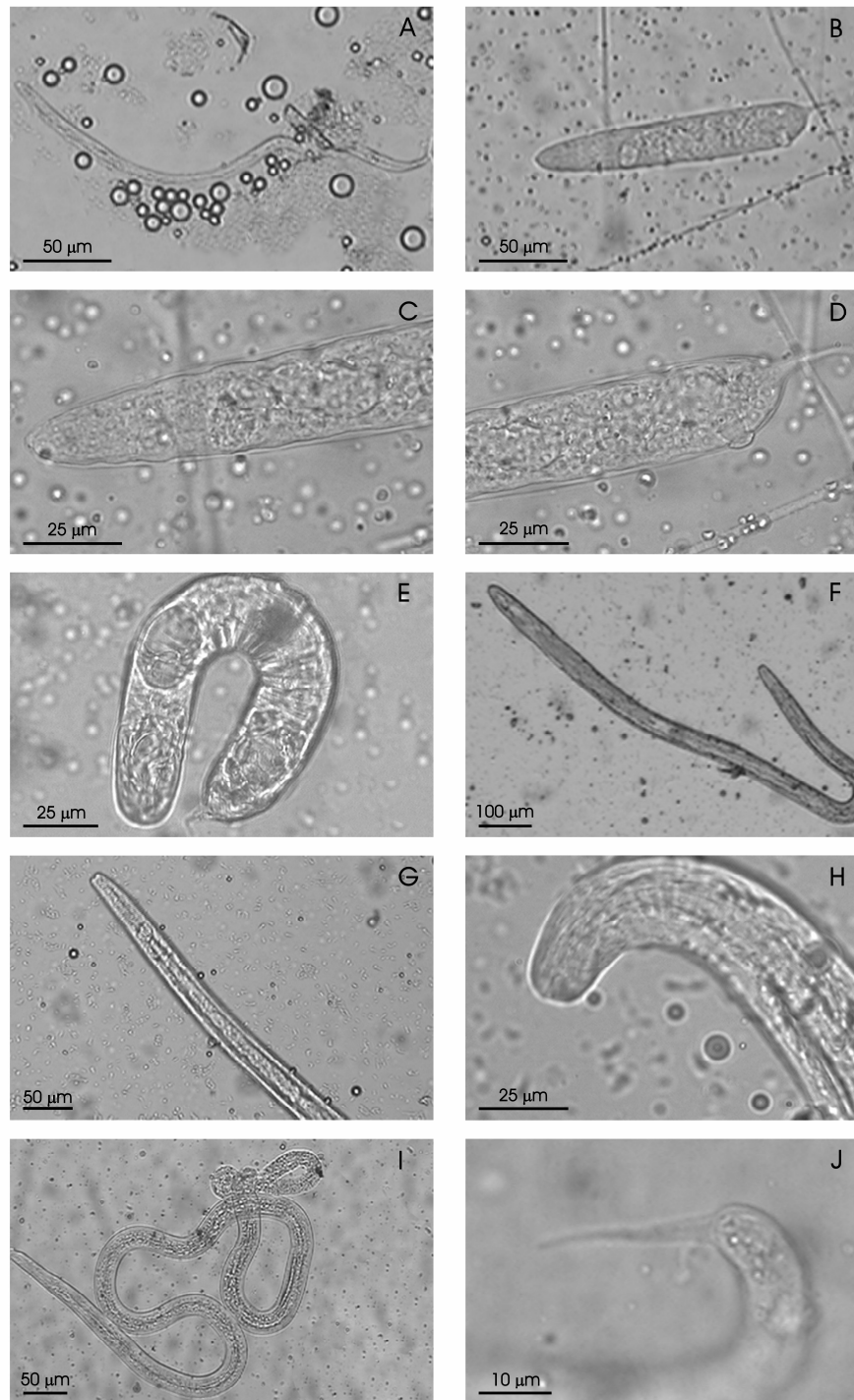


Figura 6 - Desenvolvimento de *Wuchereria bancrofti* em *Culex quinquefasciatus*. A: L1 dois dias pós-infecção (PI); B: L1 salsichóide cinco dias PI; C: extremidade anterior de L1 salsichóide cinco dias PI; D: extremidade posterior de L1 salsichóide cinco dias PI; E: L1 salsichóide sete dias PI; F: L2 treze dias PI; G: detalhe da extremidade anterior de L2 treze dias PI; H: detalhe da extremidade posterior de L2 treze dias PI; I: L3 quinze dias PI; J: detalhe da extremidade posterior de L3 quinze dias PI.

Nota: Amostras foram observadas à fresco em microscopia óptica e sem uso de corantes.

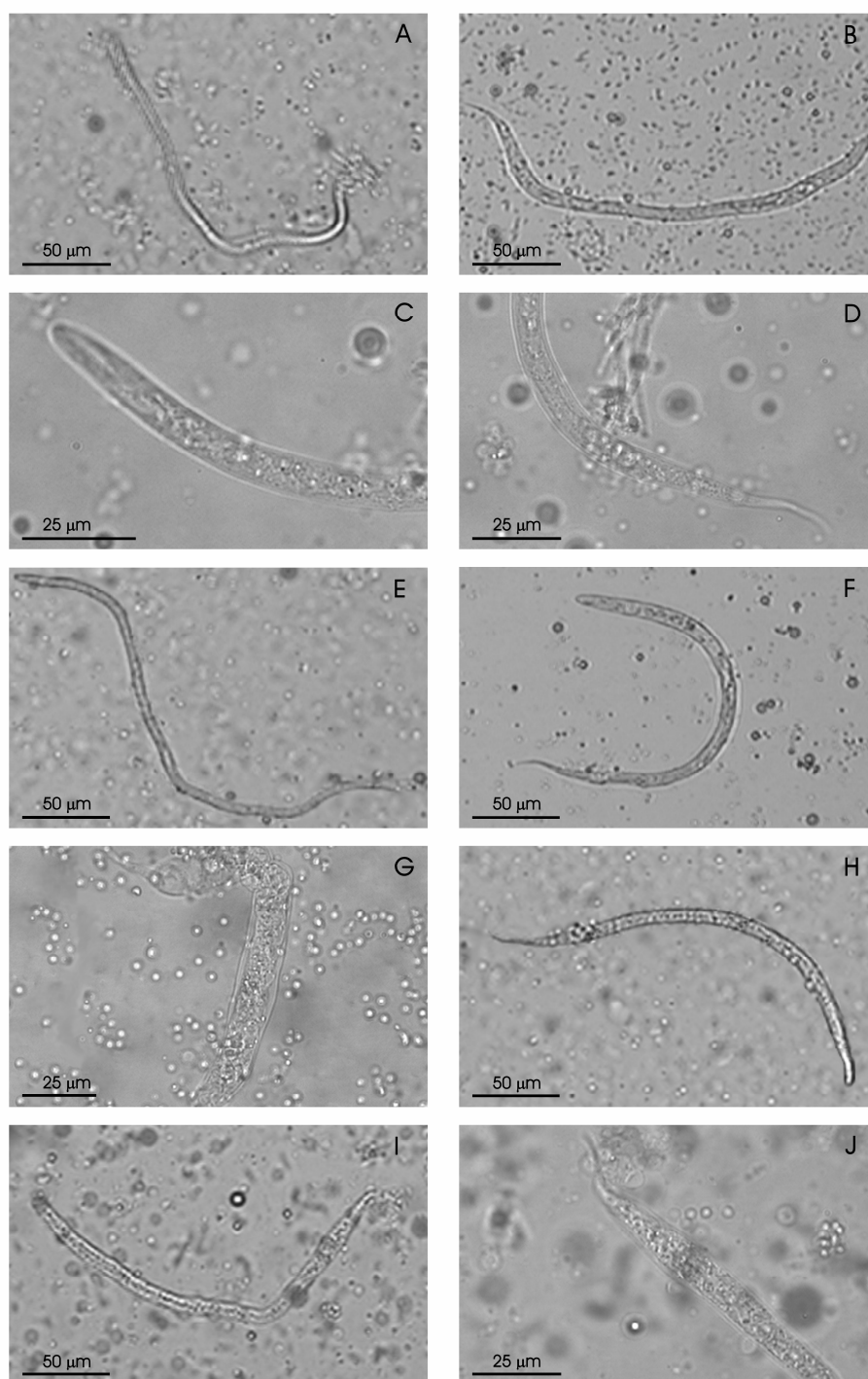


Figura 7 - Desenvolvimento de *Wuchereria bancrofti* em *Aedes aegypti*. A: microfilária dois dias pós-infecção (PI); B: L1 dois dias PI; C: extremidade anterior de L1 quatro dias PI; D: extremidade posterior de L1 quatro dias PI; E: microfilária cinco dias PI; F: L1 cinco dias PI; G: L1 salsichóide cinco dias PI; H: L1 sete dias PI; I: L1 treze dias PI; J: extremidade posterior de L1 treze dias PI.

Nota: Amostras foram observadas à fresco em microscopia óptica e sem uso de corantes.

Na terceira infecção (parasitemia sanguínea de 300 mf/ml), foi registrada encapsulação melanótica de uma microfilária no abdômen de *Ae. aegypti*, no segundo dia pós-infecção (Figura 8A). Na outra infecção (parasitemia sanguínea de 700 mf/ml), uma microfilária/L1 completamente melanizada foi observada no tórax de *Ae. aegypti*, no quinto dia pós-infecção (Figura 8B). Apenas esses dois eventos de melanização foram registrados entre todos os mosquitos infectados (*Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*).

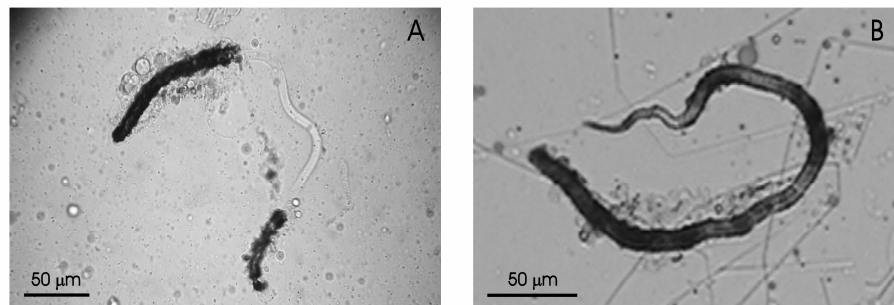


Figura 8 - Melanização de *Wuchereria bancrofti* em *Aedes aegypti*. A: encapsulação melanótica de *Wuchereria bancrofti* no abdômen de *Ae. Aegypti*, dois dias pós-infecção. B: *Wuchereria bancrofti* melanizada no tórax de *Ae. Aegypti*, cinco dias pós-infecção.

Nota: Estes eventos foram observados em diferentes infecções.

8.2 Diagnóstico molecular da infecção de *Aedes aegypti* com *Wuchereria bancrofti*

Como previsto, o fragmento amplificado pelos *primers* NV1 e NV2, para detectar a presença de *W. bancrofti* em *Ae. aegypti*, apresentou 188 pb e foi observado apenas nas amostras que serviram como controle positivo e nas amostras de mosquitos infectados. Na alimentação artificial cuja parasitemia sanguínea foi de 1900 mf/ml, todas as amostras de *Ae. aegypti* estavam infectadas com *W. bancrofti*, 24h pós-infecção, sendo chamada de infecção 100%. O experimento que utilizou sangue com parasitemia de 700 mf/ml apresentou taxa de infecção igual a 60%, sendo chamada de infecção 60% (Figuras 9 e 10).

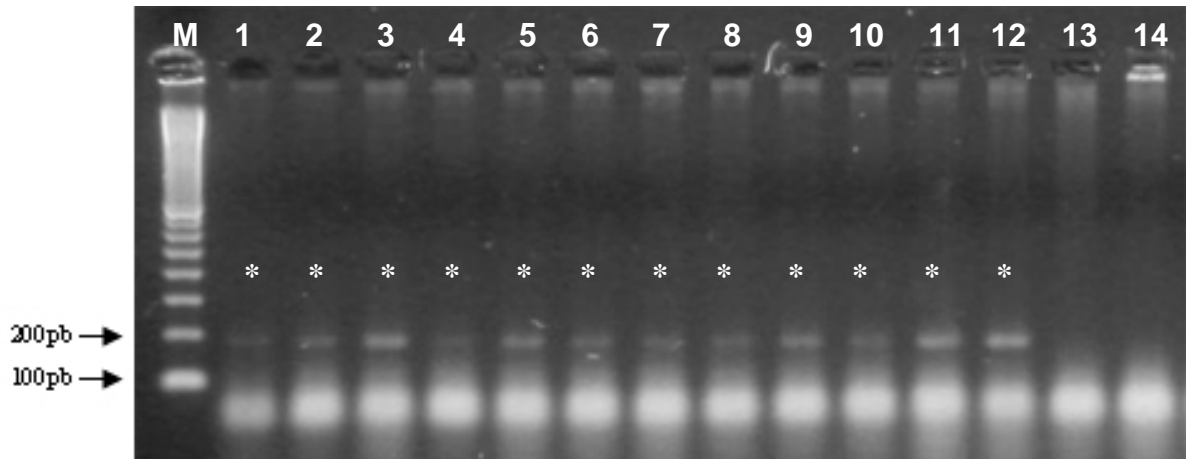


Figura 9 - Gel de agarose 1,5%, mostrando a presença de DNA de *Wuchereria bancrofti* em *Aedes aegypti* 24h pós-infecção (infecção 100%). 1-10: mosquitos individuais infectados; 11: pool de mosquitos infectados (n = 4); 12: controle positivo; 13: mosquito individual não infectado; 14: controle negativo. M: Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. * Amostras positivas.
Nota: Microfilaremia = 1900 mf/ml.

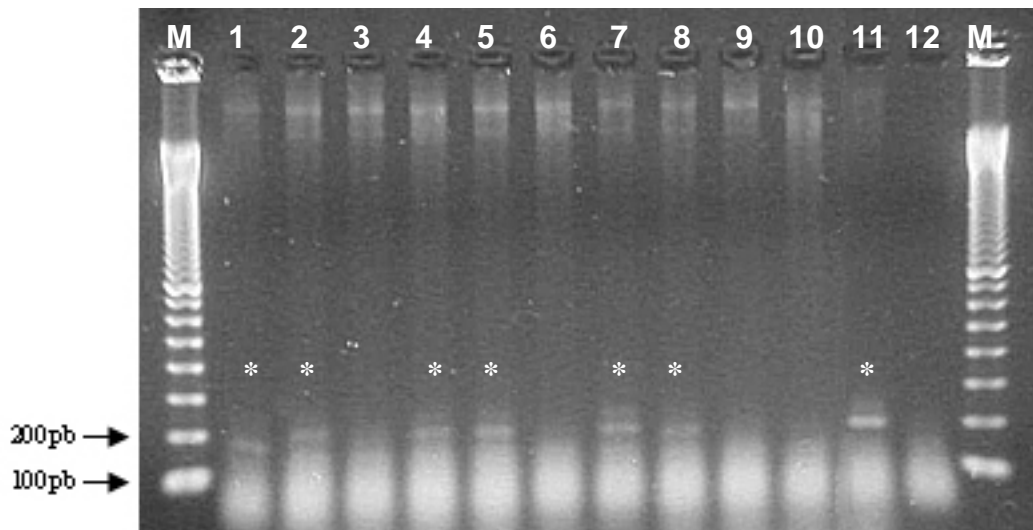


Figura 10 - Gel de agarose 1,5%, mostrando a presença de DNA de *Wuchereria bancrofti* em *Aedes aegypti* 24h pós-infecção (infecção 60%). 1-9: mosquitos individuais infectados; 10: mosquito individual não infectado; 11: controle positivo; 12: controle negativo. M: Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. * Amostras positivas.
Nota: Microfilaremia = 700 mf/ml.

8.3 Determinação da especificidade dos transcritos

Todas as reações RT-PCR produziram fragmentos de tamanhos correspondentes aos previstos (Figura 11). As seqüências cujos fragmentos foram amplificados pelos *primers* defensina, cecropina, transferrina e *rpL8* foram alinhadas com as seqüências dos seus respectivos RNAm já publicadas (CHO et al., 1996; LAN; FALLON, 1992; LOWENBERGER et al., 1999a; YOSHIGA et al., 1997), mostrando 100% de similaridade. Além disso, a análise avançada por BLAST mostrou alta similaridade (98% a 100%) com os genes esperados de *Ae. aegypti* depositados no GenBank.

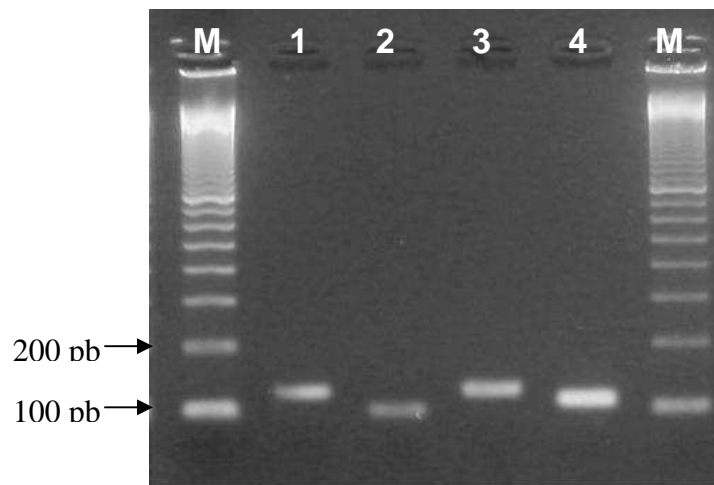


Figura 11 - Gel de agarose 2,0%, mostrando os fragmentos produzidos por RT-PCR com os *primers* para *rpL8* (1), defensina (2), cecropina (3) e transferrina (4). M: Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb.

8.4 Análise da expressão gênica da defensina, cecropina e transferrina

8.4.1 Análise da eficiência das amplificações

A análise das curvas-padrão mostrou que as eficiências de amplificação de cada um dos genes de interesse em relação ao controle endógeno foram similares (Gráfico 1). A curva de dissociação dos *primers*, tanto dos genes de interesse, quanto do controle endógeno,

mostrou um único pico de *melting*, o que indica sinal específico, correspondendo às respectivas seqüências-alvos. Em todas as amostras controle negativo, não ocorreu nenhuma amplificação proveniente da detecção de sinal de fluorescência além do *background*, provando que o procedimento de extração de RNA total mais o tratamento extra com DNase removeu efetivamente o DNA genômico das amostras.

8.4.2 Análise temporal da expressão gênica

Duas horas após a infecção 100%, a expressão relativa da defensina, cecropina e transferrina, normalizadas para *rpL8*, foi 2,19; 2,60 e 0,08 vezes maior, respectivamente, em mosquitos infectados, comparados com mosquitos não infectados. Entre os intervalos observados, defensina e transferrina mostraram picos de transcrição gênica 24h pós-infecção em mosquitos infectados, com valores iguais a 3,41 e 3,29; respectivamente. Já a expressão da cecropina em mosquitos infectados foi muito menor às 24h (0,38) do que às 2h pós-infecção. Às 48h pós-infecção, a expressão de defensina e transferrina diminuiu, com valores apenas 0,5 vezes maiores em *Ae. aegypti* infectados do que em *Ae. aegypti* não infectados. No caso da cecropina, o nível de expressão às 48h (0,34) permaneceu similar àquele das 24h. Nos tempos 72h e 7d, a abundância relativa de todos os transcritos diminuiu até alcançar valores negativos, ou seja, a expressão relativa em mosquitos infectados foi menor do que em mosquitos não infectados.

Na infecção 60%, a expressão relativa da defensina, cecropina e transferrina, 2h pós-infecção, foi de 0,57; 3,64 e 0,57; respectivamente, em *Ae. aegypti* infectados, comparados com *Ae. aegypti* não infectados. Às 24h pós-infecção, a transcrição da defensina em mosquitos infectados aumentou e foi igual a 2,78; enquanto a cecropina e a transferrina apresentaram expressão igual a 2,16 e 0,81; respectivamente. No intervalo 48h, os níveis de defensina, cecropina e transferrina mostraram expressão mais elevada em 1,67; 1,32 e 0,34; respectivamente. A partir das 72h pós-infecção, os níveis dos transcritos nos mosquitos infectados baixaram gradativamente e, em alguns casos, foi menor que em mosquitos não infectados, exceto para a cecropina, que apresentou um suave aumento (0,67) no sétimo dia. A expressão relativa dos genes defensina, cecropina e transferrina ao longo do tempo pode ser observada no gráfico 2.

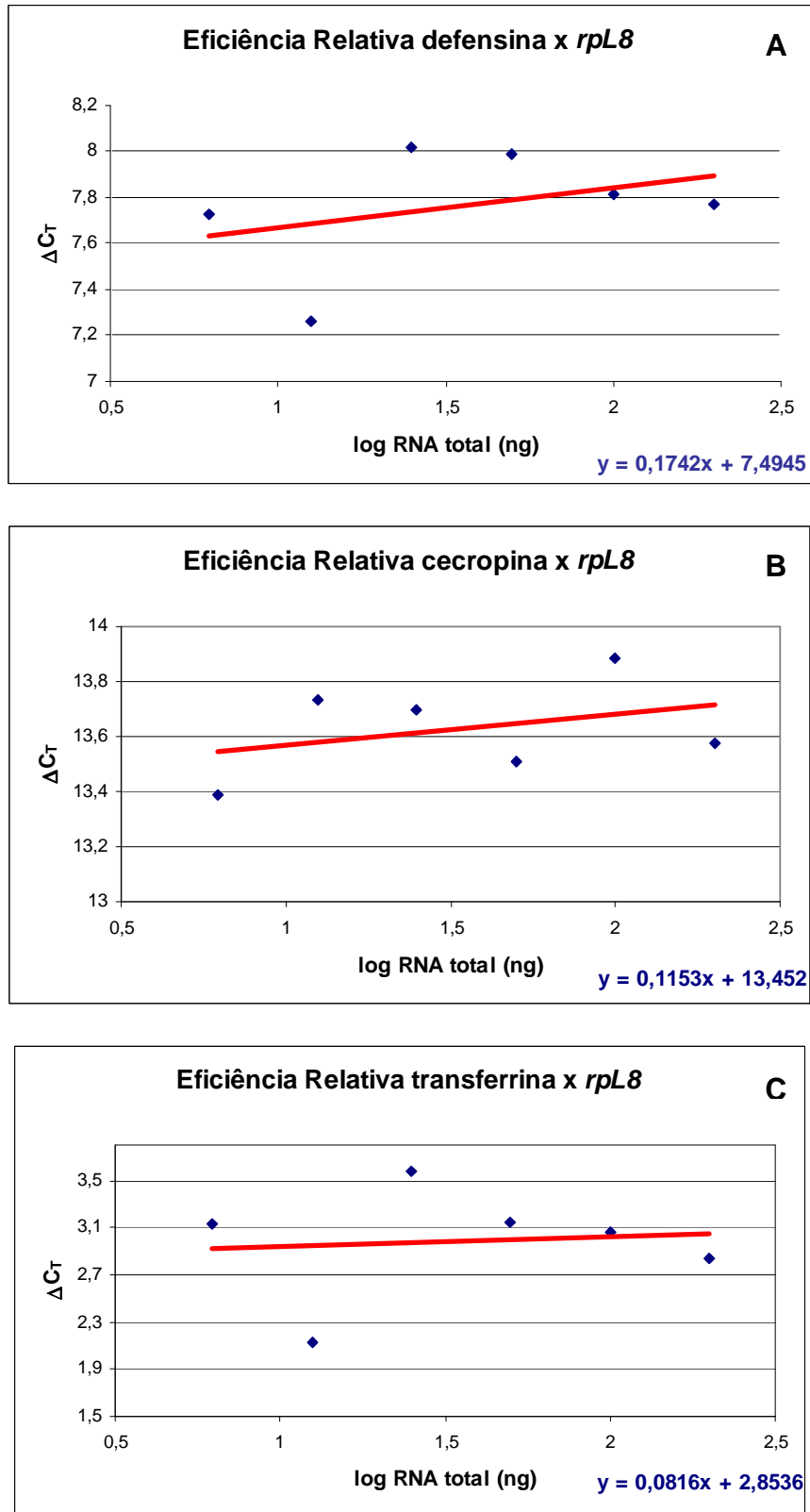


Gráfico 1 - Validação do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Nota: Curva padrão demonstrando a eficiência relativa da amplificação do DNAc de diferentes quantidades de RNA, para os genes defensina (A), cecropina (B) e transferrina (C) versus *rpL8*.

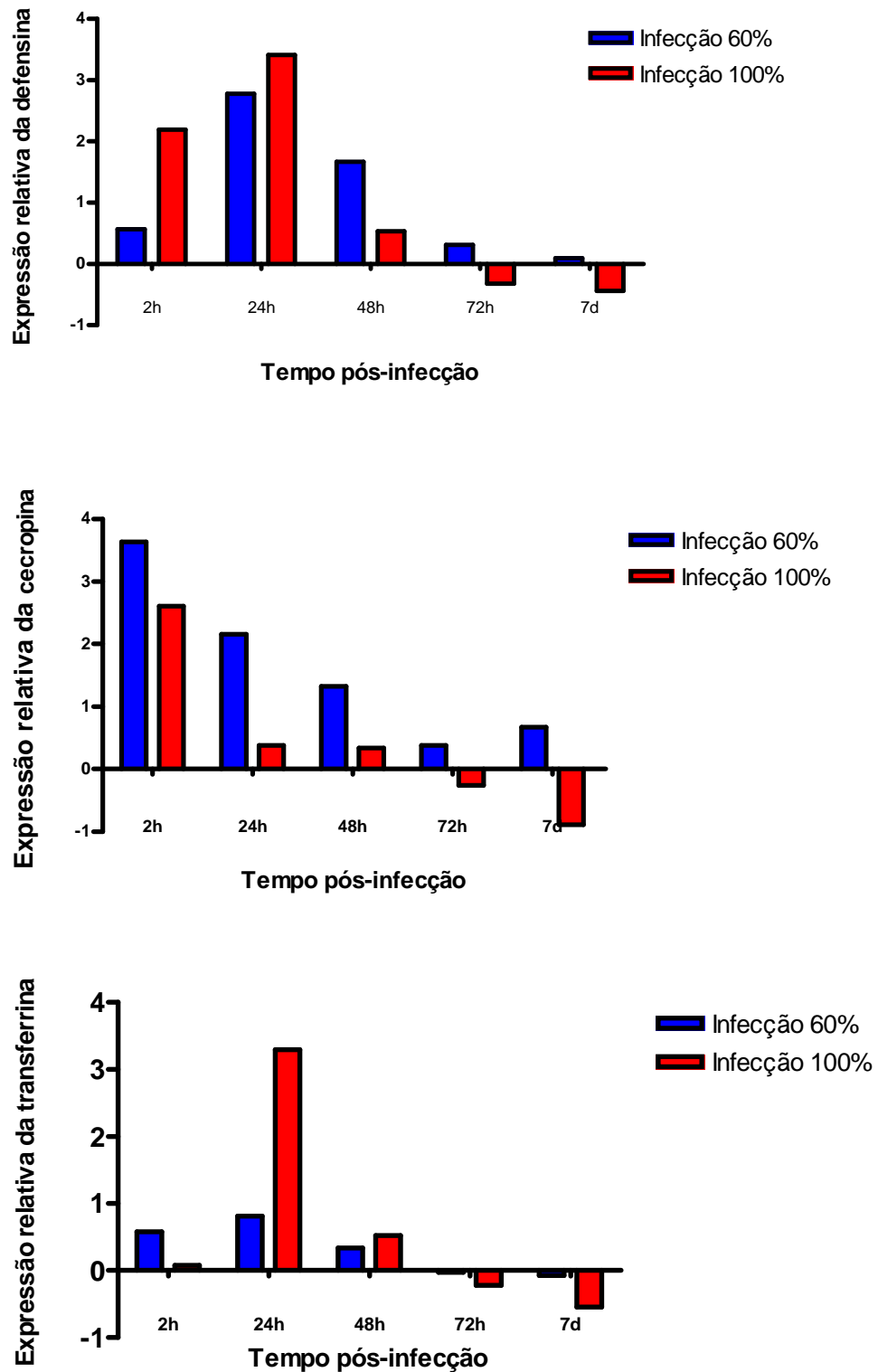


Gráfico 2 - Expressão relativa dos genes defensina, cecropina e transferrina ao longo do tempo, em fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas, quando comparadas a fêmeas não infectadas com *Wuchereria bancrofti*, após infecção 60% e 100%.

9 DISCUSSÃO

Atualmente, a existência de ferramentas como mapas genéticos de alta densidade, linhagens celulares imune competentes, genoma completo de hospedeiros e parasitas, coleções de seqüências expressas (EST, “Expressed Sequence Tag”), técnicas para detecção de perfis de expressão e ferramentas transgênicas, permite o estudo molecular detalhado da interação entre organismos modelo, como *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, e parasitas (BARTHOLOMAY et al., 2004a; DANA et al., 2006; JIANG, 2005; MARINOTTI et al., 2005; SUN; ECCLESTON; FALLON, 1998).

No presente estudo, a análise temporal do perfil transcricional mostrou diferença no padrão de expressão dos genes defensina, cecropina e transferrina de *Ae. aegypti* após infecção com *Wuchereria bancrofti*. A expressão da defensina e da cecropina ocorreu logo após a infecção, com picos às 2h (cecropina) ou 24h (defensina), entre os intervalos observados, corroborando estudos anteriores usando *Ae. aegypti* inoculados com bactérias (BARTHOLOMAY et al., 2004a, 2004b; CHO et al., 1996; GAO; HERNANDEZ; FALLON, 1999; LOWENBERGER et al., 1999a, 1999b). O gene transferrina não apresentou indução tão rápida, em relação aos genes defensina ou cecropina, mas sua expressão máxima, entre os intervalos observados, também ocorreu 24h pós-infecção. Harizanova et al. (2005) mostraram rápida transcrição de transferrina em fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue, apresentando picos de expressão às 12h e 24h após ingestão de sangue e diminuição às 48h.

Cho et al. (1996) relataram que fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* produziram transcritos do gene defensina das 6h às 30h após inoculação com bactérias. Linhagens celulares de *Ae. aegypti* Aag-2 e de *Ae. albopictus* C7-10 também expressaram RNAm de defensina às 3h pós-inoculação com bactérias, apresentando abundância máxima entre 12h e 36 h (GAO; HERNANDEZ; FALLON, 1999). Lowenberger et al. (1999a; 1999b) detectaram expressão prolongada dos transcritos defensina e cecropina em mosquitos *Ae. aegypti* inoculados com bactérias, que iniciou nas primeiras horas e continuou até o 21º dia e o décimo dia de exposição, respectivamente. Quando células de *Ae. aegypti* (Aag-2) e células de *Ae. albopictus* (C7-10) são expostas a bactérias, elas secretam um conjunto de peptídeos e proteínas com atividade antibiótica, incluindo a transferrina, que impedem o crescimento desses patógenos na placa de crescimento (YOSHIGA et al., 1997). Outro trabalho revelou que fêmeas de *Culex quinquefasciatus* infectadas com *W. bancrofti* também apresentaram aumento na expressão da transferrina nos dias 2, 5 e 13 pós-infecção, com pico no dia 5

(PAILY; KUMAR; BALARAMAN, 2007). Além disso, Aguilar et al. (2005) detectaram aumento na expressão de cecropina e transferrina (maior que 2 vezes), em *An. gambiae* infectado com bactérias e/ou fungos filamentosos.

A expressão relativa de defensina e transferrina foi maior na infecção 100% do que na infecção 60%, no entanto, os níveis de cecropina foram maiores na segunda infecção. É possível que os maiores níveis de transcritos de defensina e transferrina estejam relacionados à maior parasitemia sanguínea presente na primeira infecção. Bartholomay et al. (2004b) observaram transcrição de defensina dose-dependente em mosquitos inoculados com bactérias. No caso da cecropina, é possível que o sangue utilizado na segunda infecção possuísse bactérias que co-estimularam a expressão desse gene, mas isso não foi analisado. Outra possibilidade é a de que, como as microfilárias são oriundas de pacientes diferentes, são parasitas de constituição genética distinta e podem, portanto, apresentar diferentes virulências. Desse modo, é importante ressaltar que a constituição genética de ambos, vetor e parasita, podem influenciar no resultado da interação entre esses organismos, e o modo pelo qual o parasita responde ao ambiente do hospedeiro desempenha um papel tão importante quanto a resposta do hospedeiro ao parasita.

A dinâmica de desenvolvimento de *W. bancrofti* nos mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* não é amplamente documentada na literatura, e algumas variações ainda ocorrem, devido a diferenças genéticas de mosquitos e/ou parasitas de origens geográficas distintas, assim como nas condições experimentais (ALBUQUERQUE et al., 1999; CALHEIROS et al., 1998; MACDONALD, 1962a, 1962b; MAHAPATRA et al., 1999; PAILY; HOTI; BALARAMAN, 2006). As observações realizadas por microscopia óptica revelaram que a migração das microfilárias de *W. bancrofti* para o tórax do mosquito *Ae. aegypti* (85,7%) foi mais rápida em relação a *Cx. quinquefasciatus* (33,5%). Esses resultados são semelhantes aos descritos por Albuquerque et al. (1999), que registraram o valor de 88,8% para *Ae. aegypti* e 36,6% para *Cx. quinquefasciatus*, 24 horas pós-infecção com *W. bancrofti*. Nesse mesmo tempo, Calheiros et al. (1998) registraram 21,3% das microfilárias migrando para o tórax de *Cx. quinquefasciatus*, enquanto Paily, Hoti e Balaraman (2006) observaram que 100% das microfilárias de *W. bancrofti* migraram para o tórax de *Ae. aegypti* e 72,5% migraram no vetor *Cx. quinquefasciatus*. Após chegarem ao tórax de *Ae. aegypti*, as microfilárias de *W. bancrofti* sofreram diferenciação para as formas L1 pré-salsichóide ou L1 salsichóide, mas não evoluíram além desse estágio. Logo nos primeiros dias pós-infecção, ao contrário do trabalho de Calheiros et al. (1998), as larvas observadas em *Ae. aegypti* foram

muito diferentes em relação às de *Cx. quinquefasciatus*, com superfície irregular e perda de motilidade característica, refletindo seu desenvolvimento anormal na espécie refratária. Apesar de não haver sido avaliado, é possível que isso ocorra devido à ação dos peptídeos antimicrobianos de *Ae. aegypti*, por exemplo, na cutícula de *W. bancrofti*.

Embora genes envolvidos no controle genético da refratariedade/susceptibilidade de *Ae. aegypti* a filarídeos tenham sido mapeados há várias décadas, o(s) mecanismo(s) que leva(m) ao bloqueio do desenvolvimento de *W. bancrofti* é (são) desconhecido(s). Na década de 70, mostrou-se que as armaduras cibarial e faringeal de várias espécies de mosquitos teriam efeito letal sobre as microfilárias de nemátodos ingeridas com a alimentação sanguínea (MCGREEVY et al., 1978). No entanto, esses aparatos estão ausentes em *Ae. aegypti*, permitindo, portanto, a passagem desses vermes através de seu trato digestivo. Outros mecanismos, como a formação de matriz peritrófica, também parecem não exercer efeito algum sobre a refratariedade, uma vez que ela é secretada após a migração da maioria das microfilárias através do epitélio intestinal (BARILLAS-MURY; PASKEWITZ; KANOST, 2005). Do mesmo modo, reações de melanização e encapsulação melanótica, mecanismos envolvidos na refratariedade de *Anopheles* ao protozoário *Plasmodium* e ao filarídeo *Brugia malayi* (BEERNTSEN et al., 1989; NAYAR et al., 1992), não apresentaram intensidade suficiente para explicar o bloqueio do desenvolvimento desse verme em *Ae. aegypti*. No presente estudo, apenas dois eventos de melanização foram visualizados, confirmando estudos prévios de que este não é o principal mecanismo de defesa de *Ae. aegypti* contra filarídeos (ALBUQUERQUE et al., 1999). As respostas observadas pareceram ser uma mistura de melanização humoral e encapsulação celular, como já descrito (BARILLAS-MURY et al., 2005), uma vez que estruturas similares a fragmentos de células foram observadas próximos à camada de melanina. É importante enfatizar que os eventos ocorreram em diferentes tecidos: no abdômen, dois dias pós-infecção; e no tórax, no quinto dia pós-infecção.

Neste trabalho, a maior expressão de transcritos nas primeiras 24h sugere que os respectivos peptídeos/proteínas estão sendo produzidos durante a migração de *W. bancrofti* para o tórax do mosquito, que ocorreu no mesmo período. Ao contrário das observações com mosquitos inoculados com bactérias (LOWENBERGER et al., 1999a, 1999b), a indução de transcritos começou a diminuir às 48h pós-infecção com *W. bancrofti*. Esta diferença pode ser explicada pela natureza distinta dos patógenos (bactéria *versus* filarídeos), os diferentes padrões de infecção e as diversas rotas de entrada do patógeno.

O principal local de desenvolvimento de filarídeos está localizado no tórax do

mosquito, enquanto o epitélio intestinal e a hemolinfa são apontados como meios que deflagram o reconhecimento do invasor dentro do hospedeiro e que, provavelmente, conduzem aos mecanismos efetores (LOWENBERGER, 1996). De fato, Towson e Chaitong (1991) mostraram que, quando a hemolinfa de *Ae. aegypti* foi incubada com *B. pahangi in vitro*, a motilidade do verme diminuiu, indicando que fatores presentes na hemolinfa podem afetar diretamente o parasita. Um outro estudo demonstrou que a transferência da hemolinfa de uma linhagem refratária para uma linhagem susceptível de *Ae. aegypti* conferiu refratariedade a filarídeos (BEERNTSEN et al., 2000). Por outro lado, Wattam e Christensen (1992) sugeriram que inibidores do desenvolvimento de filarídeos em uma linhagem refratária de *Ae. aegypti* a *B. malayi* foram produzidos no tórax do mosquito. É possível que substâncias sintetizadas na hemolinfa sejam transportadas até o músculo torácico do mosquito, agindo contra esse verme. A partir das nossas observações, é muito provável que a resposta imune humoral esteja envolvida na refratariedade de *Ae. aegypti* a *W. bancrofti*.

Os efeitos das moléculas imunes de insetos, como defensina e cecropina, sobre organismos eucariotos, tal como vermes filarídeos e *Plasmodium*, são pouco entendidos. No entanto, há evidências diretas e indiretas na literatura de que eles podem inibir o desenvolvimento do parasita (ALBUQUERQUE; HAM, 1996; CHALK et al., 1995b; GWADZ et al., 1989; JAYNES et al., 1988; LOWENBERGER et al., 1999d; SHAHABUDDIN et al., 1998; TOWNSON; CHAITHONG, 1991). Por exemplo, defensina ou cecropina injetada em *Ae. aegypti* mostrou efeito negativo sobre o desenvolvimento de filarídeos (*B. malayi* e *B. pahangi*), diminuindo a infecção no inseto (ALBUQUERQUE; HAM, 1996; CHALK et al., 1995b). Do mesmo modo, a infecção com bactérias anteriormente à injeção de filarídeos, estimula a produção massiva de peptídeos antimicrobianos em mosquitos e bloqueia o desenvolvimento do verme no mosquito (LOWENBERGER et al., 1996).

Por outro lado, Bartholomay et al. (2003) observaram que mosquitos *Cx. pipiens pipiens* imune-estimulados com bactérias e, em seguida, infectados com *W. bancrofti*, não apresentaram diferenças no desenvolvimento do filarídeo, em relação ao grupo controle (mosquitos não infectados com bactérias). Embora os peptídeos antimicrobianos avaliados (cecropina, gambicina e defensina) tenham sido expressos nos mosquitos imune-estimulados, eles não causaram efeitos letais sobre o verme. Bartholomay et al. (2004) sugerem um papel diferente para a defensina produzida por *Ae. aegypti*, como elemento da resposta ao stress ou quimiotático, uma vez que experimentos de silenciamento gênico não revelaram diferença

significativa na mortalidade entre mosquitos deficientes em defensina e mosquitos controle, após inoculação com bactérias. É possível que exista alguma variação na capacidade imune de diferentes espécies ou linhagens de mosquitos ou alguma habilidade de o parasita suprimir a resposta do hospedeiro (WATERHOUSE et al., 2007). Maizels et al. (2001), por exemplo, identificaram genes de *B. malayi* que são parcialmente responsáveis pela evasão imune do parasita no hospedeiro vertebrado.

De acordo com os inúmeros exemplos citados acima e os resultados apresentados no presente estudo, há aumento na expressão dos genes defensina, cecropina e transferrina de *Ae. aegypti* após infecção com *W. bancrofti*. É importante destacar que este trabalho aumenta o rol dos modelos até então explorados. No entanto, as informações disponíveis na literatura são difíceis de ser comparadas, devido aos diferentes desenhos experimentais e técnicas utilizadas. Por exemplo, a maioria dos trabalhos foi realizada com bactérias e/ou fungos que: 1) nem sempre são patógenos naturais desses vetores; 2) são introduzidos no corpo do mosquito por injeção, procedimento muito agressivo e não natural, que, por conseguinte, incita o estímulo do sistema imune; 3) foram inoculados em número muito superior ao encontrado normalmente no meio ambiente.

Este estudo foi o primeiro a descrever a cinética de expressão dos genes defensina, cecropina e transferrina em fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com *W. bancrofti* após infecção artificial via membrana animal. Além disso, foi utilizada microfilaremia natural, ou seja, procurou-se aproximar as condições experimentais das condições naturais. A adoção de *pools*, ao invés de mosquitos individuais, também mostrou ser vantajosa, pois reduziu a chance de erro oriundo de diferenças na resposta imune individual (BARTHLOMAY et al., 2004b), assim como possibilitou a obtenção de maior quantidade de RNA total isolado.

A resposta de defesa observada neste estudo mostrou-se complexa: não foi possível afirmar se ela é de natureza específica, tampouco saber como (ou se) estas moléculas agem em conjunto. A avaliação por microarranjos do transcriptoma de *An. gambiae*, quando imune-estimulado com *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Beauveria basiana*, demonstrou que, para respostas diversas contra patógenos diferentes, ocorrem apenas algumas sobreposições no perfil transcricional (AGUILAR et al., 2005). Ao contrário, Bartholomay et al. (2004b) afirmaram que a produção de defensina em *Ae. aegypti* não é dependente do organismo inoculado, seja bactérias gram-positivas ou gram-negativas, microfilárias de *B. malayi* ou *Dirofilaria immitis*. Casteels-Josson et al. (1994) associaram função sinérgica dos quatro diferentes peptídeos (apidecina, abecina, himenoptecina defensina) secretados por *Apis*

mellifera após infecção com bactérias, no qual funcionariam por complementariedade em relação ao espectro de ação.

Este trabalho contribui para o maior conhecimento das interações entre *Ae. aegypti*/*W. bancrofti*. Os resultados sugerem o envolvimento destes peptídeos/proteína na resposta imune de *Ae. aegypti* à infecção por *W. bancrofti*. A confirmação da função específica destes genes poderá ser posteriormente realizada por ensaios de silenciamento gênico, pelo mecanismo de RNA de interferência (HUANG; CHRISTENSEN; CHEN, 2005; MOITA et al., 2005; SHIN; KOKOZA; RAIKHEL, 2003) e, desse modo, elucidar se defensina, cecropina e transferrina estão, de fato, envolvidas na refratariedade de *Ae. aegypti* a *W. bancrofti*.

10 CONCLUSÕES

- A migração de *Wuchereria bancrofti* para o tórax de *Aedes aegypti* é mais rápida que no vetor natural *Culex quinquefasciatus*.
- No transcurso da infecção em *Ae. aegypti*, as larvas de *W. bancrofti* apresentam desenvolvimento anormal e perda da motilidade característica.
- Eventos de melanização ocorreram em diferentes tecidos de *Ae. aegypti* e em diferentes tempos após a infecção com *W. bancrofti*.
- Há maior transcrição de defensina, cecropina e transferrina em mosquitos *Ae. aegypti* infectados com *W. bancrofti*.
- O pico destes transcritos imunes ocorre às 2h ou 24h pós-infecção, coincidindo com a migração da microfilária de *W. bancrofti* para o tórax de *Ae. aegypti*, que ocorreu nas primeiras 24h.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, Washington, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.

AGUILAR, R. et al. Global gene expression analysis of *Anopheles gambiae* responses to microbial challenge. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 709-719, 2005.

AHID, S. M.; VASCONCELOS, P. S.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 6, p. 769-775, 2000.

AHMED; A. M.; HURD, H. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. **Microbes Infect.**, Paris, v. 8, n. 2, p. 308-315, 2006.

ALBUQUERQUE, C. M. et al. Blood meal microfilariae density and the uptake and establishment of *Wuchereria bancrofti* infections in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 5, p. 591-596, 1999.

ALBUQUERQUE, C. M.; HAM, P. J. *In vivo* effect of a natural *Aedes aegypti* defensin on *Brugia pahangi* development. **Med. Vet. Entomol.**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 397-399, 1996.

ALCANTARA, J.; YU, R. H.; SCHRYVERS, A. B. The region of human transferrin involved in binding to bacterial transferrin receptors is localized in the C-lobe. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 1135-1143, 1993.

ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. 2. ed. New York: CABI Publishing, 2000.

ANYANWU, I. N. et al. The incrimination of *Aedes (Stegomyia) aegypti* as the vector of *Dirofilaria repens* in Nigeria. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 92, n. 4, p. 319-327, 2000.

AYRES, C. F. J. et al. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.

BARILLAS-MURY, C.; PASKEWITZ, S.; KANOST, M. R. Immune responses of vectors. In: MARQUARDT, W. C. et al. **Biology of Disease vectors**. 2. ed. Burlington: Elsevier

Academic, 2005. cap. 27.

BARTFELD, N. S.; LAW, J. H. Isolation and molecular cloning of transferrin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Sequence similarity to the vertebrate transferrins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 35, p. 21684-21691, 1990.

BARTHOLOMAY, L. C. et al. *Culex pipiens pipiens*: characterization of immune peptides and the influence of immune activation on development of *Wuchereria bancrofti*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 43-50, 2003.

BARTHOLOMAY, L. C. et al. Description of the transcriptomes of immune response-activated hemocytes from the mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4114-4126, 2004a.

BARTHOLOMAY, L. C. et al. Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 125-132, 2004b.

BEERNTSEN, B. T. et al. *Aedes aegypti*: a quantitative trait locus (QTL) influencing filarial worm intensity is linked to QTL for susceptibility to other mosquito-borne pathogens. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 81, n. 3, p. 355-362, 1995.

BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of mosquito vector competence. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 64, n. 1, p. 115-37, 2000.

BEERNTSEN, B. T.; LUCKHART, S.; CHRISTENSEN, B. M. *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*: inherent difference in immune activation in the mosquitoes *Armigeres subalbatus* and *Aedes aegypti*. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 75, n. 1, p. 76-81, 1989.

BEERNTSEN, B. T.; SEVERSON, D. W.; CHRISTENSEN, B. M. *Aedes aegypti*: characterization of a hemolymph polypeptide expressed during melanotic encapsulation of filarial worms. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 79, n. 3, p. 312-321, 1994.

BLANDIN, S.; LEVASHINA, E. A. Mosquito immune responses against malaria parasites. **Curr. Opin. Immunol.**, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 16-20, 2004.

BOCKARIE, M. J. et al. Application of a polymerase chain reaction-ELISA to detect *Wuchereria bancrofti* in pools of wild-caught *Anopheles punctulatus* in a filariasis control area in Papua New Guinea. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 62, n. 3, p. 363-367, 2000.

BOGAN, R. L. et al. Systematic determination of differential gene expression in the primate corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. **Mol. Endocrinol.**, Bethesda, 1998. Disponível em: <<http://mend.endojournals.org/cgi/rapidpdf/me.2007-0484v1>>. Acesso em: 18 fev. 2008.

BOMAN, H. G. et al. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 259, n. 1, p. 103-106, 1989.

BRASIL. Coordenação de Vigilância das Doenças Transmitidas por Vetores. **Filariose**. Brasília, DF, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27436>. Acesso em: 12 jan. 2008.

BRIVIO, M. F.; PAGANI, M.; RESTELLI, S. Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): involvement of the parasite cuticle. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 101, n. 2, p. 149-156, 2002.

BROEKAERT, W. F. et al. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant Physiol.**, Lancaster, v. 108, n. 4, p. 1353-1358, 1995.

CALHEIROS, C. M. L. et al. Experimental infection of *Culex (Culex) quinquefasciatus* and *Aedes (Stegomyia) aegypti* with *Wuchereria bancrofti*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 6, p. 855-860, 1998.

CASTEELS-JOSSON, K. et al. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 46, p. 28569-28575, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **Filariasis**, Atlanta, 2007. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Filariasis.asp?body=Frames/A-F/Filariasis/body_Filariasis_b_malayi.htm>. Acesso em: 18 dez. 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **Lymphatic Filariasis**, Atlanta, 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/lymphaticfilariasis/index.htm>>. Acesso em: 18 dez. 2007.

CHALK, R. et al. Full sequence and characterization of two insect defensins: immune peptides from the mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 261, n. 1361, 217-221, 1995a.

CHALK, R.; TOWNSON, H.; HAM, P. J. *Brugia pahangi*: the effects of cecropins on microfilariae *in vitro* and in *Aedes aegypti*. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 80, n. 3, p. 401-406, 1995b.

CHAPMAN, R. F. **The insects**: structure and function. 4 ed. Cambridge: Cambridge Universit, 1999.

CHO, W. -L. et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defensin A, from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 395-402, 1996.

CHRISTENSEN, B. M.; FORTON, K. F. Hemocyte-mediated melanization of microfilariae in *Aedes aegypti*. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 72, n. 2, p. 220-225, 1986.

CHRISTENSEN, B. M. et al. Melanization immune responses in mosquito vectors. **Trends parasitol.**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 192-199, 2005.

CIÊNCIA HOJE. **Seqüenciado genoma do *Aedes aegypti***, Brasil, 2007. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/91794>>. Acesso em: 30 mar. 2008.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. 1. ed. London: Chapman e Hall, 1999. v. 2.

COLLINS, F. H. et al. Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Science**, Washington, v. 234, n. 4776, p. 607-610, 1986.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 1994.

CORNELISSEN, C. N.; SPARLING, P. F. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 843-850, 1994.

CORNET, B. et al. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. **Structure**, London, v. 3, n. 5, p. 435-448, 1995.

CRISTOPHIDES, G. K. et al. Immunity-related genes and genes families in *Anopheles gambiae*. **Science**, Washington, v. 298, n. 5591, p. 159-165, 2002.

DANA, A. N. et al. Differential gene expression in abdomens of the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*, after sugar feeding, blood feeding and *Plasmodium berghei* infection. **BMC Genomics**, London, v. 7, p. 119, 2006.

DIMARCQ, J. L. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. **Biopolymers**, New York, v. 47, n. 6, p. 465-477, 1998.

DIMOPOULOS, G. et al. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. **EMBO J.**, Oxford, v. 17, n. 21, p. 6115-6123, 1998.

DIMOPOULOS, G. et al. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 94, n. 21, p. 11508-11513, 1997.

DINGLASAN, R. R. et al. Peptide mimics as surrogate immunogens of mosquito midgut carbohydrate malaria transmission blocking targets. **Vaccine**, Kidlington, v. 23, n. 21, p. 2717-2724, 2005.

ELROD-ERICKSON, M.; MISHRA, S.; SCHNEIDER, D. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. **Curr. Biol.**, London, v. 10, n. 13, p. 781-784, 2000.

EVANS, J. D. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 85, n. 2, p. 105-111, 2004.

FERRANDON, D. et al. A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. **EMBO J.**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 1217-1227, 1998.

FISCHER, P.; BOAKYE, D.; HAMBURGER, J. Polymerase chain reaction-based detection of lymphatic filariasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 192, n. 1, p. 3-7, 2003.

FREEMAN, T. C.; LEE, K.; RICHARDSON, P. J. Analysis of gene expression in single cells. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v. 10, n. 6, p. 579-582, 1999.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Dengue: Diagnóstico e Manejo Clínico**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2002.

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

GILLESPIE, J. P.; BURNETT, C.; CHARNLEY, A. K. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **J. Insect Physiol.**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 429-437, 2000.

GWADZ, R. W. et al. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. **Infect. Immun.**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2628-2633, 1989.

GYAPONG, J. O.; TWUM-DANSO, N. A. Global elimination of lymphatic filariasis: fact or fantasy? **Trop. Med. Int. Health.**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 125-128, 2006.

HARIZANOVA, N. et al. *Aedes aegypti* transferrin. Gene structure, expression pattern, and regulation. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 79-88, 2005.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, New York, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HERNANDEZ, V. P.; GERENDAY, A., FALLON; A. M . Secretion of an inducible cecropin-like activity by cultured mosquito cells. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 50, n. 4, p. 440-447, 1994.

HILLYER, J. F.; CHRISTENSEN, B. M. Mosquito Phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v. 53, n. 6, p. 689-698, 2005a.

HILLYER, J. F. et al. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 39-51, 2005b.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and *Plasmodium* sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 89, n. 1, p. 62-69, 2003.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. The antibacterial innate immune response by the mosquito *Aedes aegypti* is mediated by hemocytes and independent of Gram type and pathogenicity. **Microbes infect.**, Paris, v. 6, n. 5, p. 448-459, 2004.

HOFFMANN, J. A.; HETRU, C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. **Immunol. Today**, Cambridge, v. 13, n. 10, p. 411-415, 1992.

HOLT, R. A. et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, Washington, v. 298, n. 5591, p. 129-149, 2002.

HU, Y., AKSOY, S. An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 105-115, 2005.

HUANG, C. Y.; CHRISTENSEN, B. M.; CHEN, C. C.. The use of gene silencing to study the role of dopa decarboxylase in mosquito melanization reactions. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 237-244, 2005.

HULTMARK, D. et al. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 106, n. 1, p. 7-16, 1980.

HULTMARK, D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. **Trends Genet.**, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 178-183, 1993.

JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JAYNES, J. M. et al. *In vitro* cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J.**, Bethesda, v. 2, n. 13, p. 2878-83, 1988.

JIANG, Z. Pattern profiling and mapping of the fat body transcriptome in *Drosophila melanogaster*. **Obes. Res.**, Baton Rouge, v. 13, n. 11, p. 1898-904, 2005.

KAAYA, G. P.; RATCLIFFE, N. A.; ALEMU, P. Cellular and humoral defenses of *Glossina* (Diptera: Glossinidae): reactions against bacteria, trypanosomes, and experimental implants. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 23, n. 1, p. 30-43, 1986.

KIM, I. Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin gene from the mole cricket, *Gryllotalpa orientalis*. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v.140, n. 4, p. 579-87, 2005.

KIM, T; KIM, Y. J. Overview of innate immunity in *Drosophila*. **J. Biochem. Mol. Biol.**,

Seoul, v.38, n. 2, p. 121-7, 2005.

KUMAR, S.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CANTERA, R. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation in *Anopheles gambiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 100, p. 14139-14144, 2003.

KURAMA, T.; KURATA, S.; NATORI, S. Molecular characterization of an insect transferrin and its selective incorporation into eggs during oogenesis. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 228, n. 2, p. 229-235, 1995.

KURATA, S. Recognition and elimination of diversified pathogens in insect defense systems. **Mol. Divers.**, Leiden, v. 10, n. 4, p. 599-605, 2006.

KYLSTEN, P.; SAMAKOVLIS, C.; HULTMARK, D. The cecropin *locus* in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection. **EMBO J.**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 217-224, 1990.

LAI, S. C., CHEN, C. C., HOU, R. F. Electron microscopic observations on wound-healing in larvae of the mosquito *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 38, n. 6, p. 836-43, 2001.

LAMBERT, J. et al. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 86, n. 1, p. 262-266, 1989.

LAMBERTY et al. Insect immunity: Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 274, n. 14, p. 9320-9326, 1999.

LAN, Q.; FALLON, A. M. Sequence analysis of a mosquito ribosomal protein rpL8 gene and its upstream regulatory region. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 71-80, 1992.

LANZ-MENDOZA, H.; HERNANDEZ-MARTINEZ, S.; KU-LOPEZ, M. Superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 88, n. 4, p. 702-706, 2002.

LAWRENCE, R. A. Immunity to filarial nematodes. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 100. n. 1/2, p. 33-44, 2001.

LEHRER, R. I.; GANZ, T. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 797, p. 228-239, 1996.

LEHRER, R. I.; LICHTENSTEIN, A. K.; GANZ, T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. **An. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 11, n. p. 105-128, 1993.

LEIPPE, M. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa-effector molecules of primitive phagocytes. **Dev Comp Immunol.**, Elmsford NY, v. 23, n. 4-5, p. 267-79, 1999.

LIU, C. T. et al. Effects of inhibitors of serine protease, phenoloxidase and dopa decarboxylase on the melanization of *Dirofilaria immitis* microfilariae with *Armigeres subalbatus* haemolymph in vitro. **Parasitology**, London, v. 115, n. 1, p. 57-68, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOCKE, M.; NICHOL, H. Iron Economy in Insects: Transport, Metabolism, and Storage. **Ann. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 37, p. 195-215, 1992.

LOCKEY, C.; OTTO, E.; LONG, Z. Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. **Biotechniques**, Natick, v. 24, n. 5, p. 744-746, 1998.

LOWENBERGER, C. A. et al. *Aedes aegypti*: induced antibacterial proteins reduce the establishment and development of *Brugia malayi*. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 83, n. 2, p. 191-201, 1996.

LOWENBERGER, C. A. et al. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 274, n. 29, p. 20092-20097, 1999a.

LOWENBERGER, C. A. et al. Insect immunity: isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 867-873, 1995.

LOWENBERGER, C. A. et al. Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 107-118, 1999b.

LOWENBERGER, C. A. et al. Mosquito-*Plasmodium* interactions in response to immune activation of the vector. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 91, n. 1, p. 59-69, 1999c.

LOWENBERGER, C. A. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 219-229, 2001.

LOWRIE, R. C. et al. Uptake and development of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus* that fed on Haitian carriers with different microfilaria densities. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 41, n. 4, p. 429-435, 1989.

LYMPH NOTES. **Lymphatic filariasis**, 2006. Disponível em:
<<http://www.lymphnotes.com/article.php/id/67/>>. Acesso em: 9 nov. 2007.

MACDONALD, W. W.; RAMACHANDRAN, C. P. The influence of the gene fm (filarial susceptibility, *Brugia malayi*) on the susceptibility of *Aedes aegypti* to seven strains of *Brugia*, *Wuchereria* and *Dirofilaria*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 59, p. 64-73, 1965.

MACDONALD, W. W. The genetic basis of susceptibility of infection with semi-periodic *Brugia malayi* in *Aedes aegypti*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 56, p. 373-382, 1962a.

MACDONALD, W. W. The selection of a strain of *Aedes aegypti* susceptible to infection with semi-periodic *Brugia malayi*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 56, p. 368-372, 1962b.

MACIEL et al., Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, northeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, p. 449-455, 1996.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 30, n. 6, p. 1292-13305, 1996.

MAHAPATRA, N. et al. *Bacillus sphaericus* interferes with the development of *Brugia malayi* in *Aedes aegypti*. **J. Helminthol.**, London, v. 73, p. 279-280, 1999.

MAIZELS, R. M. et al. Immune evasion genes from filarial nematodes. **Int. J. Parasitol.**, New York, v. 31, n. 9, p. 889-898, 2001.

MARINOTTI, O. et al. Microarray analysis of genes showing variable expression following a blood meal in *Anopheles gambiae*. **Insect Mol Biol.**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 365-373, 2005.

MATSUYAMA, K.; NATORI, S. Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 263, n. 32, p. 17117-17121, 1988b.

MATSUYAMA, K.; NATORI, S. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 263, n. 32, p. 17112-17116, 1988a.

MCGREEVY, P. B. et al. The lethal effects of the cibarial and pharyngeal armatures of mosquitoes on microfilariae. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 72, n. 4, p. 361-368, 1978.

MEADE, K. G. et al. Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease. **BMC Genomics**, London, v. 8, p. 400, 2007.

MOITA, L. F. et al. *In vivo* identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *Anopheles gambiae*. **Immunity**, Cambridge, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2005.

NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, Cambridge, v. 22, n. 5, p. 469-480, 2000.

NASCIMENTO, A. M. et al. Honey bee (*Apis mellifera*) transferrin-gene structure and the role of ecdysteroids in the developmental regulation of its expression. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 415-424, 2004.

NAYAR, J. K. et al. Characterization of intracellular melanization response in *Anopheles quadrimaculatus* against subperiodic *Brugia malayi* larvae. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 78, n. 5, p. 876-880, 1992.

NAYAR, J. K.; KNIGHT, J. W. Comparison of migration and encapsulation of *Brugia malayi* microfilariae from the midgut to the hemocoel between *Anopheles quadrimaculatus* and *Aedes aegypti*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 65, n. 3, p. 295-299, 1995.

NENE, Y. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, Washington, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.

NEVES, J. M. et al. *In vitro* differentiation of *Wuchereria bancrofti* (Filariidae). **Braz. J. Biol. Res.**, São Paulo, v. 24, n. 10, p. 1011-1016, 1991.

NICHOL, H., LAW, J. H.; WINZERLING, J. J. Iron metabolism in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 47, p. 535-559, 2002.

ONFELT, B.; LINCOLN, P.; NORDÉN, B. Enantioselective DNA threading dynamics by phenazine-linked. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 123, n. 16, p. 3630-3637, 2001.

ORANGE COUNTY VECTOR CONTROL DISTRICT. **Mosquitoes**, 2008. Disponível em: <http://www.ocvcd.org/images/mosquitoes/photo_mosquitoes_1.jpg> Acesso em: 30 mar. 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis**, Geneva, 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>>. Acesso em: 19 dez. 2007.

OTVOS JR, L. Antibacterial peptides isolated from insects. **J. Pept. Sci.**, Chichester, v. 6, n. 10, p. 497-511, 2000.

PAILY, K. P. et al. Changes in the haemocyte population of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, following infection with the filarial parasite, *Wuchereria bancrofti*. **Med. Vet. Entomol.**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 116-118, 2005.

PAILY, K. P.; HOTI, S. L.; BALARAMAN, K. Development of lymphatic parasite *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) in mosquito species (Diptera: Culicidae) fed artificially on microfilaremic blood. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 43, n. 6, p. 1222-1226, 2006.

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

PATHOLOGY GUY. **Lymphatic filariasis**, 2007. Disponível em: <<http://www.pathguy.com/lectures/filaria.jpg>>. Acesso em: 9 nov. 2007.

PFAFFL, M. W. Relative quantification. In: DORAK, M. T. **Real-time PCR**. 1. ed. Oxford: Bios Advanced Methods, 2006. cap. 3.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002.

REYES, I.; TIWARI, R.; REYES, N. DNA microarray analysis reveals metastasis-associated genes in rat prostate cancer cell lines. **Biomedica**, Bogotá, v. 27, n. 2, p. 190-203, 2007.

RICHMAN, A. M. et al. Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 203-210, 1996.

ROCHA, E. M.; FONTES, G. Bancroftian filariasis in Brazil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 98-105, 1998.

SABA, R.; BOOTH, S. A. Target labelling for the detection and profiling of microRNAs expressed in CNS tissue using microarrays. **BMC Biotechnol.**, London, p. 6-47, 2006.

SCHACHER, J. F. Morphology of the microfilaria of *Brugia pahangi* and of the larval stages in the mosquito. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 48, p. 679-692, 1962.

SEVERSON, D. W. et al. Chromosomal mapping of two loci affecting filarial worm susceptibility in *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 67-72, 1994.

SHAHABUDIN, M. et al. *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. **Exp Parasitol.**, New York, v. 89, n. 1, p. 103-12, 1998.

SHAHABUDIN, M. et al. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 90, n. 9, p. 4266-4270, 1993.

SHIN, S. W., KOKOZA, V. A.; RAIKHEL, A. S. Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity. **J. Exp. Biol.**, London, v. 206, n. 21, p. 3835-3843, 2003.

SHAPSHAK, P. et al. Quantification of HIV GAG RNA using real time reverse transcriptase PCR. **Front Biosci.**, Tampa, v. 10, p. 135-142, 2005.

SILVA, A. M. Bebedouro doméstico como criadouro de *Ae. aegypti*. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 139-140, 2004.

SÖDERHALL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, Philadelphia, v. 10, n. 1, p. 23-28, 1998.

SOUTHGATE, B. A. The significance of low density microfilaraemia in the transmission of lymphatic filarial parasites. **J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore v. 95, n. 2, p. 79-86, 1992.

SUN, D.; FALLON, A. M. Characterization of genomic DNA encoding cecropins from an *Aedes albopictus* mosquito cell line. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 21-30, 2002.

SUN, D.; ECCLESTON, E. D.; FALLON, A. M. Cloning and expression of three cecropin cDNAs from a mosquito cell line **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 454, n. 1/2, p. 147-151, 1999.

SUN, D.; ECCLESTON, E. D.; FALLON, A. M. Peptide sequence of an antibiotic cecropin from the vector mosquito, *Aedes albopictus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 249, n. 2, p. 410-415, 1998.

TAKLE, G. B. Studies on the cellular immune responses of insects toward the insect pathogen *Trypanosoma rangeli*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 51, n. 1, p. 64-72, 1988.

TOWNSON, H.; CHAITHONG, U. Mosquito host influences on development of filariae. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 85, n. 1, p. 149-163, 1991.

TRYSELIUS, Y. *CecC*, a cecropin gene expressed during metamorphosis in *Drosophila* pupae. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 204, n. 1, p. 395-399, 1992.

TZOU, P. et al. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. **Immunity**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 737-748, 2000.

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

VAHIDNIA, A. et al. Arsenic metabolites affect expression of the neurofilament and tau genes: an in-vitro study into the mechanism of arsenic neurotoxicity. **Toxicol. In Vitro**, New York, v. 21, n. 6, p. 1104-1112, 2007.

VECTORBASE. *Aedes aegypti*, 2008. Disponível em:
<<http://aaegypti.vectorbase.org/index.php>>. Acesso em: 28 fev. 2008.

VILJAKAINEN, L.; PAMILO, P. Identification and molecular characterization of defensin gene from the ant *Formica aquilonia*. **Insect Mol Biol.**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 335-338, 2005.

VIZIOLI, J.; BULET, P.; HOFFMANN, J. A. Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 98, n. 22, p. 12630-12635, 2001.

VIZIOLI, J. et al. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Mol. Biol.**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 75-84, 2000.

WATERHOUSE, R. M. et al. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. **Science**, Washington, v. 316, n. 5832, p. 1738-1743, 2007.

WATSON, F. L. et al. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. **Science**, Washington, v. 309, n. 5742, p. 1874-1878, 2005.

WATTAM, A. R.; CHRISTENSEN, B. M. Induced polypeptides associated with filarial worm refractoriness in *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 89, n. 14, p. 6502-6505, 1992.

YOSHIGA, T. et al. *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 260, n. 2, p. 414-420, 1999.

YOSHIGA, T. et al. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 94, n. 23, p. 12337-12342, 1997.

ZASLOFF, M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. **J. Lancet**, Minneapolis, v. 360, n. 9340, p. 1116-1117, 2002.

ZHONG, M. et al. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *W. bancrofti* in human blood samples. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, 54, n. 4, p. 357-363, 1996.

APÊNDICE

Apêndice A – Artigo submetido à revista “Parasitology”

Apêndice A – Artigo submetido à revista “Parasitology”

TITLE

Assessment of immune-related transcripts and microscopy observations upon filarial infection in *Aedes aegypti* refractory to *Wuchereria bancrofti*

AUTHORS

T. Magalhaes*¹, I.F. Oliveira¹, M.A.V. Melo-Santos¹, C.M.F. Oliveira¹, C.A. Lima¹, C.F.J. Ayres¹

INSTITUTION ADDRESS

¹ Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ.
Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife PE, CEP: 50670-420, Brazil

* Corresponding author: Tel: 55-81-2101-2553. Fax: 55-81-2101-2647. Email:
teca@cpqam.fiocruz.br.

RUNNING TITLE

Up-regulation of immune transcripts in *W. bancrofti*-infected *A. aegypti*

SUMMARY

Wuchereria bancrofti worms can infect *Aedes aegypti* but, after reaching the mosquito thorax, their development ceases after certain point. The mechanisms responsible for refractoriness of this mosquito species to *W. bancrofti* are not known. Defensin and cecropin are antimicrobial peptides that are up-regulated in insects after infection with a variety of pathogens and more recently transferrin has been included as a component of mosquito humoral immune response. Here, we have assessed the temporal expression pattern of defensin, cecropin and transferrin in *A. aegypti* artificially infected with *W. bancrofti*. We have also observed filarial development in the mosquito compared to *Culex quinquefasciatus*. Results show that transcription of defensin, cecropin, and transferrin is up-regulated in *W. bancrofti*-infected mosquitoes soon after infection, peaks at 2h or 24h, and starts decreasing at 48h. The peak of immune transcripts coincided with migration of *W. bancrofti* to *A. aegypti* thorax, which occurs in the first 24h. After migration, filarial worms in *A. aegypti* may differentiate into the next stage but stop developing, differently than in *C. quinquefasciatus*, where *W. bancrofti* development is normal. It is possible that defensin, cecropin and transferrin are part of the refractory mechanisms of *A. aegypti* to *W. bancrofti*.

KEY WORDS

Mosquito; filaria; defensin; cecropin; transferrin; expression pattern.

INTRODUCTION

In Brazil, lymphatic filariasis is still considered a public health problem, being endemic in the metropolitan region of Recife, State of Pernambuco, located in the Northeast region. The causative agent of this disease in the Country is the nematode *Wuchereria bancrofti*, which is transmitted by the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Regis *et al.*, 1995). On the other hand, *Aedes aegypti*, an abundant species in urban environments and the main vector of dengue and urban yellow fever viruses, does not transmit *W. bancrofti*. The refractoriness mechanisms of *A. aegypti* to *W. bancrofti* are not yet understood. According to Albuquerque *et al.* (1999) melanization is not the main refractoriness system, since only a small percentage of the worm is melanized. As an alternative, it has been suggested that

molecules from the mosquito's humoral immune response may act in synergism to block nematode's development (Lowenberger *et al.*, 1999a).

Defensins are immune peptides found in a variety of invertebrate and vertebrate organisms, indicating it is an ancient element of the innate immune system. In *A. aegypti* mosquitoes it is the most important antimicrobial peptide (Lowenberger, 2001a). These molecules are cationic peptides of about 40 amino acids with 6 cysteine residues that form disulfide bonds. Its 3-D structure consists of an N-terminal loop, a α -helix, and two antiparallel β -sheets. Most studies show that Gram+ bacteria are the main target organisms for defensins, although Gram- bacteria are also sensitive (Lowenberger, 2001a). At least three isoforms (A, B and C) of defensins have been reported in *A. aegypti* and authors have suggested that isoforms A and B are different alleles of the same gene (Lowenberger *et al.*, 1999d). Cecropins are small, 4 kDa peptides that lack cysteine residues. They are formed by two α -helices connected with a short hinge. These peptides possess both anti-Gram+ and Gram- bacteria activities (Lowenberger, 2001b). Defensin and cecropin comprise two of the three families of antimicrobial peptides that have been identified in mosquitoes (Waterhouse *et al.*, 2007). Transferrin is an iron-binding protein initially thought to be involved in iron transport and storage in insects. Insect transferrins differ from the vertebrate molecule in that it contains only one iron-binding site, instead of two (Nichol *et al.*, 2002). This protein is up-regulated in *A. aegypti* and *Drosophila melanogaster* infected with bacteria, suggesting its role in insect immunity. It has been speculated that transferrin may act by sequestering iron molecules to prevent their use by pathogens (Yoshiga *et al.*, 1999; Yoshiga *et al.*, 1997). Defensin, cecropin, and transferrin are produced by the fat body and certain types of hemocytes, and are secreted in the insect hemolymph (Harizanova *et al.*, 2005; Lowenberger, 2001a), except for a few cases exemplified by one defensin isoform that is detected in the mosquito midgut (Lowenberger *et al.*, 1996).

In the present study, we have assessed the expression profile of defensin, cecropin, and transferrin transcripts in *A. aegypti* infected with *W. bancrofti* to determine if they are up-regulated after infection. The development of filarial worms in the mosquito was also observed through microscopy. The importance of studying such mosquito/filaria combination is that the immune mechanisms employed by a non-competent vector to a filarial worm may not be detected in a susceptible mosquito species since, due to co-evolution, in the latter case the parasite may have developed mechanisms to manipulate vector's immunity (Waterhouse *et al.*, 2007). Thus, this work may help on elucidating the molecules involved in mosquito

immunity to filarial worms. To study the natural mechanisms of insect immunity is essential to understand vector/parasite interaction that will ultimately allow the development of novel vector control methods, such as transmission-blocking strategies.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito colonies

The *Aedes aegypti* (Rec Lab) and *Culex quinquefasciatus* (CqSF) colonies have been maintained in the insectary of the Department of Entomology at the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, under standard conditions (70-80% relative humidity, $26 \pm 2^\circ\text{C}$, and 12:12 light:dark cycle). Adults were fed with 10% sucrose and larvae with cat food tablets (Friskies®).

Blood samples

Patients infected with *Wuchereria bancrofti*, diagnosed by the City Hall of Olinda or the City Hall of Recife (State of Pernambuco, Brazil), have volunteered to donate 5 ml of blood before receiving treatment for filariasis. These patients have agreed to participate in the study and signed Informed Consent Forms. For negative controls, the same amount of blood was collected from non-infected volunteers living in non-endemic areas. These procedures were approved by the Institutional Ethical Committee (CEP) and the National Ethics Committee (CONEP) (Protocol no. CAAE: 0036.0.095.000-07).

Mosquito infection

Seven-day old adult *A. aegypti* were fed on blood from patients infected with *W. bancrofti* or on non-infected blood, through an artificial membrane feeder. For infected samples, the number of microfilaria (mf) in 10 μl of blood was counted minutes before mosquito feeding. The counting was repeated three times for each sample and the average parasitemia was calculated (number of mf/ml of blood). Three infections were performed. In the first infection, blood with a parasitemia of 300 mf/ml was used to feed the mosquitoes,

however, blood-fed mosquitoes were used only for microscopy observations (because of the low parasitemia). The second infection was performed with a 1,900 mf/ml blood parasitemia and blood-fed insects were used for qRT-PCR, since a low number of engorged insects were obtained and thus were not enough for microscopy observations. For the third infection, mosquitoes were fed on blood with a 700 mf/ml parasitemia and were used for both qRT-PCR and microscopy observations. In each infection, the number of blood-fed female mosquitoes varied from one to five hundred for each group (experimental and control).

When blood-fed *A. aegypti* were used for qRT-PCR, PCRs with *W. bancrofti* primers were performed on insects collected at 24h post-blood feeding, as described below, in order to calculate the percentage of infected mosquitoes.

For microscopy observations, 7-day old *C. quinquefasciatus* females were fed on the same infected blood used to feed *A. aegypti*, for comparison of *W. bancrofti* development (first and third infections). In the first infection (300 mf/ml parasitemia) mosquitoes were observed in the course of 10 days, and for the infection with a 700 mf/ml parasitemia insects were observed in the course of 15 days.

Calculation of mosquito infection rate through PCR with Wuchereria bancrofti primers

In two infections, 10 engorged mosquitoes were collected at 24h post-blood feeding for both infected and non-infected groups. Genomic DNA was extracted from individual samples according to the protocol by Ayres *et al.* (2002). An aliquote of genomic DNA were then used in a PCR reaction containing primers for *W. bancrofti* (Zhong *et al.*, 1996), which amplify a 188 bp region of the SspI *W. bancrofti* repeat DNA. PCR reaction was as following: one initial denaturation step at 92°C for 5 min, and 40 cycles at 92°C for 15 sec, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min followed by one final extension step at 72°C for 10 min. For the positive control, genomic DNA was extracted from a pool of mosquitoes fed on infected blood and the negative controls consisted of genomic DNA from a pool of five insects fed on non-infected blood and a reaction with no DNA template (to ensure no contamination of PCR reagents).

Microscopy observations of fresh infected mosquitoes

A. aegypti and *C. quinquefasciatus* mosquitoes fed on blood infected with *W. bancrofti* were dissected during the course of 10 or 15 days post-infection to allow

observation of filaria development. For that, head, thorax and abdomen were separated and each macerated in a drop of sterile PBS in a glass slide. The samples were then observed under a light microscope with 100x or 400x magnification. Four to ten mosquitoes of each species were observed each day and the number, stage, and movement of filarial worms were registered.

RNA extraction

For qRT-PCR, blood-fed *A. aegypti* were collected at 2h, 24h, 48h, 72h and 7 days (7d) post-blood feeding. At each time point, 3 pools of 5 mosquitoes were collected from the experimental (infected) and control (non-infected) groups and stored at -80°C until RNA harvest. Total RNA was isolated from whole mosquitoes homogenates by using the RNeasy Mini RNA Isolation kit (GE Illustra). The extraction was carried according to the manufacturer's instructions. After RNA harvest, samples were additionally treated with DNase (USB) to ensure removal of genomic DNA traces.

Primers for Aedes aegypti defensin, cecropin and transferrin

For *A. aegypti* defensin, primers were designed to amplify a region of 96 bp of the conserved region of defensin A sequence published by Cho *et al.* (1996). These primers were: forward 5'-GCCACCTGTGATCTGCTGAGCGGA-3' and reverse 5'-GGAGTTGCAGTAGCCTCCCCGAT-3'. As for *A. aegypti* cecropin, primers were designed to amplify a region of 125 bp according to the sequence published by Lowenberger *et al.* (1999a) and were: forward 5'-ATTTCTCCTGATCGCCGTGGCTG-3' and reverse 5'-GAGCCTTCTCGGCGGCATTGAA-3'. Lastly, primers to amplify a region of 109 bp of *A. aegypti* transferrin were designed according to the sequence published by Yoshiga *et al.* (1997) and were: forward 5'-CGGCCAGCTGGAGGATAACATTG-3' and reverse 5'-CGCTTTGAACTCGCCGAACATCTC-3'. For internal RNA control and to allow normalization of samples, primers that amplify a fragment of 122 bp of the ribosomal RNA rpl8 (Lan and Fallon, 1992) were designed. Rpl8 primers were: forward 5'-TGGGGCGTGTTATTCGTGCACAG-3' and reverse 5'-CAGGTATCCGTGACGTTCCGGCA-3'.

qRT-PCR with blood-fed Aedes aegypti

Quantitative real-time reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR) was performed with RNA from mosquito samples collected at 2h, 24h, 48h, 72h and 7 days (7d) post-blood feeding. All RNA samples were normalized to a certain dilution and 100 ng were assayed in the experiments. The QuantiTect SYBR PCR kit (QIAGEN) was used to perform one-step qRT-PCR. The PCR program was the following: an initial step at 50°C for 30 min to allow reverse transcription; 15 min at 95°C to activate Taq polymerase; and 40 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 62°C and 30 sec at 72°C. The difference in mRNA expression was calculated through the method $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Briefly, after normalization of C_T values of each sample by subtracting the C_T obtained from amplification using rpl8 primers from C_T of amplification using defensin, cecropin or transferrin primers (ΔC_T), the $\Delta\Delta C_T$ was obtained by subtracting the ΔC_T of non-infected samples from ΔC_T of infected samples. For each time point, the mean of $\Delta\Delta C_T$ from the 3 pools of infected and non-infected samples was used to calculate the fold-increase in transcript expression of infected samples compared with non-infected samples. In all cases, samples were assayed in duplicates.

RESULTS*Percentage of infected Aedes aegypti after blood-feeding according to PCR*

In the experiment using blood of 1,900 mf/ml parasitemia, all *A. aegypti* were infected with *Wuchereria bancrofti* at 24h post-infection, thus this was called 100% infection, whereas in the experiment with a 700 mf/ml parasitemia, 60% of mosquitoes were infected at this time point, named 60% infection.

Wuchereria bancrofti development in Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus

At day-1 after infection, the majority or all (average of 86%) of *W. bancrofti* worms had migrated to the thorax of *A. aegypti* mosquitoes. In the case of *C. quinquefasciatus*, the percentage of filarial worms in the thorax at day-1 was lower (average of 34%), showing a slower worm migration (Tables 1 and 2). At this time point, all filarial worms appeared as microfilaria in both species (Tables 3 and 4). At 48h post-infection, filarial worms in *A.*

aegypti appeared as microfilaria or as L1 (pre-sausage form), and were present in the thorax (Fig 1A and 1B). In *C. quinquefasciatus*, at 48h worms were L1 and some were still found in the abdomen (Tables 1-4; Fig. 2A). At 4 days post-infection, a few L1-sausage were found in *A. aegypti* but the majority was L1 (Tables 3 and 4; Figs. 1C and 1D). In *Culex*, at day-4 post-infection, all filarial worms were L1-sausage (Tables 3 and 4) and looked very different from the L1-sausage found in *A. aegypti* (Figs 1G and 2B). At days 5, 7, 9, 11, 13, and 15 post-infection, *W. bancrofti* worms remained as L1 or L1-sausage in *A. aegypti* (Figs. 1F-1J), except for one microfilaria observed on day-5 post infection (Fig. 2E), and were all found in the thorax (Tables 1 and 2). In *Culex*, L1-sausage forms were found until day-7 (Tables 3 and 4; Fig. 2E) and L2 were found from day-9 to 13, all in the thorax (Tables 3 and 4; Figs. 2F-2H). At day 15 post-infection, L3 worms were found in the head of *Culex* mosquitoes (Tables 1-4; Figs. 2I and 2J).

In both species, most filarial worms in microfilaria stage presented an active “snake-like” movement. As for the L1 stage, their motility became slower. Most L1 in *A.* did not show any movement. All L1-sausage were moving in *Culex*, whereas in *Aedes* only a few could be seen moving. When present, L1-sausage movements were discrete in both mosquito species. In *Culex*, the majority of L2 were moving (sluggish movement) and the L3s presented very active movement (Tables 1 and 2). These movements were filmed and may be seen in the online supplement material.

In the first infection (300 mf/ml blood parasitemia), only one melanization event of microfilaria was observed in the abdomen of *A. aegypti* at day-2 post-infection (Fig 3A). In the other infection (700 mf/ml blood parasitemia), a whole-melanized microfilaria was seen in the thorax of *A. aegypti* at day-5 post-infection (Fig 3B). Except for these, no other melanization events were observed among infected mosquitoes (*Aedes* and *Culex*).

Relative expression of defensin, cecropin and transferrin

In the 100% infection, at 2h post-infection the fold-increase of defensin, cecropin and transferrin transcripts in infected compared to non-infected mosquitoes was 2.2, 2.3, and 0.07, respectively. At 24h post-infection, there was a peak of defensin and transferrin in infected mosquitoes, with a 3.4 and 3.3 fold-increase, respectively. Cecropin expression at 24h was much lower than at 2h, showing a 0.4 fold-increase only. At 48h after blood feeding, expression of defensin and transferrin decreased, being only 0.5 fold higher than in non-

infected insects. In the case of cecropin, at 48h the expression level remained similar than that of 24h (0.35). At 72h and 7 days post-infection, levels of all transcripts decreased to negative values, meaning the relative expression in infected insects was lower than in non-infected insects. These results can be seen in Figure 4.

In the second feeding, with an initial 60% mosquito infection, the fold increase at 2h of defensin, cecropin, and transferrin transcripts was 0.6, 3.6, and 0.6, respectively. At 24h post-infection, the fold-increase of defensin in infected mosquitoes was 2.8, whereas of cecropin and transferrin was 2.2 and 0.8, respectively. At 48h post infection, the fold-increase for defensin, cecropin and transferrin was 1.7, 1.3, and 0.35, respectively. At 72h and 7d, there was almost no difference on transcripts levels between infected and non-infected samples, except for cecropin, which showed a slight increase (0.67) at 7d post-infection. Figure 4 also shows the transcripts fold-increase for this infection.

DISCUSSION

The results presented here show that transcription of defensin and cecropin in *Aedes aegypti* occurred quickly after infection with *Wuchereria bancrofti*, and peaked either at 2h (cecropin) or at 24h (defensin) post-infection, corroborating previous studies using bacteria-inoculated insects on the rapid transcription of these peptides after pathogen infection (Bartholomay *et al.*, 2003; Bartholomay *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1999; Lowenberger *et al.*, 1999c; Lowenberger *et al.*, 1999d). Up-regulation of transferrin was not as fast as of defensin and cecropin, but also occurred within the first 24h post-infection. Harizanova *et al.* (2005) showed rapid transcription of transferrin in blood-fed *A. aegypti* (fed on non-infected blood), a peak at 12 and 24h after blood ingestion and a decrease after 48h. Thus, blood ingestion induces a expression pattern of transferrin similar to the one reported here, however, pathogen infection increases this expression, providing one more evidence that transferrin is part of mosquito humoral immunity. The higher expression of transcripts during the first 24h post-infection suggests that the respective peptides/protein are being produced during *W. bancrofti* migration to the mosquito thorax, which occurred within the same period. However, differently to what has been observed in bacteria-inoculated mosquitoes, up-regulation did not last long and started to decrease at 48h (Lowenberger *et al.*, 1999a;

Lowenberger *et al.*, 1999d). The different nature of pathogens (bacteria vs. filarial worms), infection patterns and pathogen entry route may explain the short versus long-lasting transcription. The majority of the studies on defensin and cecropin expression pattern involved inoculation of mosquitoes with large amounts of bacteria, whereas ours was performed by ingestion of blood naturally infected with *W. bancrofti*.

The expression of defensin and transferrin was higher in the first infection (100% infection rate) than in the second (60% infection rate) however, this was not the case for cecropin, which was higher in the second infection. It is possible that the higher transcription level of defensin and transferrin were related to the higher blood parasitemia in the first infection. This observation corroborates with Bartholomay *et al.* (2004), who observed a dose-dependent transcription of defensin bacteria-infected mosquitoes. In the case of cecropin, it is possible that the infected blood used to feed the insects in the second infection contained another pathogen (e.g. bacteria) that may have co-stimulated its expression, since different pathogens may stimulate the expression of specific immune transcripts; however this is only speculation and was not analyzed.

On the contrary to what was found here, Lowenberger *et al.* (1996) did not detect endogenous defensin in *A. aegypti* fed on *Brugia malayi*-infected blood. This may be explained by the different mosquito/filaria pair used for the experiments (different filaria species and different mosquito strains). As previously noted by Li *et al.* (2007) when analyzing entomopathogenic nematodes, there are species-specific responses and the intensity of these response is determined both by the species of nematode and insect host. Filarial worms that complete their development in a competent mosquito may have developed mechanisms to suppress expression of immune molecules, i.e. the co-evolution of compatible vector/parasite pairs may have allowed parasites to manipulate vector's genes (Waterhouse *et al.*, 2007). Guz *et al.* (2007) observed that tsetse flies stably infected with *Trypanosoma* express lower levels of transferrin transcripts than non-infected flies and suggested parasite suppression of insect genes. Moreover, Maizels *et al.* (2001) identified *B. malayi* genes that are partly responsible for immune evasion of the parasite in the mammalian host.

Migration of *W. bancrofti* in *A. aegypti* was faster than in *Culex quinquefasciatus*, as observed before by Albuquerque *et al.* (1999). In *Aedes*, after reaching the thorax, microfilaria differentiated into L1 or L1-sausage, and ceased to develop after that, however a few remained alive until 11 days after infection. Paily *et al.* observed the development of *W. bancrofti* in various mosquito species and could not detect any worms in wild *A. aegypti* at 7 days after infection (Paily *et al.*, 2006). The L1-sausage forms found in *A. aegypti* looked very

different than the ones found in *Culex*, reflecting its abnormal development. Thus, there are clearly factors in this mosquito species that blocks development of *W. bancrofti*. Only two melanization events were observed, strengthening previous observations that melanization is not the main protective mechanism of *A. aegypti* to this filaria species (Albuquerque *et al.*, 1999). The melanization events seen here may have been a mixture of humoral melanization and cellular encapsulation, as described elsewhere (Barillas-Mury *et al.*, 2005), since structures similar to cell-debris were observed next to the melanin layer. It is worth to note that these events occurred in the abdomen at an earlier time-point (2-day post-infection), and in the thorax at a later time-point (5-day post-infection), showing the involvement of at least two tissues in melanization processes. Because photographs of filarial worm development inside insect vectors are scarce in the literature, the microscopy observations registered in this study may provide important material for future comparative studies.

It has been suggested by others that mosquito refractoriness to filarial worms is due to factors present in the hemolymph (Lowenberger *et al.*, 1996). This would make sense, since during migration the worms are in direct contact to the hemolymph. In fact, Towson and Chaitong (1991) showed that when hemolymph of *A. aegypti* was incubated with *B. pahangi* *in vitro*, worm motility decreased, indicating that factors present in the hemolymph could directly affect parasite. Another study demonstrated that transfer of hemolymph from a refractory to a susceptible strain of *A. aegypti* conferred refractoriness to filarial worms in the later (Beerntsen *et al.*, 2000). On the other hand, Wattam and Christensen (1992) suggested that inhibitors of *B. malayi* development in an *A. aegypti* strain refractory to *B. malayi* were produced in the thorax. It is possible that substances in the hemolymph and/or in the thorax are acting upon worms.

The effects of insect immune molecules like defensin and cecropin on eukaryotic organisms, such as filarial worms and *Plasmodium*, is poorly understood, however, there is enough direct and indirect evidence in the literature that they can inhibit parasite development (Albuquerque and Ham, 1996; Chalk *et al.*, 1995a; Gwadz *et al.*, 1989; Jaynes *et al.*, 1988; Lowenberger *et al.*, 1999c; Shahabuddin *et al.*, 1998; Townson and Chaithong, 1991). For example, co-injection of mosquitoes with cecropin or defensin and filarial worms decreases filarial infection in the insect (Albuquerque and Ham, 1996; Chalk *et al.*, 1995a), and injection of bacteria previous to injection of filarial worms stimulates massive production of antimicrobial peptides in mosquitoes and impedes filarial development (Lowenberger *et al.*, 1996).

The advantage for insects on using antimicrobial peptides/proteins over other protective mechanisms such as melanization, is that they can act against a broad range of parasites (e.g. bacteria, fungi, protozoans) and can be produced quickly after infection at a relatively low metabolic cost (Aguilar *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2003; Lowenberger, 2001a). These features suggest they are part of a general immune mechanism employed by the insects to eliminate or control infection by different pathogens (Chalk *et al.*, 1995b; Dimopoulos, 2003). Gene silencing experiments through RNA interference (RNAi) have been helping elucidating the role of mosquito molecules in immune mechanisms towards specific pathogens (Shin *et al.*, 2003). They could also be used to study whether defensin, cecropin and transferrin are in fact involved in the refractoriness of *A. aegypti* to *W. bancrofti*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the team at the insectary at CPqAM responsible for raising the mosquito colonies, to Dr. Fabio A. B. dos Santos, Dr. Luis C. Alves and Sergio S. Silva for help with blood collections and mosquito feedings, and to Gilvan M. da Silva for assistance with the photographs. This work received financial support from the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq, Grant PAPESIV 400092/2006-9).

REFERENCES

- Aguilar, R., Jedlicka, A. E., Mintz, M., Mahairaki, V., Scott, A. L. and Dimopoulos, G.** (2005). Global gene expression analysis of *Anopheles gambiae* responses to microbial challenge. *Insect Biochem Mol Biol* **35**, 709-719.
- Albuquerque, C. M. and Ham, P. J.** (1996). In vivo effect of a natural *Aedes aegypti* defensin on *Brugia pahangi* development. *Medical and Veterinary Entomology* **10**, 397-399.
- Albuquerque, C. M., Cavalcanti, V. M., Melo, M. A., Vercosa, P., Regis, L. N. and Hurd, H.** (1999). Bloodmeal microfilariae density and the uptake and establishment of *Wuchereria bancrofti* infections in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**, 591-596.

- Ayres, C. F., Romao, T. P., Melo-Santos, M. A. and Furtado, A. F. (2002). Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 871-875.
- Barillas-Mury, C., Paskewitz, S. and Kanost, M. R. (2005). Immune Responses of Vectors. In *Biology of Disease Vectors* (ed. Marquardt, W. C.), pp. 363-376. Elsevier Academic Press, Burlington.
- Bartholomay, L. C., Farid, H. A., Ramzy, R. M. and Christensen, B. M. (2003). *Culex pipiens pipiens*: characterization of immune peptides and the influence of immune activation on development of *Wuchereria bancrofti*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **130**, 43-50.
- Bartholomay, L. C., Fuchs, J. F., Cheng, L. L., Beck, E. T., Vizioli, J., Lowenberger, C. and Christensen, B. M. (2004). Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* **13**, 125-132.
- Beerntsen, B. T., James, A. A. and Christensen, B. M. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 115-137.
- Chalk, R., Townson, H. and Ham, P. J. (1995a). *Brugia pahangi*: the effects of cecropins on microfilariae in vitro and in *Aedes aegypti*. *Experimental Parasitology* **80**, 401-406.
- Chalk, R., Albuquerque, C. M., Ham, P. J. and Townson, H. (1995b). Full sequence and characterization of two insect defensins: immune peptides from the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of Biological Sciences* **261**, 217-221.
- Cho, W. L., Fu, Y. C., Chen, C. C. and Ho, C. M. (1996). Cloning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defensin A, from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 395-402.
- Dimopoulos, G. (2003). Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell Microbiology* **5**, 3-14.
- Gao, Y., Hernandez, V. P. and Fallon, A. M. (1999). Immunity proteins from mosquito cell lines include three defensin A isoforms from *Aedes aegypti* and a defensin D from *Aedes albopictus*. *Insect Molecular Biology* **8**, 311-318.
- Guz, N., Attardo, G. M., Wu, Y. and Aksoy, S. (2007). Molecular aspects of transferrin expression in the tsetse fly (*Glossina morsitans morsitans*). *Journal of Insect Physiology* **53**, 715-723.
- Gwadz, R. W., Kaslow, D., Lee, J. Y., Maloy, W. L., Zasloff, M. and Miller, L. H. (1989). Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infection and Immunity* **57**, 2628-2633.
- Harizanova, N., Georgieva, T., Dunkov, B. C., Yoshiga, T. and Law, J. H. (2005). *Aedes aegypti* transferrin. Gene structure, expression pattern, and regulation. *Insect Molecular Biology* **14**, 79-88.
- Jaynes, J. M., Burton, C. A., Barr, S. B., Jeffers, G. W., Julian, G. R., White, K. L., Enright, F. M., Klei, T. R. and Laine, R. A. (1988). In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of the Federation of the American Societies for Experimental Biology* **2**, 2878-2883.
- Lan, Q. and Fallon, A. M. (1992). Sequence analysis of a mosquito ribosomal protein rpL8 gene and its upstream regulatory region. *Insect Molecular Biology* **1**, 71-80.

- Li, X. Y., Cowles, R. S., Cowles, E. A., Gaugler, R. and Cox-Foster, D. L.** (2007). Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *International Journal of Parasitology* **37**, 365-374.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lopez, L., Morales, G., Ursic, R., Wolff, M. and Lowenberger, C.** (2003). Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 439-447.
- Lowenberger, C. A., Ferdig, M. T., Bulet, P., Khalili, S., Hoffmann, J. A. and Christensen, B. M.** (1996). *Aedes aegypti*: induced antibacterial proteins reduce the establishment and development of *Brugia malayi*. *Experimental Parasitology* **83**, 191-201.
- Lowenberger, C. A., Charlet, M., Vizioli, J., Kamal, S., Richman, A., Christensen, B. M. and Bulet, P.** (1999a). Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 20092-20097.
- Lowenberger, C. A., Smartt, C. T., Bulet, P., Ferdig, M. T., Severson, D. W., Hoffmann, J. A. and Christensen, B. M.** (1999b). Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* **8**, 107-118.
- Lowenberger, C. A., Kamal, S., Chiles, J., Paskewitz, S., Bulet, P., Hoffmann, J. A. and Christensen, B. M.** (1999c). Mosquito-*Plasmodium* interactions in response to immune activation of the vector. *Experimental Parasitology* **91**, 59-69.
- Lowenberger, C. A.** (2001a). Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 219-229.
- Lowenberger, C. A.** (2001b). Form, function and phylogenetic relationships of mosquito immune peptides. *Advanced and Experimental Medical Biology* **484**, 113-129.
- Maizels, R. M., Gomez-Escobar, N., Gregory, W. F., Murray, J. and Zang, X.** (2001). Immune evasion genes from filarial nematodes. *International Journal of Parasitology* **31**, 889-898.
- Nichol, H., Law, J. H. and Winzerling, J. J.** (2002). Iron metabolism in insects. *Annual Review of Entomology* **47**, 535-559.
- Paily, K. P., Hoti, S. L. and Balaraman, K.** (2006). Development of lymphatic filarial parasite *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) in mosquito species (Diptera: Culicidae) fed artificially on microfilaremic blood. *J Med Entomol* **43**, 1222-1226.
- Regis, L., Silva-Filha, M. H., de Oliveira, C. M., Rios, E. M., da Silva, S. B. and Furtado, A. F.** (1995). Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**, 115-119.
- Shahabuddin, M., Fields, I., Bulet, P., Hoffmann, J. A. and Miller, L. H.** (1998). *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. *Experimental Parasitology* **89**, 103-112.

- Shin, S. W., Kokoza, V. A. and Raikhel, A. S.** (2003). Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity. *Journal of Experimental Biology* **206**, 3835-3843.
- Townson, H. and Chaithong, U.** (1991). Mosquito host influences on development of filariae. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **85**, 149-163.
- Waterhouse, R. M., Kriventseva, E. V., Meister, S., Xi, Z., Alvarez, K. S., Bartholomay, L. C., Barillas-Mury, C., Bian, G., Blandin, S., Christensen, B. M., et al.** (2007). Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science* **316**, 1738-1743.
- Wattam, A. R. and Christensen, B. M.** (1992). Induced polypeptides associated with filarial worm refractoriness in *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **89**, 6502-6505.
- Yoshiga, T., Hernandez, V. P., Fallon, A. M. and Law, J. H.** (1997). Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **94**, 12337-12342.
- Yoshiga, T., Georgieva, T., Dunkov, B. C., Harizanova, N., Ralchev, K. and Law, J. H.** (1999). *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *European Journal of Biochemistry* **260**, 414-420.
- Zhong, M., McCarthy, J., Bierwert, L., Lizotte-Waniewski, M., Chanteau, S., Nutman, T. B., Ottesen, E. A. and Williams, S. A.** (1996). A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **54**, 357-363.

Table 1: Tissue where filarial worms were found in mosquitoes in the course of 10 days after infection and filaria movement in the mosquitoes. Light microscopy observations of fresh tissue. Parasitemia of blood used to feed mosquitoes = 300 mf/ml.

Species	Day post-infection	% in the abdomen	% in the thorax	% in the head	% filarial worms with movement	% filarial worms with no movement
<i>Aedes aegypti</i> (Rec Lab)						
	1	28	72	0	100	0
	2	33	67	0	77	23
	4	0	100	0	100	0
	5	0	100	0	50	50
	6	0	100	0	50	50
	7	0	100	0	33	67
	10	0	100	0	0	100
<i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSF)						
	1	100	0	0	50	50
	2	60	40	0	40	60
	4	0	0	0	0	0
	5	0	100	0	100	0
	6	0	0	0	0	0
	7	0	100	0	50	50
	10	0	100	0	100	0

Table 2: Tissue where filarial worms were found in mosquitoes in the course of 15 days after infection and filaria movement in the mosquitoes. Light microscopy observations of fresh tissue. Parasitemia of blood used to feed mosquitoes = 700 mf/ml.

Species	Day post-infection	% in the abdomen	% in the thorax	% in the head	% filarial worms with movement	% filarial worms with no movement
<i>Aedes aegypti</i> (Rec Lab)						
	1	0	100	0	100	0
	2	0	100	0	100	0
	4	0	100	0	75	25
	5	0	100	0	33	67
	7	0	100	0	33	67
	9	0	100	0	0	100
	11	0	100	0	00	100
	13	0	100	0	0	100
	15	0	100	0	0	100
<i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSF)						
	1	33	67	0	83	17
	2	100	0	0	0	100
	4	0	100	0	0	100
	5	0	100	0	100	0
	7	0	100	0	100	0
	9	0	100	0	67	33
	11	0	100	0	83	17
	13	0	100	0	100	0
	15	0	33	67	100	0

Table 3: Percentage of mosquitoes infected with *Wuchereria bancrofti* and of each stage of filarial worms, during the course of 10 days post-infection. Light microscopy observations of fresh tissue. Parasitemia of blood used to feed mosquitoes = 300 mf/ml.

Species	Day post-infection	% infected mosquitoes (n)	Average of mf/mosquito	% mf/L1	% L1 Salsichoid	% L2	% L3
<i>Aedes aegypti</i> (Rec Lab)							
	1	60 (10)	1.2	100	0	0	0
	2	40 (10)	2	100	0	0	0
	4	20 (10)	1.5	33	67	0	0
	5	20 (10)	1	100	0	0	0
	6	20(10)	1	50	50	0	0
	7	30 (10)	1.5	100	0	0	0
	10	20 (10)	1	50	50	0	0
<i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSF)							
	1	50 (10)	1.2	100	0	0	0
	2	25 (10)	1.5	100	0	0	0
	4	0 (10)	0	0	0	0	0
	5	10 (10)	1	0	100	0	0
	6	0 (10)	1	0	0	0	0
	7	20 (10)	1	0	100	0	0
	10	20 (10)	1	0	50	50	0

Table 4: Percentage of mosquitoes infected with *Wuchereria bancrofti* and of each stage of filarial worms, during the course of 15 days post-infection. Light microscopy observations of fresh tissue. Parasitemia of blood used to feed mosquitoes = 700 mf/ml.

Species	Day post-infection	% infected mosquitoes (n)	Average of mf/mosquito	% mf/L1	% L1 Salsichoid	% L2	% L3
<i>Aedes aegypti</i> (Rec Lab)							
	1	80 (5)	1.75	100	0	0	0
	2	40 (5)	1.5	100	0	0	0
	4	80 (5)	2	87	13	0	0
	5	67 (6)	1.5	89	11	0	0
	7	40 (5)	1.5	100	0	0	0
	9	40 (5)	1	100	0	0	0
	11	20 (5)	1	100	0	0	0
	13	29 (7)	1	50	50	0	0
	15	10 (10)	1	100	0	0	0
<i>Culex quinquefasciatus</i> (CqSF)							
	1	80 (5)	1.5	100	0	0	0
	2	20 (5)	1	100	0	0	0
	4	20 (5)	1	0	100	0	0
	5	29 (7)	1.5	0	100	0	0
	7	75 (4)	1	0	100	0	0
	9	33 (6)	1.5	0	0	100	0
	11	80 (5)	1.5	0	0	100	0
	13	20 (5)	1	0	0	100	0
	15	33 (6)	1.5	0	0	0	100

Figure 1

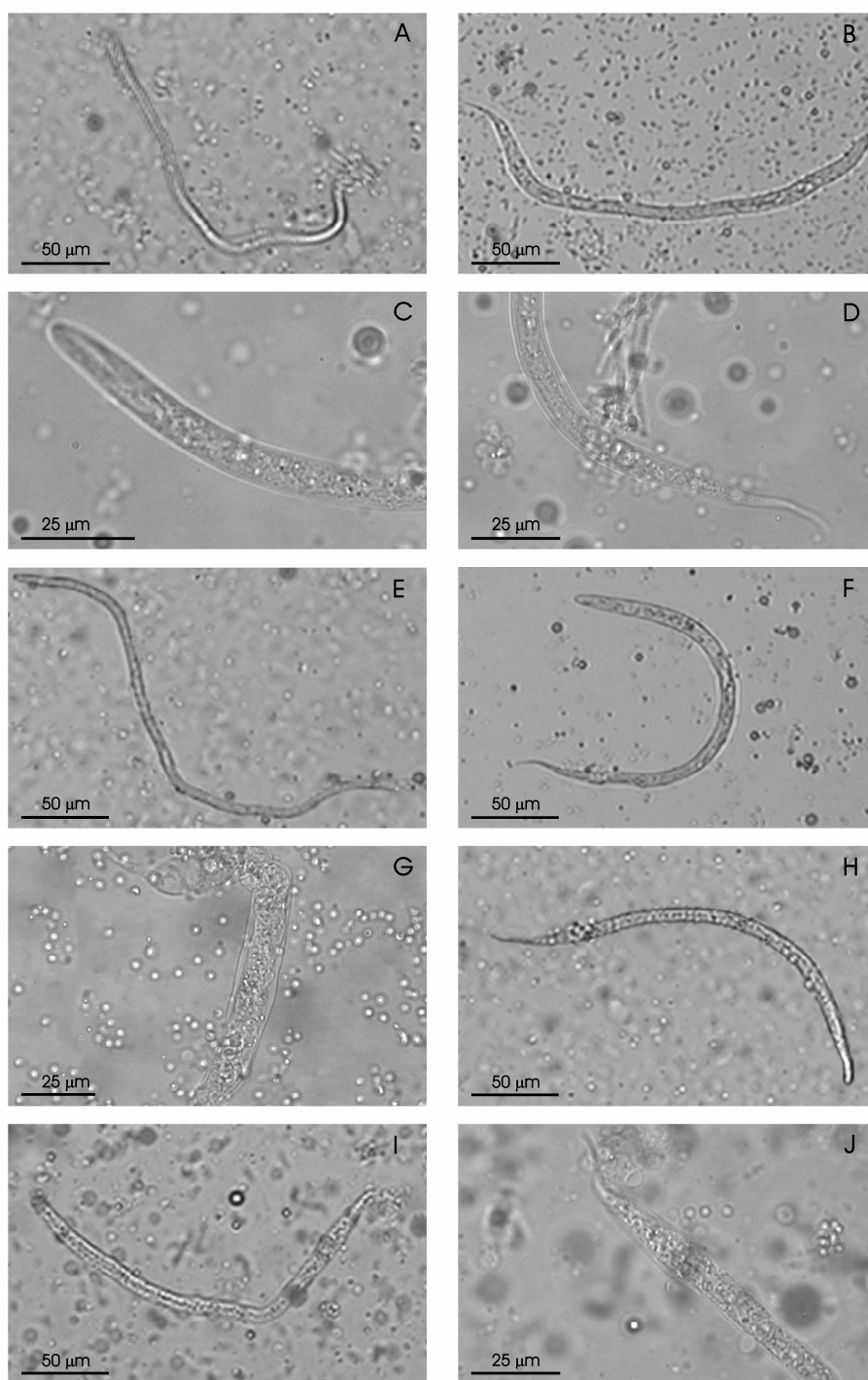


Figure 2

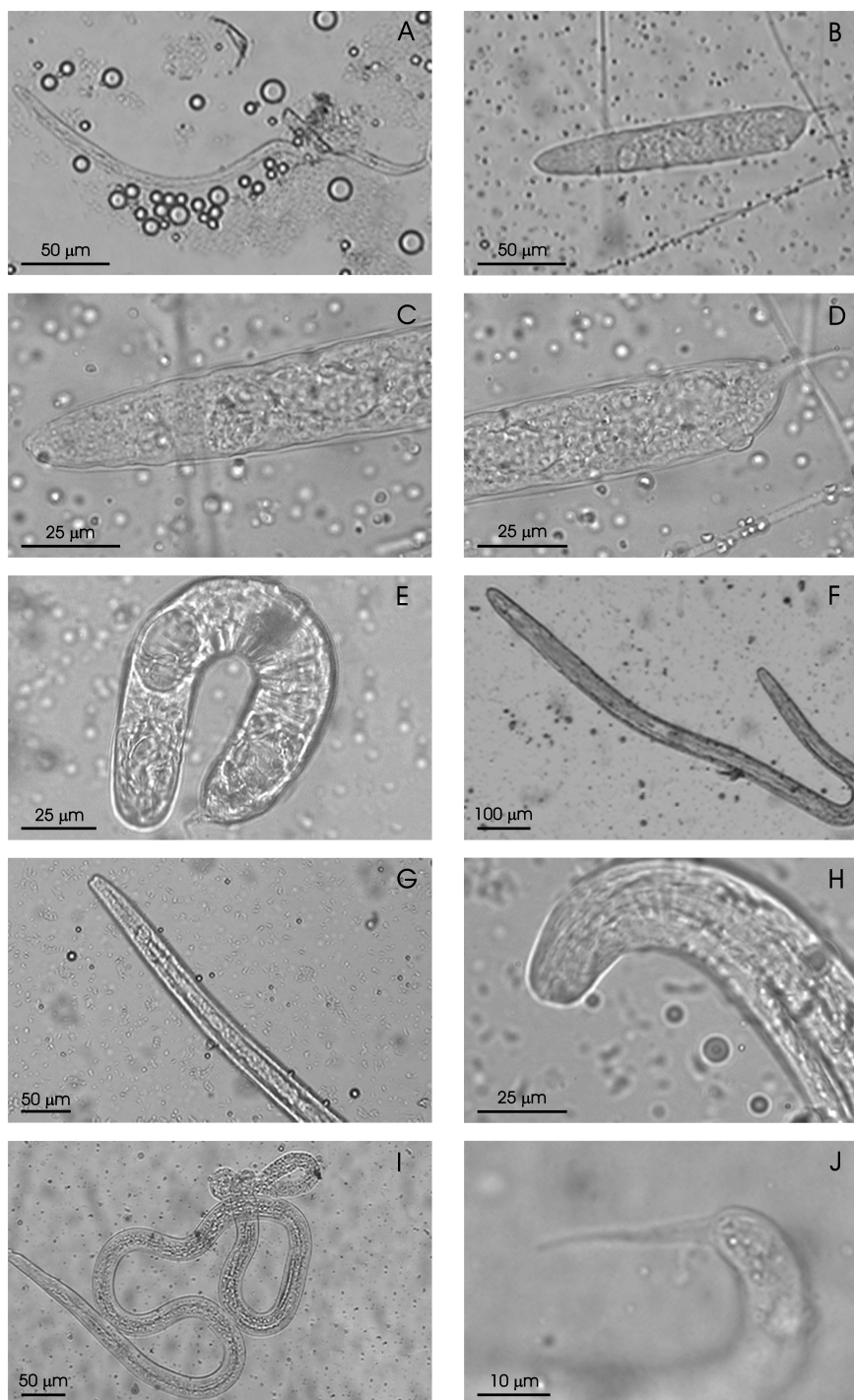


Figure 3

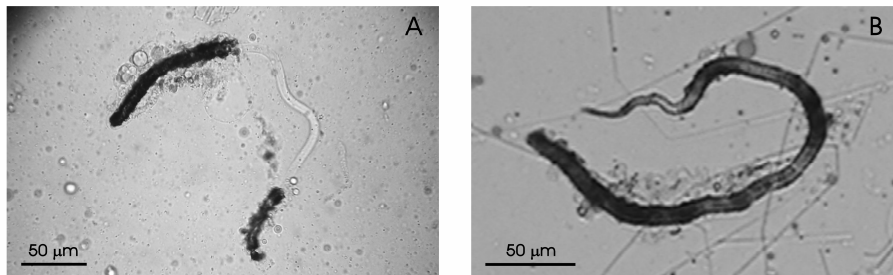
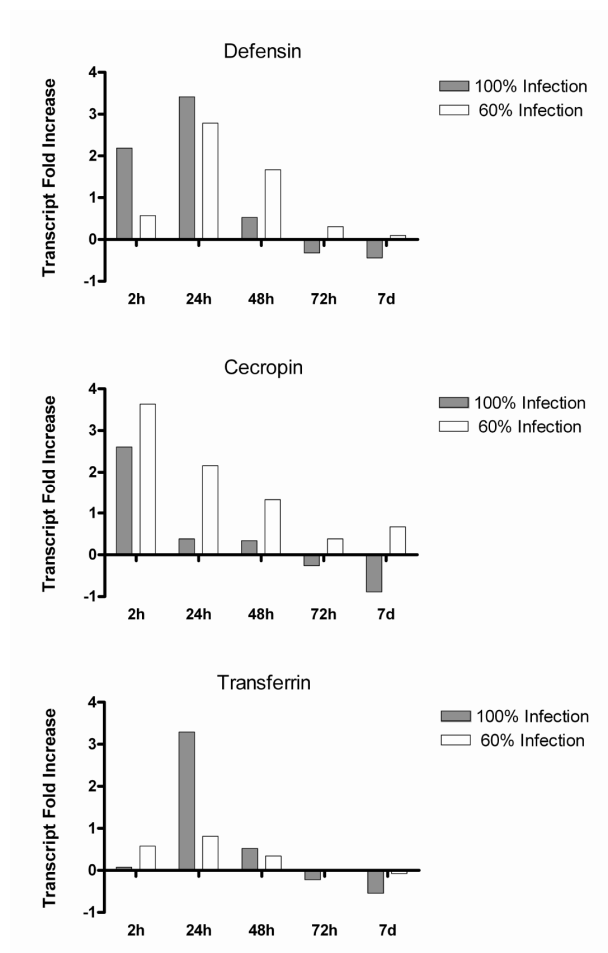


Figure 4



Captions for Figures

Figure 1

Development of *Wuchereria bancrofti* in *Aedes aegypti*. Fresh samples were observed through optical microscopy and were not stained. A: microfilaria (mf) at 2 days post-infection. B: L1 at 2 days post-infection. C: anterior portion of L1 at 4 days post-infection. D: posterior portion of L1 at 4 days post-infection. E: mf at 5 days post-infection. F: L1 at 5 days post-infection. G: L1-sausage 5 days post-infection. H: L1 at 7 days post-infection. I: L1 at 13 days post-infection. J: posterior portion of L1 at 13 days post-infection.

Figure 2

Development of *Wuchereria bancrofti* in *Culex quinquefasciatus*. Fresh samples were observed through optical microscopy and were not stained. No staining was performed. A: L1 at 2 days post-infection. B: L1-sausage at 5 days post-infection. C: anterior portion of L1-sausage at 5 days post-infection. D: posterior portion of L1-sausage at 5 days post-infection. E: L1-sausage at 7 days post-infection. F: L2 at 13 days post-infection. G: anterior portion of L2 at 13 days post-infection. H: posterior portion of L2 at 13 days post-infection. I: L3 at 15 days post-infection. J: posterior end of L3 at 15 days post-infection.

Figure 3

Melanization of *Wuchereria bancrofti* in *Aedes aegypti*. A: *W. bancrofti* melanized in the abdomen of *A. aegypti* at 2 days post-infection. B: *W. bancrofti* melanized in the thorax of *A. aegypti* at 5 days post-infection. These events were observed in separate infections.

Figure 4

Relative expression of defensin, cecropin, and transferrin transcripts in *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wuchereria bancrofti*. Quantitative real-time PCR was performed with mosquitoes collected at the following time points after a blood meal: 2h, 24h, 48h, 72h, and 7 days (7d). The relative fold increase of transcripts in infected compared with non-infected insects were calculated through the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). 100% Infection: experiment where all mosquitoes were found to be infected with *W. bancrofti* at 24h post-blood meal. 60% Infection: experiment where 60% of mosquitoes were found to be infected with *W. bancrofti* at 24h post-blood meal.

ANEXOS

Anexo A – Modelo do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), referente aos indivíduos que possuem o verme da filária no sangue.

Anexo B – Modelo do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), referente aos indivíduos que não possuem o verme da filária no sangue.

Anexo C – Parecer do CEP/CPqAM.

Anexo D – Carta de anuência da Dra. Constância Ayres.

Anexo A – Modelo do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), referente aos indivíduos que possuem o verme da filária no sangue.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Indivíduo que possui o verme da filária no sangue

Nome da Pesquisa: Resposta imune de *Aedes aegypti* a infecção por *Wuchereria bancrofti*

Instituição: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Prezado Sr (a),

Estamos realizando um estudo sobre a filariose para conhecer mais sobre o desenvolvimento do verme causador da doença, chamado de *Wuchereria bancrofti*. Sabemos que este verme é transmitido pela muriçoca, o *Culex quinquefasciatus*. O *Aedes aegypti*, um outro mosquito não é transmissor da doença, pois impede o desenvolvimento do verme no seu organismo. Estamos interessados, portanto em entender quais os mecanismos deste mosquito que matam o verme da filaria.

Para isso, necessitamos coletar amostras de sangue de paciente portador do parasito para realizar a infecção artificial do mosquito *Aedes aegypti* em laboratório e analisar a resposta do mosquito a esta infecção. Necessitamos, portanto, coletar uma amostra de 5 ml de sangue afim de realizar a infecção do mosquito. Será feita coleta de sangue na veia em pacientes portadores dos parasitos. Queremos também esclarecer que os riscos são mínimos, pois a coleta de sangue é um método rotineiramente utilizado para vários tipos de exames diagnósticos e esta coleta será feita por profissional experiente, com seringas e agulhas descartáveis.

Ao participar, o senhor (a) estará contribuindo para ampliar os conhecimentos sobre a relação entre o verme filarial e o mosquito *Aedes aegypti* e tem garantido os seguintes direitos:

1. A garantia de receber resposta à pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, se assim o desejar;
3. A segurança de que não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade;
4. Ser encaminhado ao posto de saúde para receber o tratamento específico recomendado pela Organização Mundial de Saúde.

Solicitamos ainda autorizar também a utilização das informações destas pesquisas em publicações científicas sem que seu nome apareça. Se o senhor (a) concordar em participar do estudo, pedimos que assine este documento, em duas vias, sendo uma delas de sua propriedade, afirmando que entendeu as explicações e que está de acordo.

Eu, _____, RG _____,
Residente à Rua _____,
tendo recebido as informações e esclarecimentos necessários, ciente dos meus direitos acima relacionados, concordo em participar do estudo.

Assinatura do participante _____

Nome do Pesquisador : Dra. Constância Ayres

Telefone: 81- 21012549

Assinatura do pesquisador _____

Obs: Em caso de dúvidas ou questionamentos procurar os pesquisadores do Dept. de Entomologia/CPqAM- Constância Ayres, Maria Alice Varjal, pelos telefones: 21012549, 21012645.

Anexo B – Modelo do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), referente aos indivíduos que não possuem o verme da filária no sangue.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Indivíduo que não possui o verme da filária no sangue

Nome da Pesquisa: Resposta imune de *Aedes aegypti* a infecção por *Wuchereria bancrofti*

Instituição: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Prezado Sr (a),

Estamos realizando um estudo sobre a filariose para conhecer mais sobre o desenvolvimento do verme causador da doença, chamado de *Wuchereria bancrofti*. Sabemos que este verme é transmitido pela muriçoca, o *Culex quinquefasciatus*. O *Aedes aegypti*, um outro mosquito não é transmissor da doença, pois impede o desenvolvimento do verme no seu organismo. Estamos interessados, portanto em entender quais os mecanismos deste mosquito que matam o verme da filaria.

Para isso, necessitamos coletar amostras de sangue de pessoa não infectada a ser usada como grupo controle, e realizar a alimentação artificial do mosquito *Aedes aegypti* em laboratório. Necessitamos, portanto, coletar uma amostra de 5 ml de sangue afim de realizar a alimentação do mosquito. Será feita coleta de sangue na veia da pessoa não portadora do verme. Queremos também esclarecer que os riscos são mínimos, pois a coleta de sangue é um método rotineiramente utilizado para vários tipos de exames diagnósticos e esta coleta será feita por profissional experiente, com seringas e agulhas descartáveis.

Ao participar, o senhor (a) estará contribuindo para ampliar os conhecimentos sobre a relação entre o verme filarial e o mosquito *Aedes aegypti* e tem garantido os seguintes direitos:

1. A garantia de receber resposta à pergunta ou esclarecimento de quaisquer dúvidas sobre os procedimentos, risco e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, se assim o desejar;
3. A segurança de que não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade.

Solicitamos ainda autorizar também a utilização das informações destas pesquisas em publicações científicas sem que seu nome apareça. Se o senhor (a) concordar em participar do estudo, pedimos que assine este documento, em duas vias, sendo uma delas de sua propriedade, afirmando que entendeu as explicações e que está de acordo.

Eu, _____, RG _____,
Residente à Rua _____,
tendo recebido as informações e esclarecimentos necessários, ciente dos meus direitos acima relacionados, concordo em participar do estudo.

Assinatura do participante _____

Nome do Pesquisador : Dra. Constância Ayres

Telefone: 81- 21012549

Assinatura do pesquisador _____

Obs: Em caso de dúvidas ou questionamentos procurar os pesquisadores do Dept. de Entomologia/CPqAM- Constância Ayres, Maria Alice Varjal, pelos telefones: 21012549, 21012645.

Anexo C – Parecer do CEP/CPqAM.

**PARECER**

Título do Projeto: Expressão diferencial de genes que codificam peptídeos antimicrobianos de *Aedes aegypti* em resposta à infecção por *Wuchereria bancrofti*
Pesquisador responsável: Iêda Ferreira de Oliveira
Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ, Departamento de Entomologia
Data de apresentação ao CEP: 28.05.2007
Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 36/07
Registro no CAAE: 0036.0.095.000-07

Prezada Dra. Iêda Ferreira de Oliveira,

Vimos informar que o projeto acima descrito foi avaliado na última reunião do CEP/CPqAM, realizada em 06 do corrente.

Cabe ressaltar que este projeto integra um outro projeto principal denominado "Resposta imune de *Aedes aegypti* à infecção por *Wuchereria bancrofti*" (registro CAAE: 0011.0.095.000-06 e registro 15/06), sob a coordenação da Dra. Constância Ayres, avaliado pelo CEP/CPqAM e aprovado pela CONEP, pois é uma **Pesquisa com Cooperação Estrangeira**.


Deste modo, na análise das considerações éticas foi verificado que:

- As amostras humanas serão cedidas pelo projeto principal, portanto não tem TCLE.
- Foi apresentada Carta de Anuência do pesquisador responsável pelo projeto principal disponibilizando as amostras de sangue humano.
- Presença de um item em metodologia não descrito no projeto principal, mas sem implicação ética.


Diante disto, o CEP/CPqAM indica que as atividades propostas no presente projeto (36/07) seja incorporado no projeto maior (15/06) na forma de complementação de objetivos e de metodologia, uma vez que são partes do mesmo estudo. Para tal, haverá necessidade da Dra. Constância Ayres realizar a complementação do projeto (16/07) e enviar um relatório parcial das atividades realizadas, como que V.Sa. solicite o cancelamento da proposta em pauta. O CEP deliberou para que não tenhamos duplicidade de projetos com condutas divergentes, ou seja, projeto 16/07 aprovado pela CONEP e a proposta em pauta pelo CEP.

O Comitê fica a disposição para esclarecimentos que se façam necessários.


Recife, 12 de dezembro de 2006.


Dr. Zilma Maria de Medeiros
Biomédica
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Anexo D – Carta de anuência da Dra. Constância Ayres.



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



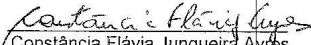
FIOCRUZ
Ministério da Saúde

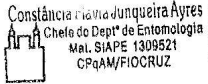
Departamento de Entomologia

Recife, 23 de maio de 2007

CARTA DE ANUÊNCIA

Comunico ao Comitê de Ética em Pesquisa deste Centro que autorizo a utilização de amostras de sangue coletadas em voluntários humanos, no âmbito do Projeto "Resposta imune de *Aedes aegypti* à infecção por *Wuchereria bancrofti*", CAAE: 0011.0.095.000-06, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), do qual sou coordenadora, no sub-projeto **Expressão diferencial de genes que codificam peptídeos antimicrobianos de *Aedes aegypti* em resposta à infecção por *Wuchereria bancrofti***, coordenado por Ieda Ferreira de Oliveira. Estou ciente e de acordo que as referidas amostras sejam utilizadas apenas para a infecção artificial de fêmeas de *Aedes aegypti*.


Constância Flávia Junqueira Ayres
Coordenadora do Projeto
Pesquisadora do Departamento de Entomologia/CPqAM


Constância Flávia Junqueira Ayres
A Chefe do Deptº de Entomologia
MAL. SIAPE 1309521
CPqAM/FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n - Cx. Postal 7472 - Fone: 0XX81 21012500 - Fax: 0XX81 4531911 - CEP: 50670-420
Recife - PE - Brasil - <http://www.cpqam.fiocruz.br>