

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

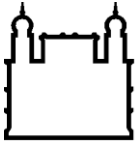
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e
Molecular

β -1.3-glucanases e digestão de leveduras em larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae): Aspectos fisiológicos e moleculares

Raquel Santos Souza

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Raquel Santos Souza

β -1,3-glucanases e digestão de leveduras em larvas de *Aedes aegypti*
Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae): Aspectos fisiológicos e moleculares

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ariel Genta

RIO DE JANEIRO

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S729 Souza, Raquel Santos

β -1,3-glucanases e digestão de leveduras em larvas de *Aedes aegypti*
Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae): aspectos fisiológicos e moleculares /
Raquel Santos Souza – Rio de Janeiro, 2014.

xvi, 107 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 85-101

1. Beta-1,3-glucanases. 2. Beta-1,3-glucanas. 3. Digestão. 4.
Imunidade. 5. *Aedes aegypti*. I. Título.

CDD 616.91852

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RAQUEL SANTOS SOUZA

β -1,3-glucanases e digestão de leveduras em larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae): Aspectos fisiológicos e moleculares

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Ariel Genta

Aprovada em: 26/02/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Denise Valle- IOC/FIOCRUZ (Presidente)

Prof. Dr^a. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha- CPqAM/PE (Membro titular)

Prof. Dr. Ednildo de Alcântara Machado- UFRJ (Membro titular/revisor)

Prof. Dr^a. Renata Schamma Lellis - IOC/FIOCRUZ (Suplente)

Prof. Dr^a. Thaís Irene Souza Riback- PROCC/FIOCRUZ (Suplente)

Rio de Janeiro, 26 de Fevereiro de 2014

Ao Dr. Fernando Ariel Genta, por me emprestar suas próprias asas quando eu achava que já não podia mais voar.

AGRADECIMENTOS

“Não a nós, SENHOR, não a nós, mas ao teu nome dá glória, por amor da tua benignidade e da tua verdade. Salmos 115:1”.

Ao SENHOR DEUS digno de toda glória, honra e poder agradeço por essa dissertação. Sem o favor do Altíssimo esse momento jamais chegaria.

Aos meus pais Antônio e Déa e ao meu irmão Rômulus a minha gratidão eterna por todo amor e dedicação recebidos em todos os momentos.

Agradeço imensamente ao meu orientador Dr. Fernando Ariel Genta, por ter acreditado no meu trabalho e alçado vãos mais altos ao meu lado.

Ao Dr. Hector Diaz Albiter pela parceria na reta final da jornada. Sem a sua ajuda Hector, eu não conseguiria concluir esse trabalho.

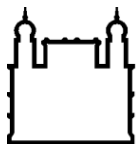
A equipe do laboratório de Bioquímica e Fisiologia de insetos: Dr^a. Patrícia de Azambuja, Dr^a. Daniele Castro e todos os meus colegas de bancada. Um agradecimento especial a Maiara do Valle por ser uma estudante formidável e por ter me ajudado em vários momentos durante esse período e a Dr^a. Caroline da Silva Moraes, que possui uma capacidade intelectual incrível e um coração extremamente gentil.

Ao Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores no IBEX pelos ovos de *Aedes aegypti* gentilmente cedidos para esse trabalho.

As agências financiadoras CAPES, CNPq, FAPERJ e FIOCRUZ.

Ao querido Marcus Vinicius, tão coerente e forte e ao mesmo tempo tão interessado no que eu sinto. A minha gratidão a você meu amor, por ter estado ao meu lado em todos os momentos.

“Então ouvi que toda criatura que há no céu e sobre a terra, debaixo da terra e sobre o mar, e tudo o que neles há, estava dizendo: Àquele que está sentado no trono e ao Cordeiro, seja o louvor, e a honra, e a glória, e o domínio pelos séculos dos séculos” Apocalipse 5-13.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

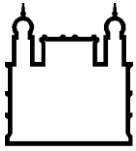
β -1,3-glucanases e digestão de leveduras em larvas de *Aedes aegypti*
Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae): Aspectos fisiológicos e moleculares

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Raquel Santos Souza

β -1,3-glucanases estão envolvidas na digestão de insetos que utilizam como fonte nutricional detritos ou plantas. Nesse trabalho, nós investigamos o papel dos genes da família 16 das glicosídeo hidrolases (GHF 16) em larvas de *Ae.aegypti* e sua possível participação na digestão de leveduras. O genoma de *Ae. aegypti* contém seis genes (Aae GH16. 1 – Aae GH16. 6) que codificam para proteínas da família GH16, contendo de 2 a 6 éxons. Análises filogenéticas sugerem que em Nemátoceros ocorreram duplicações em alguns genes que contêm a região catalítica conservada nessa família de proteínas (Aae GH16. 1, 2, 3, 5, 6). Essas proteínas são similares a outras proteínas de insetos com atividades glucanásicas. A proteína Aae GH16. 4 parece estar relacionada a proteínas ligantes de β -1,3-glucana, não possuindo os resíduos catalíticos conservados e peptídeo sinal. β -, 1,3-glucanases e proteínas ligantes de β -glucana são proteínas homólogas e parecem ter sido originadas a partir do mesmo gene ancestral, antes da diversificação dos holometábolos. Larvas de *Ae. aegypti* possuem atividades de β -1,3 glucanases na cabeça, tubo digestivo e resto do corpo. As atividades encontradas no tubo digestivo não foram atribuídas à dieta das larvas. Essas atividades possuem uma faixa de pH ótimo entre 5-9 e massas moleculares de 41 kDa a 150 kDa. Larvas de *Ae. aegypti* se desenvolvem a partir da eclosão dos ovos até a fase adulta em uma dieta exclusiva contendo leveduras *Ustilago* sp (vivas ou autoclavadas), porém esta condição não provocou uma indução das atividades de β -1,3-glucanases. O homogenato do tubo digestivo das larvas parece lisar a parede das leveduras após 4 h de incubação. Todos os genes da família GH16 foram expressos em todos os tecidos e apresentaram diferentes padrões de expressão. Larvas silenciadas para os genes AeGH 16. 5 da GHF 16 apresentaram fenótipos de curvas de sobrevivência e taxas de pupação inferiores aos controles. Sob condições de estresse, o fenótipo observado nas larvas se agrava consideravelmente, principalmente nos genes AeGH16.1 e AeGH16.6. Nos experimentos de ensaios enzimáticos de β -1,3-glucanases, insetos silenciados para o gene AeGH16. 5 apresentaram uma atividade muito inferior comparados aos silenciados para AeGH16.6 ou aos grupos controles (GFP e água) em amostras de tubo digestivo. Ensaios nesses grupos utilizando o resto do corpo não sofreram alterações. O perfil cromatográfico do tubo digestivo também foi analisado, e novamente insetos silenciados para AeGH16. 5 apresentaram um pico de atividade menor que os demais, sugerindo que esse gene codifica a β -1,3-glucanase intestinal em larvas de *Ae.aegypti*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

OSWALDO CRUZ INSTITUTE

β -1,3-glucanases and digestion of yeasts in *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) larvae: Physiological and Molecular aspects

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Raquel Santos Souza

Insect β -1, 3-glucanases are involved in digestion of detritus and plant hemicellulose. We investigated the role of GH16 genes in *Ae.aegypti* larvae, and its putative participation in digestion of fungi. The genome of *Ae.aegypti* contains six genes coding for GH16 proteins (Aae GH16.1 – Aae GH16.6), containing 2-6 exons. Phylogenetic analysis suggests that Aae GH16.1, 2, 3, 5 and 6, which contain the GH16 conserved catalytic residues, are related to other insect glucanases. These genes apparently suffered duplications in the genomes of Nematocera. Aae GH16.4 is related to β -1,3-glucan binding proteins, which have no catalytic activity. β -1,3-glucanases and β -glucan binding proteins are homologous proteins, which originated by gene duplication prior to the origin of the Holometabola. *Ae.aegypti* larvae contain β -1, 3-glucanase activity in the head, gut and rest of body. Gut activity is not acquired from food. These activities have optimum pH about 5-6 and molecular masses between 41 and 150 kDa. *Ae.aegypti* develops well from egg to adults feeding only on live or autoclaved yeasts and activity of β -1, 3-glucanases is not induced by both diets. Larval gut homogenates lyse live *Ustilago* sp after 4 hours of incubation. All GH16 genes showed different levels of expression in the larval head, gut or rest of body. Larvae knock-down of gene AeGH16.5 of GHF 16 showed phenotype with survival curve and rate of pupation lower than controls (GFP and water). However, under stress conditions severe mortalities are observed in AeGH16.1 and AeGH16.6 knocked-down larvae. Enzymatic assays of β -1, 3-glucanase in AeGH16.5 silenced larvae exhibited lower activity in the gut and no change in the rest of body. Chromatographic activity profiles from gut samples after GH16.5 silencing showed lower activity, suggesting that this gene codes for the larval digestive β -1,3-glucanase.

ÍNDICE

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Importância e diversidade dos insetos.....</i>	1
1.2 <i>O Aedes aegypti e sua importância médica.....</i>	3
1.3 <i>Arboviroses transmitidas por Ae.aegypti.....</i>	6
1.3.1 <i>Dengue.....</i>	6
1.3.2 <i>Febre amarela urbana (FAU).....</i>	8
1.3.3 <i>Chikungunya (CHIKV).....</i>	8
1.4 <i>Digestão em Insetos.....</i>	9
1.4.1 <i>Etapas da digestão em Insetos.....</i>	11
1.4.2 <i>Enzimas digestivas e digestão de micro-organismos.....</i>	12
1.5 <i>Ocorrência de β-1,3-glucanas.....</i>	14
1.6 <i>Ocorrência e classificação de β-1,3-Glucanases.....</i>	14
1.6.1 <i>β-1,3-glucanases em Insetos.....</i>	16
1.6.2 <i>Proteínas ligantes de β-glucanas (βLP/βRP).....</i>	18
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVO GERAL.....	21
3.1 <i>Objetivos específicos.....</i>	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 <i>Criação e manutenção de insetos.....</i>	22
4.2 <i>Dissecções das larvas.....</i>	22
4.3 <i>Preparações das leveduras Ustilago sp para alimentação das larvas.....</i>	23

4.4	<i>Alimentações com leveduras</i>	23
4.5	<i>Ensaio de atividade lítica do extrato do tubo digestivo sobre células de Ustilago sp</i>	24
4.6	<i>Caracterizações bioquímicas</i>	25
4.6.1	Ensaio enzimático de β -1,3-glucanases	25
4.6.2	Determinação de proteínas	25
4.6.3	Efeito do pH na atividade enzimática	26
4.6.4	Cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 (GE Healthcare)	26
4.6.5	Identificação dos genes da família 16 das glicosídeo hidrolases no genoma de <i>Ae.aegypti</i> ..	27
4.6.6	Alinhamento das sequências obtidas e análise da árvore consenso	27
4.6.7	Extração de RNA total e RT para síntese de cDNA	27
4.6.8	PCR e RT-PCR semi-quantitativo	28
4.6.9	Eletroforese de DNA em gel de agarose e análise densitométrica	29
4.6.10	Preparação de dsRNA	30
4.6.11	Silenciamento por RNAi e ensaios biológicos	30
5	RESULTADOS	32
5.1	<i>Análises bioinformáticas e identificação de GH16 no genoma de Ae.aegypti</i>	32
5.1.1	Identificações e análises dos genes pertencentes à família 16 das glicosídeo hidrolases	32
5.1.2	Análise filogenética das sequências de glicosídeo hidrolases da família 16 em diferentes ordens de insetos	36
5.2	<i>Caracterização bioquímica em larvas de Ae.aegypti</i>	39
5.2.1	Distribuição tecidual da atividade β -1,3-glucanásica	39
5.2.3	Efeito do pH nas atividades β -1,3 glucanásicas presentes nos diferentes tecidos	41
5.2.4	Determinação da massa molecular de β -1,3-glucanases	43
5.3	<i>Digestão de leveduras e indução de β-1,3-glucanases em larvas de Ae.aegypti</i>	45
5.3.1	Parâmetros fisiológicos de larvas alimentadas com leveduras	45
5.3.2	A atividade de β -1,3-glucanases em larvas alimentadas com leveduras	50
5.4	<i>Caracterização da expressão de genes da GHF 16 em larvas de Ae.aegypti</i>	54
5.4.1	Expressão dos genes GHF16 nos diferentes tecidos	54
5.4.2	Cálculo das expressões relativas dos genes de GHF16	56
5.5	<i>Investigação das funções de proteínas da GHF16 em larvas de Ae.aegypti</i>	59
5.5.1	Silenciamento dos genes que codificam para proteínas da GHF16	59
5.5.2	Atividades de β -1,3-glucanases em larvas silenciadas	63
6	DISCUSSÃO	67
6.1	<i>Busca e análise das sequências de proteínas da GHF 16 no genoma de Ae.aegypti</i>	67

6.2 Atividade e caracterização de β -1,3-glucanases em larvas de <i>Ae.aegypti</i>	70
6.3 Alimentação, digestão e indução de β -1,3-glucanases nas larvas de <i>Ae.aegypti</i> com leveduras ..	74
6.4 Expressão de genes da GHF 16 e padrão de expressão tecidual em larvas de <i>Ae.aegypti</i>	77
6.5 RNAi em larvas de <i>Ae.aegypti</i>	78
7. CONCLUSÕES	84
8 REFERÊNCIAS	85
9 ANEXOS	102
9.1 ANEXO 1- Tabela com os códigos utilizados na árvore consenso.....	102
9.2 ANEXO 2 – Tabela com a porcentagem dos aminoácidos dos genes de GHF 16	105

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	LEGENDA	PÁGINA
INTRODUÇÃO		
Figura 1.1	Número de espécies conhecidas dos seres vivos e proporções entre os grandes grupos.	2
Figura 1.2	Distribuição do <i>Ae. aegypti</i> nas Américas	5
Figura 1.3	Fêmea adulta de <i>Ae. aegypti</i> (Linnaeus) no processo de alimentação sanguínea no hospedeiro humano.	5
Figura 1.4	Distribuição dos casos de dengue notificados em 2010.	7
Figura 1.5	Média anual do número de casos reportados de FD/FDH	8
Figura 1.6.	Representação esquemática generalizada do tubo digestivo dos insetos	11
Figura 1.7	Representação esquemática das três fases de digestão em insetos	12
RESULTADOS		
Figura 5.1	Diagrama esquemático de éxons e íntrons	33
Figura 5.2.	Alinhamento (programa ClustalX) das sequências de aminoácidos	35
Figura 5.3.	Cladograma das sequências de proteínas de β -1,3-glucanases e proteínas ligantes de β -1,3-glucanas de insetos.	37
Figura 5.4	Atividades β -1,3- glucanásicas nos diferentes tecidos	40
Figura 5.5.	Efeito do pH nas atividades β -1,3glucanásicas	42
Figura 5.6.	Perfis de atividade sobre laminarina após cromatografia de filtração em gel coluna Superdex 200/AKTA FPLC.	44
Figura 5.7	Medidas das massas de larvas de <i>Ae. aegypti</i> alimentadas com diferentes dietas	46
Figura 5.8.	Medidas das massas corporais de <i>Ae. aegypti</i> após alimentação	47
Figura 5.9.	Desenvolvimento ao longo dos dias em diferentes dietas contendo ração de gato (controle) ou <i>Ustilago</i> sp.	48
Figura 5.10.	Mortalidade acumulada de <i>Ae. aegypti</i> após desenvolvimento em diferentes dietas	48
Figura 5.11	Lise de células de <i>Ustilago</i> sp em meio hipotônico durante incubação com extrato do homogenato de tubo digestivo das larvas de <i>Ae. aegypti</i> .	49

Figura 5.12. Atividades de β -1-3-glucanases (substrato laminarina) nos diferentes tecidos das larvas de <i>Ae.aegypti</i> .	51
Figura 5.13 Atividades de β -1-3-glucanases (substrato laminarina) nos diferentes tecidos das larvas de <i>Ae.aegypti</i> .	53
Figura 5.14 Amplificação por PCR de fragmentos dos genes que codificam para proteínas GHF16	54
Figura 5.15 Amplificação de fragmentos dos transcritos que codificam proteínas GHF16.	57
Figura 5.16. Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas GHF 16 em larvas de <i>Ae.aegypti</i> .	57
Figura 5.17 Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas da GHF 16 na cabeça das larvas de <i>Ae.aegypti</i> .	58
Figura 5.18 Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas da GHF 16 no tubo digestivo das larvas de <i>Ae.aegypti</i> .	58
Figura 5.19 Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas da GHF 16 no resto do corpo das larvas de <i>Ae.aegypti</i> .	60
Figura 5.20 Curva de sobrevivência de larvas de <i>Ae.aegypti</i> após tratamento com dsRNA ao longo dos dias.	61
Figura 5.21 Percentual de larvas e pupas de <i>Ae.aegypti</i> nos diferentes grupos após tratamento com dsRNA.	62
Figura 5.22. Mortalidade e sobrevivência de larvas de <i>A aegypti</i> tratadas com dsRNA.	63
Figura 5.23. Níveis de expressão dos genes GH1, GH4, GH5 e GH6	65
Figura 5.24 Atividade enzimática de β -1,3-glucanase (substrato laminarina) nas frações solúveis do tubo digestivo (A) e resto do corpo (B) de larvas de <i>Ae.aegypti</i>	65
Figura 5.25 Perfis de atividade de β -1,3-glucanase (substrato laminarina) após cromatografia de filtração em gel (coluna Superdex 200/AKTA-FPLC)	66

ÍNDICE DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1.1 Estrutura, ocorrência e função das principais β -glucanas encontradas na natureza. 14

Tabela 1.2 Classificação enzimática de β -1,3-glucanases e grupos de organismos onde são encontradas. 15

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 4.1 Sequências de iniciadores oligonucleotídicos utilizados para RT-PCR semi quantitativo. 29

Tabela 4.2. Sequências de iniciadores oligonucleotídicos. 31

RESULTADOS

Tabela 5.1 Resumo das características das sequências de genes da família 16 das glicosídeo Hidrolases. 34

LISTA DE ABREVIações

AMPSO – Ácido N-(1,1-Dimetil-2-hidroxi-etil)-3-amino-2-hidroxi-propanosulfônico (N-(1,1-Dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid)

BCA – Ácido biochinchonínico (Bicinchoninic Acid)

CAPS -- Ácido-3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico

CAZY -- Carbohydrate-Active Enzymes

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention)

CDD -- Conserved Domains Database

cDNA – Ácido desoxiribonucleico complementar (complementary Deoxyribonucleic Acid)

DNS- Ácido dinitrosalicílico (Dinitrosalicylic Acid)

dNTP – Desoxiribonucleotídeo trifosfato (Deoxyribonucleotide triphosphate)

E.C. – Classe enzimática (Enzyme Commission)

E64 -- (1 - [L - N - (trans - epoxysuccinyl) - leucyl] amino - 4 - guanidinobutane)

EPSPS – Ácido 3-[4-(2-Hidroxi-etil)-1-piperazinil]- propanosulfônico (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid)

GH -- Glicosídeo hidrolase

GH16 – Glicosídeo hidrolase da família 16

GNBP – Proteína ligante de gram-negativas (Gram Negative Binding Protein)

HEPES – ácido (4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-ethanosulfônico(4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid)

IA – Intestino anterior

IM – Intestino médio

IP – Intestino posterior

L2- Segundo estágio larval

L4 – Quarto estágio larval

LPS – Lipopolissacarídeo

MP – Membrana peritrófica

NCBI – Centro Nacional para Informação Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)

PG – Peptidoglicano

PMSF – Fenilmetilsulfonil fluoreto (Phenyl Methyl Sulfonil Fluoride)

PO -- Fenoloxidase (Phenoloxidase)

ProPO – Profenoloxidase (ProPhenoloxidase)

PRR- Receptores de reconhecimento de patógeno (Pathogen Recognition Receptor)

RNA – Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)

RT – Transcriptase Reversa (Reverse Transcriptase)

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa (Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction)

U – Unidade de atividade enzimática

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

βLP -- Proteína ligante de β-glucana (β-glucan Ligand Protein)

βRP-- Proteína de reconhecimento de β-glucanas (β-glucan Recognition Protein)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância e diversidade dos insetos

Os insetos são o maior componente da biodiversidade macroscópica encontrada no planeta Terra. Atualmente, o número de espécies descritas no grupo dos insetos é estimado em quase um milhão (Wheeler 1990; Dajoz 1998; Moczek 2010) (Figura 1.1). Insetos ocorrem em quase todos os habitats existentes (excetuando-se os marinhos e polares) e são frequentemente abundantes e facilmente dispersos. São extremamente importantes para os ecossistemas terrestres e aquáticos. As especializações alimentares de diferentes grupos de insetos incluem ingestão de detritos, material em decomposição, madeira morta e viva, fungos, filtração aquática e alimentação de fitoplâncton, herbivoria (incluindo sucção de seiva), predação e parasitismo. Podem viver na água ou na terra (sobre ou sob o solo) durante suas vidas inteiras ou parte delas. O seu tipo de vida pode ser solitário, gregário, subsocial ou altamente social. Os ciclos de vida dos insetos permitem a sobrevivência diante de uma ampla distribuição de condições, tais como extremos de frio e calor, umidade e seca e climas imprevisíveis (Rosemberg 1986; Grimaldi e Engel 2005).

A participação dos insetos é essencial na reciclagem de nutrientes, na propagação de plantas, incluindo polinização e dispersão de sementes, manutenção da composição e da estrutura da comunidade de plantas, alimentação para vertebrados insetívoros e manutenção da estrutura da comunidade de animais (Richards e Sherman 1977). A relação dos insetos com a sociedade humana oferece inúmeros benefícios, contribuindo para nossa alimentação e com os materiais que usamos. O mel fornecido pelas abelhas e o processo de polinização realizado pelas mesmas é extremamente importante para a economia mundial (Winfrey *et al* 2009), e os serviços ao ecossistema de besouros e percevejos predadores, ou vespas parasitas que controlam pragas, valem bilhões de dólares anualmente. Outros exemplos são a utilização da quitina extraída dos insetos como um composto químico, outros derivados que atuam como anticoagulantes, a seda dos casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e de espécies relacionadas que são usadas na fabricação de tecidos há séculos, e o corante carmim utilizado nos alimentos provenientes de cochonilhas. Algumas características de certos insetos os fazem

modelos úteis para entender processos biológicos gerais, como é o caso da mosca-da-banana *Drosophila melanogaster*.

Os insetos também estão intimamente associados com nossa sobrevivência, uma vez que certos insetos causam danos à nossa saúde os mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* ou *Anopheles* são importantes veiculadores de doenças infecciosas para o homem. Outros insetos afetam de forma negativa nossa agricultura e horticultura, como a lagarta do cartucho do milho - *Spodoptera frugiperda*, a broca do feijão - *Zabrotes subfasciatus* e a broca da cana - *Diatraea saccharalis*. Alguns insetos podem atuar também como parasitas ou transmissores de doenças para plantas ou animais domésticos, como cigarras e moscas hematófagas. O estudo da relação dos insetos com os homens, animais, plantas e o meio ambiente se tornam imprescindíveis para gerar novos conhecimentos, criar diferentes formas de manejo para a conservação da biodiversidade entomológica e para o controle de danos causados por algumas espécies.

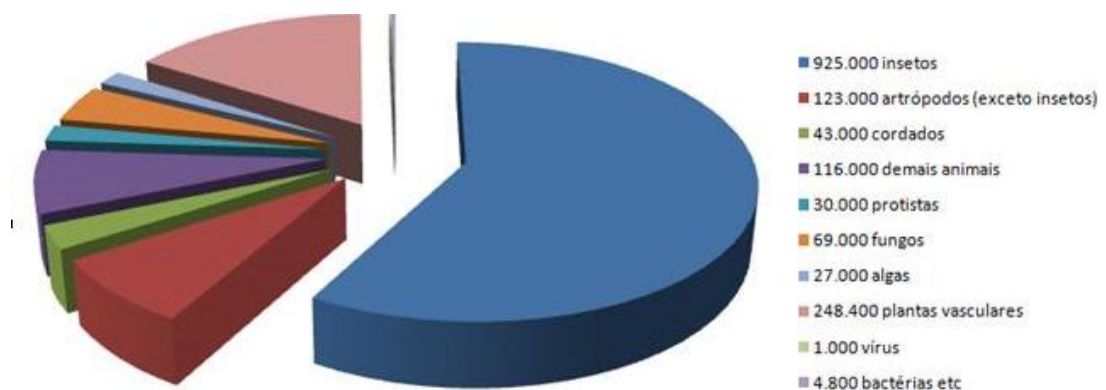


Figura 1.1 Número de espécies conhecidas dos seres vivos e proporções entre os grandes grupos. Fonte: Grimaldi e Engel 2005

1.2 O *Aedes aegypti* e sua importância médica

O *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) é o mosquito transmissor do vírus da dengue de maior importância epidemiológica nas Américas. Também está associado à veiculação de outros agentes etiológicos como a febre amarela urbana e mais recentemente o vírus chikungunya (Pialoux *et al.* 2007; Weaver 2010). O gênero *Aedes* compreende em torno de 900 espécies, distribuídas em 47 subgêneros, dos quais nove são encontrados nas Américas (Forattini 2002).

A espécie *Ae. aegypti* apresenta um alto grau de antropofilia, e sua distribuição geográfica é considerada mundial, sendo encontrada de forma endêmica em mais de 100 países tropicais e subtropicais, predominando em áreas urbanas e periurbanas (Figura 1.2) (Braks *et al.* 2004, Braga e Valle 2007, WHO 2009, Scott e Takken, 2012). Originário da África acredita-se que o mosquito tenha se difundido no Brasil e em outros países através de navios durante o período colonial (Christophers 1960, Lounibos 2002). Ocorreram períodos de erradicação e re-erradicação no histórico do mosquito no Brasil entre as décadas de 1950 e 1970 (Consoli e Lourenço 1994). No ano de 1955, o Brasil participou da campanha de erradicação continental, coordenada pela Organização Pan-americana de saúde e a Organização mundial de saúde (Soper 1964; Donalísio 1999; Löwy 1999) obtendo êxito na erradicação do vetor (Franco 1969). Essa erradicação foi oficialmente reconhecida em uma conferência sanitária, no ano de 1958 (Funasa 2002). Entretanto, em 1967 foi divulgado a re-introdução do mosquito no país e somente em 1973 o vetor *Ae. aegypti* foi considerado re-erradicado (Nobre *et al.* 1994; Funasa 2002). Em função das falhas de vigilância epidemiológica e mudanças sociais e ambientais, no ano de 1976 o mosquito reapareceu nos estados do Rio grande do Norte e no Rio de Janeiro, sendo adotadas medidas de controle pelo governo até os dias atuais (Ministério da saúde 2003).

A ampliação do território de *Ae. Aegypti* deve-se a uma série de fatores como o intenso fluxo migratório rural-urbano, mudanças demográficas e condições sanitárias precárias. As fêmeas têm preferência pela ovoposição em criadouros artificiais e estão adaptadas às modificações feitas pelo homem no ambiente, são extremamente sinantrópicas. A alta resistência dos ovos a longos períodos de seca e a proximidade destes à lâmina d'água fazem com que a pluviosidade esteja

diretamente associada à densidade populacional do mosquito (Consoli e Lourenço 1994; Lourenço e Coura 2005).

A possibilidade de se existir mais de uma alimentação sanguínea para que se complete a ovogênese pelas fêmeas de *Ae. aegypti*, processo conhecido como discordância gonotrófica, tem grande interesse epidemiológico. Quanto maior o número de alimentações sanguíneas realizadas pelos mosquitos, maiores serão as probabilidades de ele se infectar e transmitir os agentes infecciosos. Seu hábito de alimentação é em geral diurno com aumento da atividade hematofágica no período crepuscular, mas também podem agir oportunisticamente picando mesmo à noite, a partir de seus locais de abrigo. Esse fato se deve a íntima associação do mosquito com o homem, pois encontram diversos abrigos nas casas enquanto digerem o sangue ingerido, processo conhecido como endofilia (Christophers 1960; Lourenço e Coura 2005).

Os mosquitos do gênero *Aedes* são taxonomicamente classificados na ordem Diptera, família Culicidae, tribo Aedini. Assim como os outros culicídeos é um inseto holometábolo compreendendo quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (em quatro estádios), pupa e adulto. As formas larvais são aquáticas e vivem em criadouros temporários onde encontram disponível matéria orgânica particulada, principalmente detritos e microorganismos, tais como bactérias, fungos e microalgas (Merritt *et al.* 1992; Rejmánková *et al.* 2000; Von Dungern e Briegel, 2001; Souza-Neto, Gusmão e Lemos 2003). As pupas não se alimentam e permanecem no ecótopo aquático até a emergência dos adultos, que irão ocupar o ambiente terrestre. Os adultos são fitófagos, se alimentando de seiva vegetal, e as fêmeas também se alimentam de sangue, fonte nutricional fundamental para a produção de ovos (Figura 1.3) (Forattini 1996).

As aplicações de compostos químicos, como uma tentativa de controle do vetor, e seu uso indiscriminado em várias regiões do mundo vêm disseminando resistência em algumas populações dessa espécie de mosquito (Macoris *et al.* 2003; Loke *et al.* 2010; Lima *et al.* 2011).

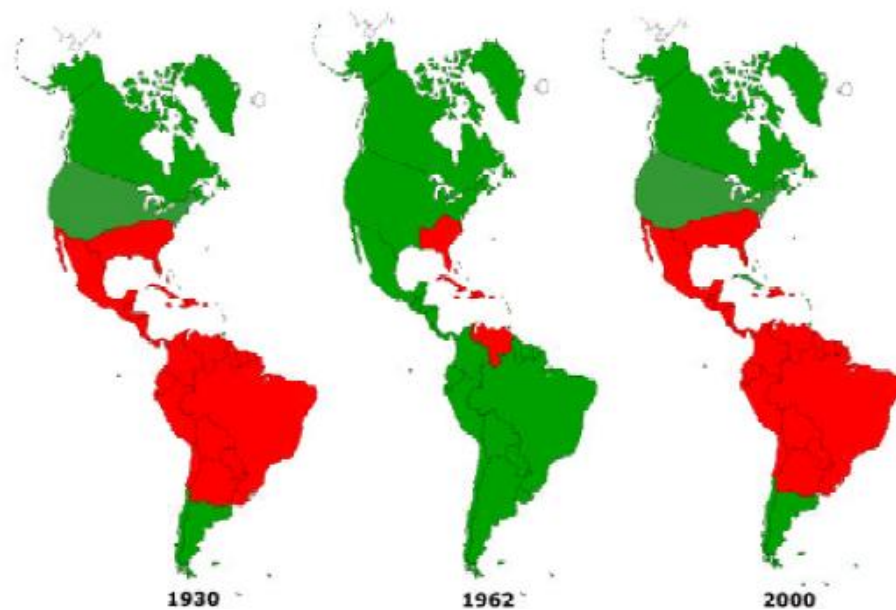


Figura 1.2 Distribuição do *Ae. aegypti* nas Américas: 1930, 1962 e 2000. Áreas em vermelho indicam a presença do mosquito, e áreas verdes indicam países aonde este foi erradicado ou não está presente. Fonte: OPAS/OMS.



Figura 1.3 Fêmea adulta de *Ae. aegypti* (Linnaeus) no processo de alimentação sanguínea no hospedeiro humano, após ter penetrado a superfície da pele com suas peças bucais perfurantes. Fonte: James Gathany, Center for Disease Control Public Health, University of Florida. [http://orange.ifas.ufl.edu/mg/mg_compendium/pdffiles/in/IN79200.pdf]

1.3 Arboviroses transmitidas por *Ae. aegypti*

Arbovírus dependem de artrópodes para a sua transmissão. Os mosquitos destacam-se entre os artrópodes vetores por serem os principais transmissores das arboviroses mais importantes para o homem na atualidade, tais como dengue, febre amarela, febre do Oeste do Nilo e algumas encefalites (Lourenço e Coura, 2005).

1.3.1 Dengue

Dengue, também conhecida como febre do dengue (FD), é uma doença infecciosa grave e amplamente distribuída nas Américas (Figura 1.4). Os vetores responsáveis pela transmissão da dengue são mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (Diptera: Culicidae), sendo incriminadas várias espécies do subgênero *Stegomyia* (tais como: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis*). Entretanto, os principais vetores primários da doença são mosquitos da espécie *Ae. aegypti* (Braga e Valle 2007). O *Ae. albopictus* é, nos dias de hoje, um vetor de importância secundária na Ásia, mais associado a transmissão no meio rural ou semi-urbano (Huber *et al.* 2000; Gratz 2004). É uma arbovirose essencialmente tropical e urbana. O agente etiológico é um vírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos que infectam o homem caracterizado até o momento: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gubler e Clark 1995; San Martin *et al.* 2010). Os sorotipos não estão relacionados antigenicamente, mas podem fornecer imunidade cruzada temporária entre si (Jacobs 2000). Recentemente um grupo de pesquisa anunciou a descoberta de um novo sorotipo presente em uma população da Malásia, o DENV-5 (<http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>).

Atualmente, 2.5 bilhões de pessoas, ou 40% da população mundial, vivem em áreas de risco para transmissão de dengue (Nathan e Nayal-Drager, 2007). O vírus é endêmico em quase 100 países em diferentes continentes como Ásia, Américas e África (Figura 1.5). A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que entre 50 a 100 milhões de infecções ocorram anualmente, incluindo 500.000 casos da forma mais grave da doença, recentemente classificada pelo ministério da saúde como dengue grave e 22.000 casos de óbitos registrados (Braga e Valle 2007; WHO 2009; San Martin *et al.* 2010).

A dengue é a arbovirose com maior incidência no Brasil, e as regiões Centro-oeste e Sudeste são as que registraram o maior número de notificações de casos da

doença no ano de 2013 (Ministério da saúde 2013). As demais regiões, por ordem de incidência de casos de dengue são: Nordeste, Norte e Sul (Rigau-Pérez *et al.* 1998). O país é responsável pelo maior número de casos da doença notificados anualmente à OMS, tendo confirmado algo em torno de 3.5 milhões de casos entre os anos 2000 e 2005 (Coelho *et al.* 2008; Roriz-Cruz *et al.* 2010). Até o momento não existem vacinas prontas para o uso na população ou quimioterápicos efetivos contra a doença (Ranson *et al.* 2010; San Martin *et al.* 2010).

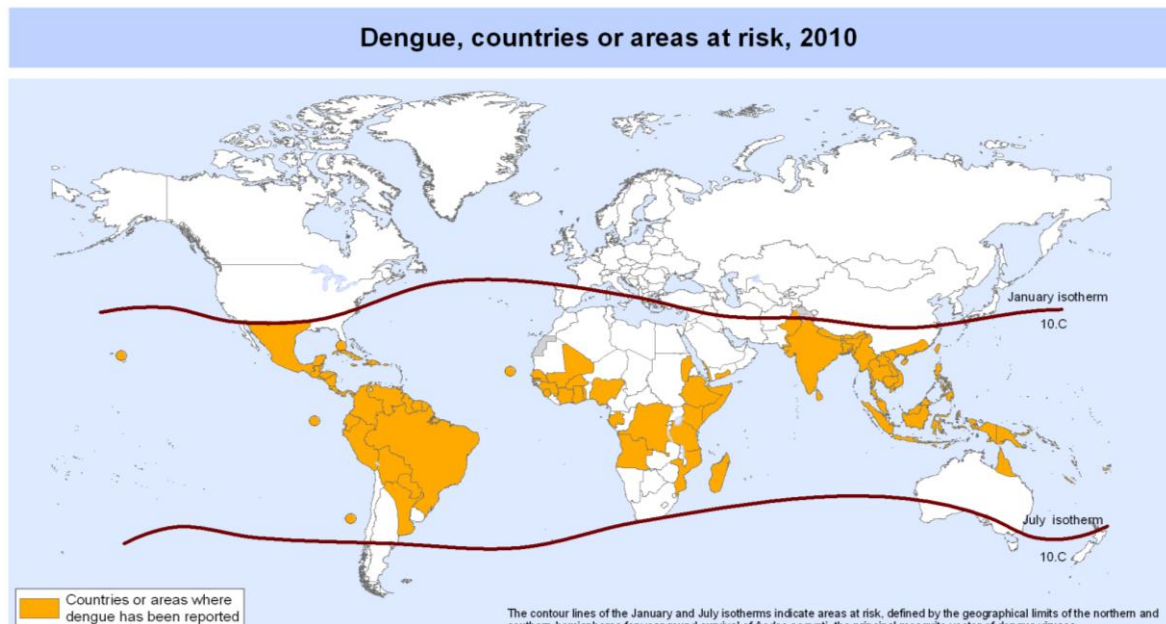


Figura 1.4 Distribuição dos casos de dengue notificados em 2010. Fonte: WHO [http://mapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png]

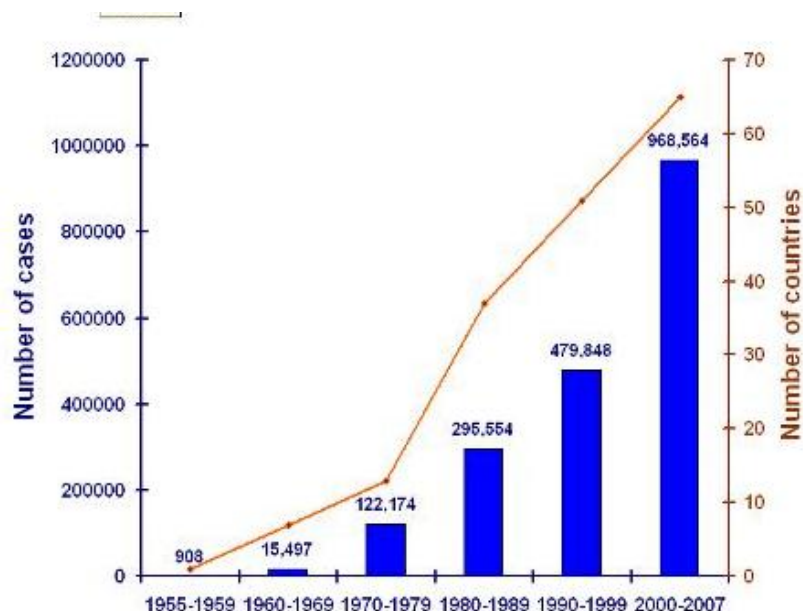


Figura 1.5 Média anual do número de casos reportados de FD/FDH e média anual do número de casos notificados em diferentes países nos anos de 1955 e 2007. Fonte: WHO [<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>].

1.3.2 Febre amarela urbana (FAU)

Febre amarela urbana é uma doença infecciosa não-contagiosa, causada por um Flavivírus (Weastaway 1985) e transmitida pelo mosquito *Ae. aegypti* nas grandes cidades. Eliminou-se a forma urbana nas Américas em 1954, mas ainda hoje existem notificações de casos no continente Africano. No Brasil, devido a uma intensa vacinação nas duas primeiras décadas do século XX, associadas ao combate ao vetor, a erradicação data de 1942, período em que os últimos casos de FAU foram notificados no país (Strode 1951; Franco 1969; Nobre *et al.* 1994; Monath 2001).

1.3.3 Chikungunya (CHIKV)

Chikungunya é considerado um arbovírus de alta morbidade, do gênero *Alphavirus* e pertencente à família *Togaviridae*, transmitido aos seres humanos por mosquitos do gênero *Aedes*. Na África, até recentemente sua transmissão estava restrita ao ciclo silvestre. Ásia e Índia são os continentes que apresentam o maior número de casos de epidemias urbanas, atribuindo essa dispersão aos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O primeiro caso de chikungunya foi registrado na Tanzânia em 1953. No Brasil o primeiro caso foi relatado em agosto de 2010 e já existem dados da ocorrência de casos confirmados em países europeus e na região leste do Caribe (Jupp e Kemp 1996, Sudeep e Parashar 2008; Outbreaks 2007).

1.4 Digestão em Insetos

Em insetos, tanto a digestão como a absorção de produtos da digestão ocorrem principalmente no tubo digestivo. Durante o processo da digestão, as macromoléculas do alimento são hidrolisadas em moléculas menores que são absorvidas pelas células do epitélio intestinal. Esse processo complexo é realizado por enzimas digestivas e depende da sua localização no intestino do inseto (Terra e Ferreira 2005).

Insetos de diferentes grupos consomem uma grande variedade de alimentos, o que influencia a morfologia e a fisiologia do trato digestório. Existem três regiões principais no trato digestório dos insetos, com válvulas controlando o movimento de entrada e saída do alimento. Essas regiões são conhecidas como: intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP). A região do IA está relacionada com a ingestão, o armazenamento, a trituração e o transporte do alimento para o IM. O IM é o principal sítio de secreção de enzimas digestivas e absorção dos produtos de digestão. Alguns insetos possuem digestão extra-oral ou têm uma digestão inicial no IA, com enzimas que são regurgitadas para esse compartimento. O material remanescente no lúmen do trato digestório, juntamente com a urina coletada nos túbulos de Malpighi, chega ao IP, onde ocorre a absorção de água, sais minerais e outras moléculas essenciais antes da eliminação das fezes pelo orifício do ânus (Gullan 2010, Hakin *et al* 2010).

O epitélio do trato digestório é composto por uma única camada de células colunares em toda a extensão do canal e está apoiado em uma membrana basal, envolvida por uma camada de musculatura irregularmente desenvolvida (Ribeiro *et al* 1990). IA e IP ambos de origem ectodérmica, possuem um revestimento cuticular composto quase que exclusivamente de quitina, enquanto o IM de origem endodérmica possui um revestimento diferenciado, formado por microvilosidades que aumentam a superfície de secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (Klowden 2007).

Os detalhes refinados de cada região do tubo digestório fornecem subsídios para diversas especializações locais, as quais são diferentemente desenvolvidas nos grupos de insetos, dependendo da dieta e de sua história evolutiva. A maior parte da digestão ocorre no IM. Na maioria dos insetos, o epitélio do IM é separado do bolo alimentar por uma estrutura conhecida como membrana ou matriz peritrófica

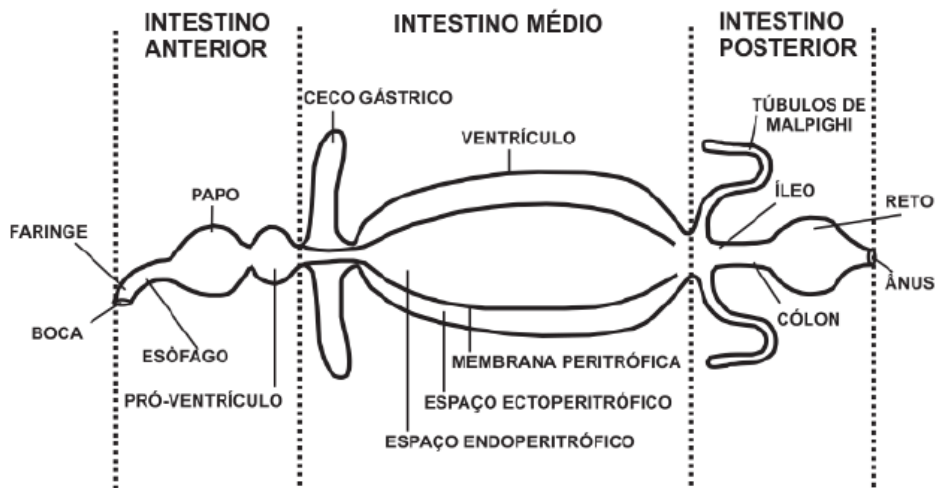
(MP), que apresenta poros por toda sua extensão e é permeável a enzimas digestivas e produtos da digestão. A MP delimita assim dois compartimentos dentro do IM: espaços endoperitrófico e ectoperitrófico (Figura 1.6). Além de atuar na compartimentalização da digestão e na permeabilidade de nutrientes, a MP proporciona proteção mecânica contra a abrasão que pode ser ocasionada no momento da ingestão de alimentos sólidos, afetando as células que revestem a parede intestinal (Terra 1988, 1990; Barbehenn 2001). A MP também fornece proteção contra micro-organismos patogênicos causadores de infecções intestinais nos insetos (Terra e Ferreira 2005).

O fluido contendo moléculas do alimento parcialmente digerido e enzimas digestivas circula pelo IM em direção ao IP pelo espaço ectoperitrófico. Essa circulação entre os dois compartimentos aumenta a eficiência da digestão por mover as moléculas de alimento para locais de digestão final e absorção. Além disso, ela é responsável por conservar as enzimas digestivas, as quais são retiradas do bolo alimentar antes que cheguem ao IP (Terra 1996, 2001).

A estrutura da MP é definida por uma rede de microfibrilas de quitina imersa em uma matriz formada por proteínas e carboidratos, sendo classificada de acordo com seu local de formação (Terra e Ferreira 2005; Klowden 2007; Hegedus *et al.* 2009). A MP formada em camadas por células epiteliais ao longo de todo o IM é classificada como membrana peritrófica do tipo I (MPI). Se sua formação ocorrer a partir de células da cárdia (região especializada no início do IM), ela é considerada uma membrana peritrófica do tipo II (MPII) (Tellam *et al.* 1999).

Ordens de insetos como Coleoptera, Dictyoptera, Ephemeroptera, Hymenoptera, Odonata, Orthoptera, Phasmida, larvas da ordem Lepidoptera e adultos hematófagos da ordem Diptera secretam MPI (Hegedus *et al.* 2009; Terra e Ferreira 2005; Shao e Jacobs 2001). MP tipo II é sintetizada em insetos de outras ordens, tal como Dermaptera, Isoptera, Embiodea, algumas espécies da ordem Lepidoptera, e larvas pertencentes à ordem Diptera (Hegedus *et al.* 2009).

Figura 1.6. Representação esquemática generalizada do tubo digestivo dos insetos. Fonte: Terra e Ferreira 2005.



1.4.1 Etapas da digestão em Insetos

Em insetos, a digestão é um processo extremamente dinâmico e compartimentalizado, recrutando diversas classes de enzimas digestivas. São conhecidas três diferentes etapas na digestão de insetos: digestão inicial, intermediária e final (Figura 1.7). Na digestão inicial, complexas moléculas de polímeros são reconhecidas e degradadas em oligômeros por despolimerases. Essas enzimas atravessam os poros da MP e hidrolisam os polímeros presentes na dieta, esse processamento geralmente ocorrendo no espaço endoperitrófico. Os oligômeros gerados a partir dessas reações atravessam a MP e chegam ao espaço ectoperitrófico onde a segunda etapa da digestão será desencadeada.

Na digestão intermediária, enzimas especializadas clivam moléculas de oligômeros em dímeros ou monômeros. Em insetos mais derivados (apomórficos), ou seja, insetos que sofreram mais adaptações a partir do ancestral comum, as enzimas responsáveis pela etapa de digestão intermediária possuem uma massa molecular maior e não conseguem atravessar os poros da MP. A digestão final pode ocorrer na superfície das células epiteliais presentes no IM através de enzimas integrais de membrana ou por enzimas ancoradas ao glicocálix, tendo por função clivar dímeros em monômeros, gerando o produto final da digestão que será absorvido pelo epitélio intestinal (Terra e Ferreira 2005).

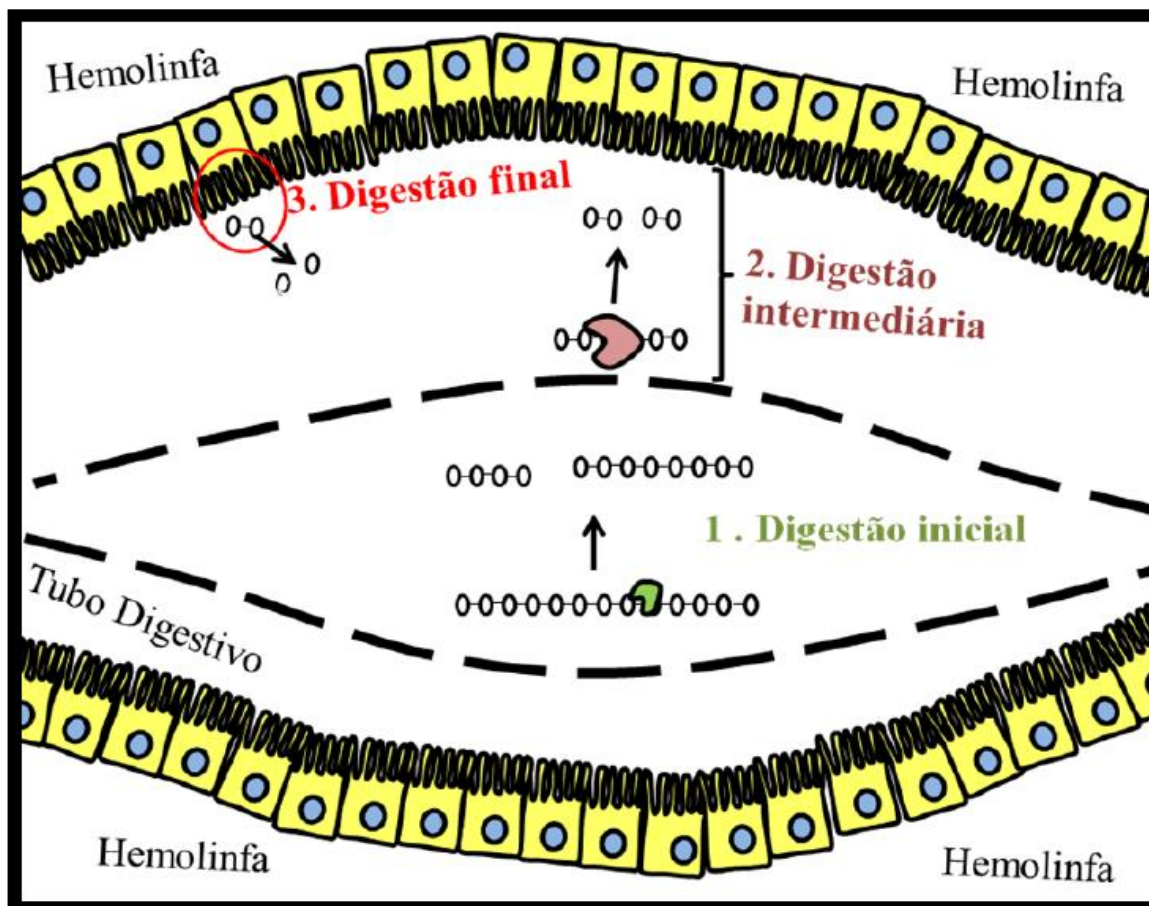


Figura 1.7 Representação esquemática das três fases de digestão em insetos. Enzimas de digestão inicial (despolimerases) estão representadas em verde, enzimas de digestão intermediária em rosa, carboidratos (substrato) estão representados pelos círculos interligados e a MP pela linha pontilhada. Ilustração: Caroline da Silva Moraes [Tese 2012]

1.4.2 Enzimas digestivas e digestão de micro-organismos

Enzimas digestivas, pertencendo à classe das hidrolases, são fundamentais para o metabolismo dos insetos (Terra e Ferreira 2005). A obtenção de uma dieta apropriada e o seu processamento para uma nutrição eficiente pode ser um grande desafio fisiológico. Insetos em geral têm uma complexa, dinâmica e ampla variedade de espécimes bacterianos residentes nos compartimentos digestivos (Grimont *et al.* 1979, Gusmão *et al.* 2010), que provavelmente excedem o número de células dos próprios insetos. Esses micro-organismos associados aos insetos podem desempenhar um importante papel na nutrição, reprodução, fixação de nitrogênio, desenvolvimento, comportamento e resistência à colonização de patógenos. Na

digestão, contudo desempenham um papel limitado, mesmo sendo capazes de produzir suas próprias hidrolases (Dillon 2004, Terra e Ferreira 2005; Douglas, 2009).

Apesar de possuírem um número substancial de simbioses em seu tubo digestivo, algumas espécies de insetos exploram ambientes propícios à proliferação de micro-organismos e os utilizam como principal fonte alimentar. Um exemplo desse tipo de comportamento são as larvas de mosquitos, pois micro-organismos e detritos particulados geralmente constituem a maior parte de sua dieta. Embora muitos trabalhos sugiram que larvas de mosquito não apresentam uma preferência alimentar muito discriminatória, estudos laboratoriais apontam que o seu desenvolvimento é limitado pelo meio em que vivem e pela disponibilidade de alimento encontrado (Clements 1973; Ameen 1978; Laird 1988; Walker 1988).

O sucesso do desenvolvimento desses insetos em ambientes saturados com bactérias, fungos e protozoários, permitem conjecturar que suas enzimas digestivas desempenham um papel importante na digestão de micro-organismos. O fato das larvas se alimentarem de matéria orgânica e adultos de seiva (machos e fêmeas) e sangue (somente fêmeas) sugere a possibilidade de uma variação na atividade dessas enzimas digestivas, que seriam reguladas de acordo com a fase do desenvolvimento e com a dieta (Terra, 1996; Terra e Ferreira 2005).

Em *Ae. aegypti*, diversos autores já descreveram a presença de enzimas digestivas como proteases, lipases e carboidrases (Fisk 1952; Geering 1975; Marinotti 1990). Apesar da existência de alguns estudos relacionados com enzimas digestivas no modelo *Ae. aegypti*, ainda existe uma grande lacuna no conhecimento da fisiologia digestiva de larvas e da influência da dieta no seu desenvolvimento no seu hábitat natural. Estudos detalhados das enzimas digestivas desses organismos podem ajudar a sugerir quais seriam efetivamente os alimentos desses insetos na natureza.

1.5 Ocorrência de β -1,3-glucanas

β -1,3- glucanas são polímeros de glicose na configuração anomérica β onde a ligação entre unidades glicosídicas se dá entre os carbonos um e três. Esses polissacarídeos são abundantes na natureza e produzidos por muitos organismos, sendo descritos em algas, plantas superiores e fungos. β -1,3-glucanas podem exercer diferentes funções como: defesa na resposta a herbivoria pela produção de calose em tecidos vegetais, estrutura da parede celular em plantas e fungos ou polissacarídeo de reserva em algas (Bartnicki-Garcia 1968; Gorin e Spencer 1968; David *et al.* 1973; Wessels e Sietsma 1981; Aspinall 1982; Bacic *et al.* 1988, Krainer *et al.* 1994). A ocorrência das principais β -glucanas está descrita na tabela 1.1.

Tabela 1.1 Estrutura, ocorrência e função das principais β -glucanas encontradas na natureza. Fonte: Genta, 2004

β -glucana	Ligação principal	Ocorrência	Função
celulose	β -1,4	vegetais em geral, bactérias	principal constituinte da parede celular
laminarina	β -1,3	algas pardas	reserva
calose	β -1,3	vegetais superiores	formação de poros do floema
laricinana	β -1,3	coníferas	reserva; constituinte da parede celular
pachyman	β -1,3	fungos	constituinte da parede celular
β -1,3-1,6-glucanas	β -1,3	fungos	principal constituinte da parede celular
liquenana	β -1,4 e β -1,3	líquens	constituinte da parede celular reserva
β -glucanas cereais	β -1,4 e β -1,3	cereais	constituinte da parede celular reserva

1.6 Ocorrência e classificação de β -1,3-Glucanases

As β -1-3-glucanases são enzimas capazes de hidrolisar ligações β -1,3 encontradas em polissacarídeos como as β -1,3-glucanas laminarina (β -1, -3-glucana das algas marrons do gênero *Laminaria* sp), calose (em plantas superiores) ou “pachyman” (de fungos da espécie *Poria cocos*). Essas enzimas também podem

reconhecer ligações β -1,3 em β -1,3-1,6-glucanas presentes nas paredes de leveduras ou em β -1,3-1,4-glucanas de cereais.

β -1,3-glucanases podem ser agrupadas de acordo com o substrato preferencialmente clivado ou através da similaridade entre suas sequências primárias de amino-ácidos. De acordo com o padrão de ação da enzima sobre o polissacarídeo, podemos separar as β -1,3-glucanases em endo- β -1,3-glucanases (ex. E.C 3.2.1.39) ou exo- β -1,3-glucanases (ex. E.C 3.2.1.58). Endo- β -1,3-glucanases promovem a hidrólise de resíduos de glicose nas porções internas das cadeias do polissacarídeo de β -1,3-glucana, liberando oligossacarídeos, enquanto exo- β -1,3-glucanases clivam os resíduos presentes nas porções externas da cadeia do polímero, liberando monômeros de glicose ou laminaribiose (dissacarídeo). Os substratos reconhecidos e os produtos liberados por glucanases (glicose/laminaribiose ou oligossacarídeos) revelam propriedades do sítio catalítico da enzima. De acordo com esses critérios, até o presente momento, β -1,3-glucanases são encontradas dentro de quatro categorias enzimáticas (Cornish-Bowden *et al.* 1982; Schomburg e Salzman 1997), Tabela 1.2

Tabela 1.2 Classificação enzimática de β -1,3-glucanases e grupos de organismos onde são encontradas. Fonte: Genta 2004.

Enzima	E.C	Família	Organismo
Endo-1, -3(4)-β-glucanase	3.2.1.6	9,16	Bactérias, Fungos e Insetos
Glucan-endo-1,3- β -D-glucosidase	3.2.1.39	16, 17,55,64,81 e 128	Bactérias, Fungos, Plantas e Insetos
Glucan-exo-1,3-β-glucosidase	3.2.1.58	3,5,17,55	Bactérias, Fungos, Plantas e Insetos
Licheninase (Hidrólise de ligações glicosídicas β-1,4)	3.2.1.73	5,7,8,9,10,11,12,16,17 e 26	Bactérias, Fungos, Plantas e Insetos

O segundo e mais recente critério de classificação dessas enzimas está baseado na similaridade entre as sequências de aminoácidos da estrutura primária de cada enzima. A semelhança entre as sequências define as diferentes famílias de glicosídeo hidrolases, também conhecidas como glicosidases ou carboidrases. Enzimas pertencentes a esse grupo são essenciais para a hidrólise de carboidratos complexos, gliconjugados, oligo e polissacarídeos. Uma vez que β -1,-3-glucanases são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas, foram encontradas em 10 diferentes famílias de glicosídeo hidrolases, sendo elas as famílias: 3, 5, 7, 8, 12, 16, 17, 55,64 e 81 (Henrissat 1991; Davies e Henrissat 1995; Coutinho e Henrissat, 1999). Enzimas pertencentes à mesma família compartilham a mesma estrutura tridimensional, apresentam o mesmo mecanismo de catálise, (mantendo a configuração anomérica β presente originalmente no substrato, ou invertendo-a, liberando produtos na configuração anomérica α), com os mesmos resíduos de aminoácidos envolvidos no processo. Todas essas características estruturais específicas tornaram esse tipo de classificação muito utilizado para o estudo de proteínas e genes de glicosídeo hidrolases. Nesse trabalho estudamos β -1,3-glucanases pertencentes à família 16 das glicosídeo hidrolases (GHF 16).

1.6.1 β -1,3-glucanases em insetos

β -1,3-glucanases desempenham um importante papel na digestão de insetos detritívoros ou que se alimentam de gramíneas, estando envolvidas na etapa inicial de digestão (Terra e Ferreira 1994). São encontradas em quase todos os grupos de insetos como: *Periplaneta americana* (Blattodea; Genta *et al.* 2003), *Tenebrio molitor* (Coleoptera; Genta *et al.* 2009), *Abracris flavolineata* (Orthoptera; Genta *et al.* 2007), *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera; Erthal Jr. *et al.* 2007), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera; Pauchet *et al.* 2009), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Bragatto *et al.* 2010) e várias espécies de cupins (Isoptera; Lucena *et al.* 2011).

Entretanto, somente as β -1,3-glucanases de *Tenebrio molitor* (Genta *et al.* 2009), *Periplaneta americana* (Genta *et al.* 2003), *Spodoptera frugiperda* (Bragatto *et*

al. 2010) e *Abracris flavolineata* (Genta *et al.* 2007) foram efetivamente purificadas até a homogeneidade e caracterizadas em detalhes.

P. americana possui duas β -1,3-glucanases digestivas majoritárias, denominadas LAM e LIC1. Ambas são endo- β -1,3-glucanases secretadas pelas glândulas salivares do inseto, são capazes de lisar células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, possuem pH ótimo em torno de 6 e são estabilizadas por íons de cálcio. LAM possui uma massa molecular em torno de 46 kDa e é capaz de atacar processivamente (ataque múltiplo da cadeia do substrato) apenas β -1,3-glucanas, gerando glicose como produto principal. LIC1 possui uma massa molecular de 25 kDa e cliva β -1,3-glucanas e β -1,3-1,4-glucanas, possuindo alta afinidade por sequências de celotetraoses encontradas em hemiceluloses cereais (Genta *et al.* 2003).

T. molitor possui uma endo- β -1,3-glucanase com massa molecular de aproximadamente 50kDa, e pH ótimo por volta de 6. É capaz de clivar exclusivamente β -1,3-glucanas. Essa enzima gera uma série de oligossacarídeos a partir do polissacarídeo, possui alta capacidade lítica sobre as células da levedura *S. cerevisiae* e é secretada pelo epitélio do intestino do inseto. No sítio ativo encontra-se um grupo carboxila, um íon divalente (sugere-se cálcio), resíduos de histidina, tirosina e arginina. Essa enzima parece ser essencial para a nutrição do inseto, pois a retirada dos fungos da dieta leva à perda de peso e retardo no desenvolvimento das larvas (Genta *et al.* 2006).

A. flavolineata possui uma exo- β -1,3-glucanase com massa molecular de aproximadamente 45kDa, e um pH ótimo por volta de 6. É capaz de clivar apenas β -1,3-glucanas. Seus principais produtos de ação são glicose e laminaribiose (glucopiranosil- β -1,3-glicosídeo). Essa enzima é inibida por altas concentrações de laminarina e possui um sítio de ligação ao substrato além do sítio ativo, possivelmente envolvido na processividade dessa enzima (Genta *et al.* 2007).

Spodoptera frugiperda possui uma endo- β -1,3-glucanase denominada SLAM, com atividade somente sobre β -1,3-glucana e peso molecular de 37,5 kDa, sendo a primeira descrição de β -1,3-glucanase com pH ótimo alcalino (pH_o= 9). Essa enzima é encontrada no conteúdo do intestino médio anterior e também na parede epitelial do intestino médio posterior, o que sugere sua secreção na parte posterior do intestino médio, sendo dirigida para o lúmen do intestino (Bragatto *et al.* 2010).

Dessa maneira é possível que β -1,3-glucanases desempenhem um papel importante na fisiologia digestiva de larvas de *Ae. aegypti*, digerindo a parede celular de plantas e fungos da dieta.

1.6.2 Proteínas ligantes de β -glucanas (β LP/ β RP)

Além do papel digestivo, algumas β -1-3-glucanases, como as do lepidóptero *Helicoverpa armigera* e de diferentes espécies de cupins foram relacionadas com a defesa imune do inseto (Bulmer e Crozier 2006; Pauchet *et al.*, 2009). Imunidade inata é a primeira linha de defesa contra infecção por patógenos em todos os animais, incluindo os insetos (Gillespie *et al.* 1997; Strand 2008).

O disparo da resposta imune ocorre através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que estão na superfície de micro-organismos como lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicano (PGs) e β -1,3-glucana (Royet 2004). Proteínas especializadas nesse reconhecimento são conhecidas como receptores de reconhecimento de padrões (RRP), que se ligam às células invasoras desencadeando uma resposta do sistema imune inato (Janeway e Medzhitov 2002). Complexas vias de sinalização podem ser ativadas, induzindo a produção de peptídeos antimicrobianos, entre outras moléculas (Lemaitre e Hoffmann 2007; Ragan *et al.* 2009). Receptores de reconhecimento de padrões (RRP) foram relacionados com o disparo das cascatas de serino proteases no espaço extracelular, as quais coordenam múltiplas respostas imunes, podendo levar à ativação de duas das principais vias de resposta humoral, sendo elas a via Toll e a ativação da via proteolítica de profenoloxidase (proPO) (Ochiai e Ashida 1988, Lee *et al.* 2000; Fabrick *et al.* 2003). Fenoloxidasas ativas (PO) geram quinonas reativas que melanizam e matam diretamente o patógeno invasor (Nappi e Christensen 2005; Kohler *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2007).

Proteínas ligantes de β -1,3-glucana (β LP/ β RP) são consideradas receptores de reconhecimento de padrões (RRP) e estão associadas à imunidade nos insetos. São homólogas às β -1,3-glucanases, pertencem à mesma família 16 das glicosídeo hidrolases, porém não possuem atividade catalítica. É possível que essas proteínas ligantes tenham se originado das β -1,3-glucanases e divergido em sua função, perdendo sua capacidade de realizar a catálise e adquirindo uma região N terminal extra, específica para o reconhecimento de carboidratos (Bragatto *et al.* 2010,

Hughes 2012). Na literatura são encontradas com diferentes nomenclaturas, sendo bastante comum encontrar designações como proteínas de reconhecimento de β -glucanas (β RP), proteínas ligantes de β -glucana (β LP) ou proteínas ligantes de gram-negativas (GNBP). No decorrer do texto elas serão coletivamente referidas como β LP.

β LP foram inicialmente descritas em *Bombyx mori* (Ochiai 1988, 2000), popularmente conhecido como bicho-da-seda, por sua habilidade em se ligar a β -1,3-glucana. Subsequentemente essas proteínas foram identificadas em outros artrópodes, incluindo *Manduca sexta* (Ma e Kanost 2000), *Pacifastacus leniusculus* (Lee et al. 2000), *Penaeus stylirostris* (Roux et al. 2002), *Tenebrio molitor* (Zhang et al. 2003), *Plodia interpunctella* (Fabrick et al. 2003) e *Armigeres subalbatus* (Wang et al. 2005). Em insetos podem ser encontradas em ovos, hemolinfa e no corpo gorduroso, em resposta a desafios com patógenos invasores (Ma e Kanost 2000; Fabrick et al. 2003; Gorman et al. 2004; Jiang et al. 2004; Wang et al. 2005; Sun et al. 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Ae. aegypti é o principal responsável pela dispersão da dengue, uma doença negligenciada que vem sendo considerada a mais comum e disseminada arbovirose no mundo. As estratégias de controle atuais desses dípteros não têm conseguido diminuir efetivamente a incidência dessa doença.

Em geral, as formas larvais de culicídeos se alimentam de micro-organismos, tais como leveduras. Esses micro-organismos associados aos insetos podem desempenhar diversos papéis em sua fisiologia. β -1,3-glucanases são uma importante classe de enzimas, envolvidas na digestão inicial da maioria dos insetos detritívoros e o seu papel ainda não foi investigado em culicídeos. Dentro desse contexto investigamos, nos níveis funcionais e moleculares, alguns aspectos do modelo *Ae. aegypti*.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar aspectos fisiológicos e moleculares de β -1,3-glucanases e da digestão de leveduras em larvas de *Ae. aegypti*.

3.1 Objetivos específicos

- Analisar a presença de sequências no genoma de *Ae. aegypti* que codifiquem para GHF 16,
- Caracterizar o padrão tecidual e parâmetros bioquímicos das atividades de β -1,3-glucanases em larvas de *Ae. aegypti*,
- Verificar o efeito de uma dieta exclusiva de leveduras sobre o desenvolvimento das larvas de *Ae. aegypti*,
- Investigar o envolvimento de β -1,3-glucanases na digestão de leveduras em larvas de *Ae. aegypti*,
- Estudar a expressão gênica de GHF 16 em larvas de *Ae. aegypti*,
- Avaliar o efeito do silenciamento de genes da GHF 16 através de RNAi em larvas de *Ae. aegypti*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Criação e manutenção de insetos

Os ovos utilizados em todos os experimentos foram cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE), localizado no Instituto de Biologia do Exército (IBEX), em colaboração com a Dr^a. Denise Valle (IOC/FIOCRUZ) e o Dr. José Bento Pereira Lima (IOC/FIOCRUZ). Usamos em todos os experimentos insetos da cepa Rockefeller. Ela foi originalmente descrita como padrão de susceptibilidade a inseticidas para a espécie *Ae. aegypti* em todo o mundo (Craig e Nijhout 1971; Kuno 2010).

Para induzir a eclosão dos ovos previamente estocados em nosso laboratório, utilizamos 0,3% (p/v) de extrato de levedura (SIGMA#Y1625) em solução de água desclorada, com uma taxa de eclosão média de 80% (Barbosa e Peters 1969, Novak e Shroyer 1978, Farnesi, Martins *et al.* 2009). As larvas de *Ae. aegypti* foram mantidas em recipientes com água e com temperatura em torno de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo controlado (12:12). Como fonte nutricional foi utilizada ração de gato (Whiskas® - Masterfoods Brasil Alimentos Ltda), células autoclavadas de *Saccharomyces cerevisiae* (Cepa H14) e células vivas e autoclavadas de *Ustilago* sp (levedura criopreservada em laboratório). As pupas e adultos foram mantidos em recipientes adequados para contagem e pesados com o decorrer dos dias de desenvolvimento. Os insetos adultos não foram alimentados.

4.2 Dissecções das larvas

Larvas no estágio L4 foram dissecadas em solução salina 0,9 % (p/v) a 4°C . Foram isolados os tubos digestivos (com membrana peritrófica, alimento e excluindo-se somente o reto e os túbulos de Malpighi), cabeças (contendo glândulas salivares) e todo o restante do corpo (corpo gorduroso, traqueias, carcaça, etc.) sendo estocados em microtubos de polipropileno. Os insetos foram reunidos em “pools” de 10 para os ensaios de atividade enzimática, 80 para os ensaios de efeito de pH e 50 para as filtrações em gel. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas no freezer a -20°C . O material dissecado para experimentos de biologia molecular foi colocado em microtubos de polipropileno

contendo 50 µL de TRI Reagent® (SIGMA) e imediatamente congelados e armazenados a -80°C até a extração do RNA total.

4.3 Preparações das leveduras *Ustilago* sp para alimentação das larvas

Células da levedura *Ustilago* sp, previamente isoladas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* coletados em Teresina, Piauí, foram cedidas pelo Prof. Rod Dillon da Universidade de Lancaster, UK, e criopreservadas a -80°C. As células foram recuperadas e cultivadas em meio sólido (Sabouraud, MERCK) a 30°C por dois dias. Após o surgimento das colônias de levedura, um novo cultivo foi realizado em meio líquido a partir de um clone isolado. Após o crescimento das leveduras durante a noite a 30°C (75 rpm), a densidade óptica (OD) dos cultivos foi normalizada com meio para 1 unidade de absorvância (600 nm). Após a normalização, uma alíquota de 1 mL era transferida para 50 mL de meio líquido, sob agitação de 75 rpm, e incubada por 24 horas. O meio era então centrifugado a 10.000 g, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante era descartado e o precipitado ressuspenso em 50 mL de água desclorada, sendo então, adicionado ao criadouro artificial das larvas. A administração dessa dieta era realizada uma única vez em cada experimentação.

4.4 Alimentações com leveduras

As larvas na primeira etapa experimental foram mantidas em uma dieta contendo ração de gato até o estágio L3. Posteriormente essas larvas foram separadas em grupos de 80 e colocadas em três recipientes distintos contendo:

100 mL de água desclorada com 200 mg de ração de gato (Whiskas® - Masterfoods Brasil Alimentos Ltda), 50 mL de água desclorada qsp 100mL com 250±30 mg das células autoclavadas de *S.cerevisae* (cepa H14) e 50 mL de água desclorada qsp 100mL com 250±30 mg das células autoclavadas de *Ustilago* sp. Todas as células haviam sido ressuspendidas previamente em 50 mL água desclorada. Alcançadas 144 h de desenvolvimento as larvas era pesadas em grupo de 3 e suas massas corporais foram comparadas.

Para os experimentos de alimentação utilizando células vivas de *Ustilago* sp, as larvas eram mantidas em dois recipientes distintos a partir da eclosão dos ovos.

Um total de 80 larvas eram mantidas em um recipiente com 100 mL de água desclorada e 200 mg de ração de gato (Whiskas® - Masterfoods Brasil Alimentos Ltda) ou 50 mL de água desclorada e 250±30 mg de células vivas de *Ustilago* sp, resuspendidas previamente em 50 mL de água desclorada. Os imaturos foram mantidos sob uma temperatura de 26±1°C, sob foto periodicidade controlada (12:12), sendo observado o seu padrão de desenvolvimento. Com 144 horas de desenvolvimento, foram selecionadas 50 larvas nas diferentes dietas, pesadas e comparadas, enquanto o restante da população permaneceu no recipiente para dar prosseguimento ao experimento. Posteriormente, o surgimento de pupas e insetos adultos nas diferentes populações também foi observado, contabilizado e os insetos pesados. Cada grupo experimental foi realizado em duplicata.

4.5 Ensaio de atividade lítica do extrato dos tubos digestivos das larvas sobre células de *Ustilago* sp

Um total de 10 tubos digestivos das larvas em estágio L4 criadas nas condições do item 4.1 e alimentadas com ração de gato foram homogeneizados em uma solução contendo 100 µL de água deionizada e 2,5 µL das soluções estoque dos inibidores de proteases, sendo eles: Fenilmetil sulfonilfluoreto (PMSF) 20 mM (James, 1978), Pepstatina A 20 µM (Umezawa *et al.* 1970; Marciniszyn *et al.* 1976) e L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino) butane 20µM (E 64) (Barret *et al.* 1981, 1982). O material homogeneizado foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000 g e a fração solúvel (sobrenadante) foi coletada. Esse material foi filtrado (poro de 0,22 µm Millex GV, Millipore, EUA) e uma alíquota de 10µL foi adicionada com 25 µL de uma suspensão de células de *Ustilago* sp (contendo cerca de 375 Unidades Formadoras de Colônia) em água deionizada e 25 µL de tampão citrato 10mM,pH7. Após diferentes tempos de incubação, alíquotas de 20 µL da mistura de reação acima foram retiradas e plaqueadas em 20 mL de meio sólido Sabouraud (MERCK, Sabouraud 1892). Contou-se o número de UFCs restantes após 48 horas de crescimento a 30°C. As células de *Ustilago* sp sem a incubação com o extrato de tubos digestivos mostraram que são estáveis nas condições utilizadas. Os experimentos foram realizados duas vezes em triplicata.

4.6 Caracterizações bioquímicas

4.6.1 Ensaio enzimáticos de β -1,3-glucanases

Foram utilizados quatro “pools” contendo 10 tubos digestivos, 10 cabeças e 10 restos do corpo em cada ensaio. A homogeneização dos tecidos foi feita em 100 μ l de água, com o auxílio de um homogeneizador para microtubos (Sigma#Z359971). Somente nas amostras de tubo digestivo foram adicionados 2,5 μ L dos inibidores: PMSF 20 mM, Pepstatina A 20 μ M e E 64 20 μ M. O material homogeneizado foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000 g. A fração solúvel (sobrenadante) foi coletada e a fração insolúvel foi ressuspensa no mesmo volume de solução de homogeneização. As duas frações foram testadas separadamente. Para todos os experimentos utilizamos como substrato laminarina 0,25% [p/v] em água deionizada (Miles, Millipore, EUA) e tampão citrato de sódio (concentração inicial de 200 mM, pH 7, mantido em temperatura ambiente). Os ensaios foram incubados durante 0, 2, 4, 6 e 8 horas na estufa a 30°C e interrompidos nos intervalos de tempo por incubação a 100°C durante 3 minutos, ocasionando a desnaturação da enzima. A atividade da enzima foi detectada pela produção de açúcares redutores, através do reagente de ácido dinitrosalicílico (Noelting e Bernfeld, 1948) ou do ácido bicinchonínico (Redinbaugh e Turley 1986). As leituras em espectrofotômetro foram realizadas nos comprimentos de onda de 550 e 565 nm, respectivamente. Controles sem enzima ou sem substrato foram incluídos. Uma unidade de enzima (U) é definida como a quantidade de β -1,3-glucanase que hidrolisa 1 μ mol de ligações glicosídicas por minuto. A atividade foi medida em condições nas quais a quantidade formada do produto tenha sido proporcional à concentração de proteína no ensaio e ao tempo de incubação. Os experimentos foram realizados cinco vezes, utilizando de quatro a cinco “pools” com 10 insetos para cada condição amostral.

4.6.2 Determinação de proteínas

A quantidade de proteína das amostras foi determinada com o reagente Coomassie Blue G (Bradford 1976), utilizando albumina de ovo para a confecção de curva padrão.

4.6.3 Efeito do pH na atividade enzimática

Para os estudos dos efeitos do pH na atividade enzimática, foram ensaiados 80 tubos digestivos, 80 cabeças e 80 restos do corpo em 400µl de água. O material homogeneizado foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000 g e a fração solúvel (sobrenadante) foi coletada. Para todos os experimentos utilizamos como substrato laminarina 0,25 % [p/v] em água deionizada (Miles, Millipore, EUA). Os ensaios utilizaram os tampões: citrato de sódio (pH 3-7, 200mM), EPPS (pH 7-9, 200 mM), AMPSO (pH 9-10, 200 mM) e CAPS (pH10-11, 200 mM), com sobreposição de tampões para descartar possíveis inibições pela espécie tamponante. Todos os ensaios utilizaram os tampões em temperatura ambiente na concentração final de 83 mM. Os experimentos foram realizados em triplicata e foram reproduzidos três vezes.

4.6.4 Cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 200 (GE Healthcare)

Foram utilizados 50 tubos digestivos, 50 cabeças e 50 restos do corpo nas cromatografias de filtração em gel. Esses tecidos foram homogeneizados em 100µl de Feniltiouréia (PTU) em uma concentração final de 10 mM. Somente nas amostras contendo tubo digestivo foram adicionados 10µL dos inibidores: PMSF 20 mM, Pepstatina A 20 µM e E64 20 µM. Nos tecidos previamente macerados em uma solução contendo PTU foram adicionados 500 µL de tampão citrato pH 7, 50 mM contendo NaCl 150 mM, sendo posteriormente centrifugadas em uma rotação de 10.000 g por 10 minutos, sob uma temperatura de 4°C. A fração solúvel (sobrenadante) de cada material foi aplicada em uma coluna Superdex 200 (GE Healthcare) acoplada ao sistema cromatográfico AKTA-FPLCeequilibrada em tampão Citrato pH 7, 50 mM contendo NaCl 150 mM. As proteínas foram eluídas da coluna com 30 mL do tampão. Usou-se um fluxo de 0,5 mL/min, e frações de 0,5 mL foram coletadas. As frações com maior atividade enzimática foram reunidas para caracterização. Os ensaios utilizaram 35 µL das frações coletadas dos diferentes tecidos e 25 µL do substrato laminarina 0,25% [p/v] em água deionizada (Miles, Millipore, EUA). Todos os ensaios foram incubados “overnight”. Os padrões de massa molecular utilizados foram o blue dextran (2000 kDa), citocromo C (12,4

kDa), anidrase carbônica (29 kDa), albumina de soro bovina (66 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa) e β -amilase (200 kDa).

4.6.5 Identificação dos genes da família 16 das glicosídeo hidrolases no genoma de *Ae. aegypti*

Os genes da família 16 das glicosídeo hidrolases (GHF16) foram identificados no genoma de *Ae. aegypti* usando o software FAT (Functional Analysis Tool - HMMER Models Analysis Program) gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Rafael Dias Mesquita (IQ-UFRJ). Para a busca das sequências de interesse utilizou-se como molde o domínio PFAM Glyco Hydro 16 (PF00722) com a colaboração da Prof. Dr^a. Renata Schamma (IOC-FIOCRUZ).

4.6.6 Alinhamento das sequências obtidas e análise da árvore consenso

O alinhamento das sequências homólogas que codificam para GHF 16 de *Ae. aegypti* e a geração de sequências consenso foi realizado utilizando o algoritmo CLUSTAL (Higgins 1994; <http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) e o software BIOEDIT (Hall 1999; <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.htm>). As sequências obtidas foram analisadas pelos algoritmos BLAST (Altschul *et al.* 1990; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), signal IP (Dyrløv *et al.* 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), NETOGlyc 4.0 (Julenius *et al.* 2005; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), NETNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e ProtParam (Gasteiger *et al.* 2003; <http://web.expasy.org/protparam/>). Para construção da árvore consenso, foi utilizado o programa MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) e o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Tamura *et al.*, 2011) com bootstraps de no mínimo 10000 réplicas.

4.6.7 Extração de RNA total e RT para síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de larvas inteiras em estágio L4 e dos tecidos: cabeça, tubo digestivo e resto do corpo utilizando-se o reagente TRI® (SIGMA#T9424) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi quantificado utilizando-se um Nanodrop® (NanoDrop Technologies, Wilmington,

USA). Para obtenção do cDNA, as amostras de RNA obtidas foram tratadas com a DNase do kit TURBODNase FREE (Ambion), sendo posteriormente submetidas à reação de transcrição reversa (RT), realizada segundo o protocolo do fabricante do kit SUPERScript III (Invitrogen, San Diego, CA) com um iniciador oligo dT (18) (PRODIMOL Tecnologia) . O material após a reação de RT foi tratado com RNase H e o cDNA foi quantificado em Nanodrop novamente. Para análises posteriores, as amostras de cDNA de larvas e tecidos foram normalizadas para a concentração de 50 ng/μL.

4.6.8 PCR e RT- PCR semi-quantitativo

Para as amplificações de fragmentos de DNA correspondentes às sequências de Glicosídeo Hidrolases da família 16, foram desenhados oligonucleotídeos específicos, a partir das sequências já previamente obtidas no genoma de *Ae. aegypti* (Tabela 4.1). Esses iniciadores foram utilizados tanto para amplificação a partir do DNA genômico quanto nos cDNAs sintetizados em reações de transcrição reversa. Para as amplificações foi utilizado o kit GoTaq® DNA Polimerase (Promega), onde cada reação apresentava tampão de reação 1X, dNTP (0,2 mM), cloreto de magnésio (1,5 mM), oligonucleotídeos (10 μM de cada um), Taq DNA polimerase (0,025 U) e 1 μL de cDNA ou DNA genômico (50 ng/μL). O volume final de 20 μL foi ajustado com água livre de nucleases. Em todas as reações foi utilizado como controle o gene constitutivo RP49 (Gentile *et al.* 2005). Cada reação consistiu em um número variado de ciclos, com intervalos de 1 minuto a 94°C para que ocorra a desnaturação da fita molde, 30 segundos para que ocorra o pareamento de cada iniciador, 55°C para o anelamento de todos os genes e 1,5 minutos a 72°C para a etapa de alongamento da nova fita. Foram realizados diferentes números de ciclos em cada experimento, sendo 40 ciclos para os experimentos iniciais de teste dos iniciadores e uma variação de 24 a 40 ciclos para os experimentos de cálculos da expressão relativa e para a confirmação do silenciamento dos genes após RNAi.

Gene	GenBank	Sequencia de primers
AaeGH16. 1	EAT44802. 1	F: GTGACACTGAACCGAGATCG
AaeGH16. 1	EAT44802. 1	R: TGGGACGAATGTAAAGGGTG
AaeGH16. 2	EAT44801. 1	F: GCATGAAAACACTCTGGCTG
AaeGH16. 2	EAT44801. 1	R: TCAAATCTCGGTTTCCCTTCG
AaeGH16. 3	EAT41280. 1	F: TCTATACATCCGCCCAACATTG
AaeGH16. 3	EAT41280. 1	R: CCATCAGATCCACTTCACCTG
AaeGH16. 4	EAT40654. 2	F: GGATTCCAGTATGCTACCCTG
AaeGH16. 4	EAT40654. 2	R: ACGTAATCCACTTTCAGCTCC
AaeGH16. 5	EAT38985. 1	F: GAGGAAAGTGCCCCGAAG
AaeGH16. 5	EAT38985. 1	R: AGGTTCAAAGTTCCACTGCTC
AaeGH16. 6	EAT38986. 1	F: GACTTTCTGCTCTGGTGATTTG
AaeGH16. 6	EAT38986. 1	R: TCTTTCACAACCATCCCACG

Tabela 4.1 Sequências de iniciadores oligonucleotídicos utilizados para RT-PCR semi quantitativo de transcritos que codificam para a família GHF16 em larvas de *Ae.aegypti*. F: iniciador senso (Forward). R: iniciador anti-senso (Reverse).

4.6.9 Eletroforese de DNA em gel de agarose e análise densitométrica

Os produtos de RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose com concentração final de 1% (p/v), em tampão TBE (Tris 0.89 M /Borato 0.89 M /EDTA 0.02 M, pH 8,5) e as amostras foram resolvidas em uma diferença de potencial de 80-120 V. Após a eletroforese, o material foi evidenciado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado em um transiluminador de luz UV (312 nm). Os géis foram fotografados (E-Gel Image, Life Technologies, EUA) e analisados com o programa ImageJ (Sheffield 2007), gerando perfis semi-quantitativos de expressão gênica com base nas bandas reveladas com luz UV.

4.6.10 Preparação de dsRNA

O protocolo utilizado para os experimentos de silenciamento foram baseados na metodologia de Singh *et al.* (2013). A extração do RNA total e a síntese de cDNA foram realizadas de acordo com o item 4.6.7. Quatro dos genes identificados (item 4.6.5) que codificam para a família GH 16 em *Ae. aegypti* foram selecionados como alvos para o silenciamento, sendo eles os genes denominados AeGH16.1, AeGH16.4, AeGH16.5 e AeGH16.6. Foram desenhados iniciadores específicos para a síntese de dsRNA (Tabela 4.2) e os produtos de PCR gerados a partir das reações de RT-PCR (feitas de acordo com o item 4.6.8) foram purificados usando-se os kits de purificação QIAquick PCR Purification Kit ou QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, EUA). Para as transcrições *in vitro* e purificação do dsRNA utilizamos o kit MEGAscript® RNAi Kit (Ambion, Life Technologies, EUA).

4.6.11 Silenciamento por RNAi e ensaios biológicos

As larvas de *Ae. aegypti* foram criadas de acordo com o item 4.1 e alimentadas com ração de gato. Em todos os experimentos as larvas foram separadas no estágio larval L2 e mergulhadas em soluções contendo 0,5 µg/µL de dsRNA e 2,5% (p/v) de azul de bromofenol. Os insetos foram mantidos nessa solução por 2 horas sob temperatura ambiente. A seleção dos insetos ocorria de acordo com a intensidade da cor azul no tubo digestivo das larvas, sendo então as mesmas transferidas para potes individuais e mantidas até a fase adulta. Para os experimentos de curva de sobrevivência e percentual de pupação foram separadas 20 larvas que foram mantidas em recipientes contendo 100 mL de água filtrada e 0.001 mg de ração de gato (Whiskas® - Masterfoods Brasil Alimentos Ltda). Nos experimentos sob condições de estresse, em cada grupo após o silenciamento 120 larvas foram mantidas em microtubos de prolipopileno contendo 1mL de água filtrada e não foi adicionada qualquer fonte nutricional durante os dois primeiros dias. Para os ensaios enzimáticos e filtração em gel foram dissecados 50 tubos digestivos e 50 restos do corpo. Esses tecidos foram homogeneizados em 100 µl de água e somente no homogenato dos tubos digestivos foram adicionados 2,5 µl dos

inibidores: 20 mM PMSF, 20 mM Pepstatina A e 20 mM E64. Para todos os experimentos enzimáticos utilizamos como substrato laminarina 0,25 % [p/v] em água deionizada (Miles, Millipore, EUA). A incubação e a detecção foram realizadas de acordo com o item 4.6.1. Insetos utilizados para as medidas do efeito de silenciamento dos genes foram mantidos em paralelo, sob as mesmas condições, para que o RT-PCR semi quantitativo fosse realizado. Análise do silenciamento por RT-PCR foi feita de acordo com o item 4.6.9 Todos os experimentos de estudo de fenótipo foram realizados quatro vezes.

Gene	Sequencia do iniciador
dsGH16.1F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACCCGTCAGTTTGGGCAGACGC
dsGH16.1R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGACGTTGAACCCCTTGCTGTATTC
dsGH16.4F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGGCATCGTTGCGAGGTGG
dsGH16.4R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTATGAAAGTTATCGCTGAAATGCTC
dsGH16.5F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGTTGAACAGGTTGGTTCAACTTT
dsGH16.5R	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAATGGAAGCCGTTGTTGAAACCTT
dsGH16.6F	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGTTGAGCAAGTAGGATCGACTT
dsGH16.6R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGATGGAAGTCATTGTTGAAGCCT

Tabela 4.2. Sequências de iniciadores oligonucleotídicos usados para amplificar os fragmentos de cDNA utilizados na preparação de dsRNA.

5 RESULTADOS

5.1 Análises bioinformáticas e identificação de GH16 no genoma de *Ae.aegypti*

5.1.1 Identificações e análises dos genes pertencentes à família 16 das glicosídeo hidrolases

Foram encontrados no genoma de *Ae.aegypti* seis sequências de genes que codificam para proteínas pertencentes à família 16 das glicosídeo hidrolases (GHF16), sendo renomeados como AaeGH16.1, AaeGH16.2, AaeGH16.3, AaeGH16.4, AaeGH16.5 e AaeGH16.6 (códigos GenBank: EAT44802.1, EAT44801.1, EAT41280.1, EAT40654.2, EAT40654.2, EAT38986.1). Esses genes contêm de 2 a 6 éxons (Figura 5.1).

Realizamos um alinhamento das sequências de aminoácidos de cada proteína predita com as sequências homólogas encontradas em diferentes bancos de dados e analisamos aspectos como a presença de peptídeos sinais, sítios de glicosilação e resíduos catalíticos conservados. Das seis sequências de GH16 de *Ae.aegypti*, cinco (AaeGH16. 1, AaeGH16.2, AaeGH16.3, AaeGH16.5 e AaeGH16.6) apresentaram peptídeo sinal e os resíduos de glutamato catalíticos conservados, representados pela região consenso SGE(I/V)DL(M/L)ES(R/K). A única proteína da família GHF16 que não apresentou indícios de peptídeo sinal foi AaeGH16. 4, parecendo não ser secretada para o exterior pelas células que a sintetizam. AaeGH16.4 também não apresentou os resíduos de glutamato catalíticos conservados (Figura 5.2).

Os seis genes codificam proteínas com massas moleculares preditas e pontos isoelétricos distintos. AaeGH16.1 43 kDa e $pI = 5,7$, AaeGH16.2 41 kDa e $pI = 5$, AaeGH16.3 39 kDa e $pI = 9,8$, AaeGH16.4 57 kDa e $pI = 7,6$, AaeGH16.5 41 kDa e $pI = 5,6$ e AaeGH16.6 41 kDa e $pI = 4,9$. Todas as sequências possuem apenas um domínio GH16 conservado. (Tabela 5.1).

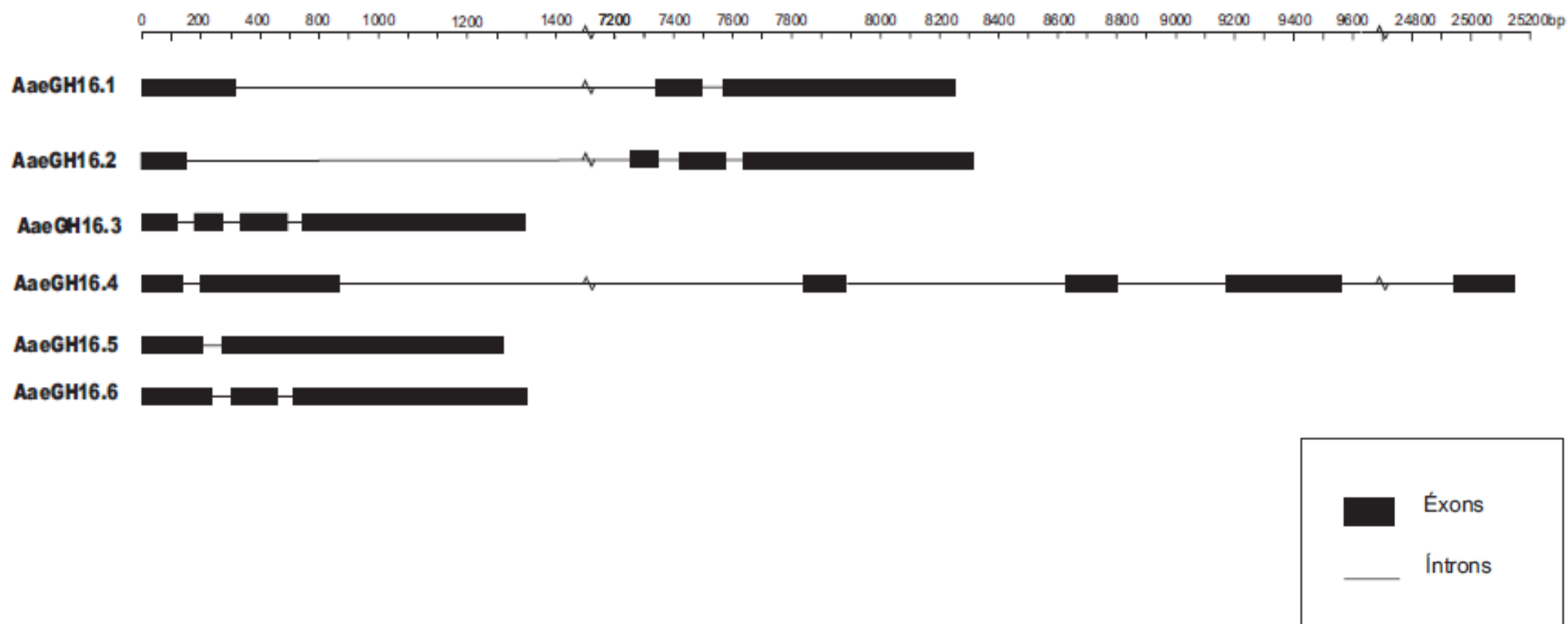


Figura 5.1. Diagrama esquemático da organização de éxons e íntrons nos genes de glicosídeo hidrolases da Família 16 em *Ae.aegypti*

Gene	Código GenBank	Código VectorBase	Número de bases	Número de Éxons	Nº de bases do RNAm
AaeGH16.1	EAT44802.1	AAEL003889	8476	3	1257
AaeGH16.2	EAT44801.1	AAEL003894	8506	4	1185
AaeGH16.3	EAT41280.1	AAEL007064	1287	4	1116
AaeGH16.4	EAT40654.2	AAEL007626	25148	6	1512
AaeGH16.5	EAT40654.2	AAEL009176	1219	2	1161
AaeGH16.6	EAT38986.1	AAEL009178	1300	3	1185

Gene	Presença de Domínio conservado (CDD)	Resíduos na região do CDD	Resíduos com N-Glicosilações	Resíduos com O-Glicosilações
AaeGH16.1	GH16-CCF	82-417	N116 N124 N 242 N 264 N 300	ND
AaeGH16.2	GH16-CCF	57-393	N 91 N 301	T 40 T 41 T 107 T 346
AaeGH16.3	GH16-CCF	47-370	ND	ND
AaeGH16.4	GH16-Beta-GRP	1-326	ND	ND
AaeGH16.5	GH16-CCF	45-385	N 135	T 28 T 29 T 334
AaeGH16.6	GH16-CCF	55-393	N 238	T 342 T 351

Gene	Nº. de bases da região codificante	Nº. de Aminoácidos da proteína traduzida	Presença de Peptídeo sinal	Nº. de Resíduos da proteína madura	Ponto Isoelétrico da proteína madura	Massa Molecular predita da proteína madura
AaeGH16.1	1254	418	SIM	394	5,7	43 kDa
AaeGH16.2	1182	394	SIM	368	5	41 kDa
AaeGH16.3	1113	371	SIM	347	9,8	39 kDa
AaeGH16.4	1509	503	NÃO	503	7,6	57 kDa
AaeGH16.5	1158	386	SIM	370	5,6	41 kDa
AaeGH16.6	1182	394	SIM	371	4,9	41 kDa

Tabela 5.1. Resumo das características das sequências deduzidas de genes da família 16 das glicosídeo hidrolases presentes no genoma de *Ae.aegypti*. Abreviaturas: **CDD (Conserved Domain Database)**, **CDS (Sequencia codificadora de proteína)**, **ND (não identificado)**.

```

AaeGH16.1 1 MIVSCLWPVVLIVASVATSLATGAEVEAVDATETRSFGAGGGGGRAPVTLNRDRNKCVLSP--TTASGSMIQRGRTFCSGDLIFODNFNFLDFEKWEH 98
AaeGH16.2 1 -----MGTMWGAISVILIGLHMLVSDTVSAGKTSSS-----SKCEKSL--TTASGSKAPAG-PFCPGDLIFEDTFDSFELDTWQH 73
AaeGH16.3 1 -----MIQTQKRVTGIGLLFCVVGLIS-----GCKRSP--TTASGFRAPKG-RICSGQLIFODNFNRLDRNVWQH 63
AaeGH16.4 1 -----MVFEDTFQTFDLQKWQR 17
AaeGH16.5 1 -----MKFVLIIGCLLAVALAEESAP-----KCVASP--TTASGSQARAG-PYCSGDLIFEDNFNFLDFEKWEH 61
AaeGH16.6 1 -----MLLPRGSIALVALVAILNVVQADFQYGNR-----KYCKKPSVTTASGSVYRK-TFCSGDLIFEDNFDKLNLEKWEH 71

AaeGH16.1 99 ENTLAGGN-WEFQWYTNRSNSFVENGTLYIRPTLT--ADEYGEHFLSSGTINLRGNHPVEQCTNA-----AFWGCERAGTPTNINLNPVK SARLRTLSS 190
AaeGH16.2 74 ENTLAGTN-WDFQWFTNRSNSFVKEGNLFIPTLS--VDEFGEAFIIRSGVNLNHGGAPADQCTKQ-----STFGCERVGSHVHILNPIKSASLRTVDT 165
AaeGH16.3 64 ENSLGGGN-NEFQWYSGSGRNSYIKNHLYIRPTLT--SDEYGEAFIIRSGVINLNEGPQSQRCTDAPGWAEQIHGCYRRGSPDRILNPVRSARLRTVNS 160
AaeGH16.4 18 EVRIPLDTEAEFLSYQESPENSIVAGHFLFIVPTLLNMPDFNEERIRTGELILSG---CKSPNTN-----EYECRRRAALSTILPPVVSAKLNTKNS 108
AaeGH16.5 62 ENTLAGGN-WEFQWYTNRSNSYCENGIFYIRPTLV--ADDTGEGFLSSGTINLHGGQPADQCTGP-----FFWGCERAGNPSNIINPIKSARVTVDS 153
AaeGH16.6 72 EHTLGGGN-WEFQYLLNRKNSYVENCILYIRPTLL--ADDTGEEFLSSGTINLNGGSPYDSCINP-----AWDGCERTGTPEINLPIKSARLRTLKS 163

AaeGH16.1 191 FNFKYGRAEVRAKLPSGDWLWPAIWLLEPKRNAYGTWPASGEIDLME SRGNENLTVD-GVQIGTRQFGQT LHF GPNPSHNGYNTATRTKNAEPGEEYSGKF 289
AaeGH16.2 166 FAFKYKVEISAKLPAGDWMWPAVTFLEPKYNOYGGWPASGEIDLLESKGNRDLIKN-GINVGIEQVTSKLOFGPNEGYNAGSTATFTRNAESGKYHTGF 264
AaeGH16.3 161 FAFKYKVEINAKLPQGDWLWPAIWLLEPKGDTYGYWPKSGEVDLME SRGNRNLVQN-NEKIGIQKVSCLHFGDNP-----NVRSSQCGSVSGNLF GAMF 254
AaeGH16.4 109 FRFRYGRVEIRAKLPKGDWIFPQILLQPAENYGYADLASGMLMVAHVLSNEHLIT---REGILVDGHRIRGGAILTTKPKLRDAFLKANVLDEHSDNF 205
AaeGH16.5 154 FNFKYGRMEVRAKVPTGDWLWPAIWLLEPKRQVYGSWPASGEIDLME SRGNIDYRNG-GVHIGVEQVGS TLHF GPNPDQNGWATTVAYRNSAAGQGFNNGF 252
AaeGH16.6 164 FNFKYKLEIRAKLPTGDWLWPAIWLLEPKLNQYGTWPTS GEIDLME SRGNLDYRVADGTHIGVEQVGS TLHF GPNPSLNGFETSTAANKSAPGEGNND 263

AaeGH16.1 290 NVYGLWSPDNITVSTINGENVATFEGGEGFWKRAFGDKLN--MENP WRYGSKMAPFDOEFHFLNLAVGGVNGYFPD---NGDNPGGKPKWKNSSPOAATD 384
AaeGH16.2 265 NRYQMEWTPDHVTF SINDIETGTVKVGTGFWARGNFNITSPGMDNP WRYGSKMAPFDOEFYIKISLAIGG-NEYFSD---DDINPTKKPKWKNDSPHFMTD 360
AaeGH16.3 255 NRYQLTWTKNVIQFGINDRIFRTVTPYEGFWRLGGF-----SFNPWPKGSKMAPFDFEFYIVMNAVGG--DYFPD---NAWNPHKPKWRQGNPSAMTD 343
AaeGH16.4 206 HTYGLVWKPDSIALTVDFQYATLRDRFKPYGAANN---LTQANLWNPDNAMSPDFREFYISLGVGVGG-VTDFPDSMTGPLRQPKWNNTSPKAEYF 300
AaeGH16.5 253 HLYQLEWTPDHITFSDVNQVLRNDAGSGFWAKGGFVTTSPASENPMHATTMAPFDOEFYIIMNLAI GGTNGYFPDVPPTNGARGKPKWANTSPTAARD 352
AaeGH16.6 264 HRYQLEWTPFYMKFSVDDEETLVVDG--NFWQRGNFDQRAPGTPNPWI SGGKMAPFDEEFHVIIMNLAVGGTNGYFPD-PPATNKDNPKPWLNKSP TARGG 360

AaeGH16.1 385 FWNRENWLP TWNLDKNDGK DASLQVDYVRVWAL 418
AaeGH16.2 361 FWNARNWLP TWNLDENDAKDASVQVDYVRVWAL 394
AaeGH16.3 344 FYKAKSNWYSTW-----GDAAALEVDYVRVWAA 371
AaeGH16.4 301 FYQNRNVWERTWT-----DPELKVDYVRVYAL 327
AaeGH16.5 353 FWNGRNYWLP TWRMAENRGKESFQVDYVRVWAL 386
AaeGH16.6 361 FWSAKEDWLP TWKLEENDSKEASLQVDYVRVWAL 394

```

Figura 5.2. Alinhamento (programa Clustal X) das seqüências de aminoácidos de membros da família 16 das glicosídeo hidrolases de *Ae. aegypti*. Sítios hipotéticos de glicosilação estão em negrito e sublinhados, resíduos de caráter similar estão em cinza e resíduos completamente conservados em preto. Os resíduos de glutamato catalíticos estão assinalados por um círculo.

5.1.2 Análise filogenética das sequências de glicosídeo hidrolases da família 16 em diferentes ordens de insetos

A análise filogenética comparativa de sequências de proteínas pertencentes à GHF 16 obtidas de diversas espécies de insetos (Figura 5.3) indica um grupo monofilético contendo todas as β -1,3-glucanases que contem os resíduos catalíticos conservados. Algumas dessas sequências foram anotadas sem bancos de dados como GNBPs ou outras proteínas ligantes de glucana, sendo o caso de muitas enzimas do gênero *Anopheles*. O cladograma também mostra um grupo parafilético de sequências de proteínas ligantes de β -glucana sem os resíduos catalíticos. A disposição das sequências nos clados sugere a ocorrência de uma expansão nos genes de β -1,3-glucanases em dípteros nematoceros. As sequências de *Ae. aegypti* que contêm os resíduos catalíticos (AaeGH16.1, 2, 3, 5 e 6) encontram-se em ramos onde estão agrupadas a outras sequências de dípteros nematoceros, o que sugere a diversificação destes genes no ancestral da subordem.

Figura 5.3. Cladograma das sequências de proteínas de β -1,3-glucanases e proteínas ligantes de β -1,3-glucanas de insetos. Os ramos são suportados estatisticamente por análise de bootstrap (cut off 50). Os ramos em azul discriminam as sequências monofiléticas dos insetos que possuem resíduos catalíticos, os ramos em verdes discriminam as sequências parafiléticas que não possuem resíduos catalíticos e todos os ramos em vermelho. ● sinalizam as seis proteínas que codificam para GHF16 em *Ae. aegypti*. Árvore filogenética consenso, utilizando sequências de: *Anopheles gambiae* (AGAP002798-PA, AGAP002799-PA, AGAP002796-PA, AGAP006761-PA, AGAP012409-PA), *Anopheles christyi* (ACHR004102-RA, ACHR005689, ACHR008721-RA, ACHR001881-RA, ACHR009179-RA), *Anopheles darlingi* (ADAR007290-PA, ADAR007286-PA, ADAR006526-PA, ADAR009199-PA), *Anopheles dirus* (ADIR003516-RA, ADIR010616-RA, ADIR003518-RA, ADIR003625-RA, ADIR000553-RA) *Anopheles epiroticus* (AEPI010194-RA, AEPI009256-RA, AEPI005496-RA, AEPI002293-RA), *Anopheles funestus* (AFUN006014-RA, AFUN009437-RA, AFUN006016-RA, AFUN002755-RA, AFUN004083-RA), *Anopheles minimus* (AMIN004837-RA, AMIN003902-RA, AMIN003903-RA, AMIN003900-RA, AMIN010081-RA, AMIN008919-RA), *Anopheles quadriannulatus* (AQUA008516-RA, AQUA009400-RA, AQUA009402-RA, AQUA003848-RA, AQUA014348-RA), *Anopheles stephensi* (ASTE003966-RA, ASTE009324-RA, ASTE009326-RA, ASTE010371-RA, ASTE004573-RA), *Culex quinquefasciatus* (XM_001845911.1, XM_001845228.1, XM_001845913.1, XM_001845759.1, JF907421.1, XM_002135149.1, XM_001845915.1, XM_001847484.1, XM_001847484.1, XM_001845910.1, XM_001845757.1, XM_001864211.1, XM_001845229.1), *Phlebotomus papatasi* (PPATMP000880-PA, PPATMP002587-PA, PPATMP002588-PA, PPATMP010440-PA), *Rhodnius prolixus* (RPRC011769-PA, RPRC003210-PA, ABU96697.1), *Simulium vittatum* (EU930267.1), *Anopheles arabiensis* (ACN38171.1, CAO83421.1), *Anopheles bwambae* (ABU80038.1), *Anopheles melas* (ABU80011.1), *Anopheles merus* (ABU80005.1, AAZ08489.1, AAZ08502.1), *Ochlerotatus triseriatus* (ACU30929.1), *Phlebotomus perniciosus* (ADH94599.1). Os valores de bootstrap foram obtidos da análise de 10000 replicatas, utilizando o algoritmo Neighbor-Joining (software MEGA 5.05). Código das demais sequências em anexo.

5.2 Caracterização bioquímica em larvas de *Ae. aegypti*

5.2.1 Distribuição tecidual da atividade β -1,3-glucanásica

As β -1,3-glucanases são um grupo de enzimas que pertencem à GHF16. Uma vez que obtivemos dados da presença de genes que codificam para proteínas dessa família no genoma de *Ae. aegypti*, decidimos investigar se larvas desse inseto possuíam atividade enzimática para β -1,3 glucanases usando laminarina (β -1,3-glucana da alga parda *Laminarina digitata*) como substrato. Foram realizados ensaios com os diferentes tecidos do inseto e averiguamos a distribuição das atividades enzimáticas nesses tecidos. As frações solúveis de tubos digestivos, resto do corpo (traqueias, corpo gorduroso, exoesqueleto etc.) e cabeças das larvas de *Ae. aegypti* possuem uma considerável atividade enzimática sobre laminarina (Figura 5.4 A). A cabeça apresentou uma atividade de $5,4 \pm 0,2$ μ U/inseto, o tubo digestivo $6,2 \pm 0,6$ μ U/inseto e resto do corpo 35 ± 3 μ U/inseto. Para nos certificarmos de que a dieta das larvas não estava influenciando na atividade enzimática detectada no tubo digestivo, realizamos ensaios com alíquotas da dieta controle (ração de gato) não sendo observada atividade de β -1,3-glucanase significativa, com valores equivalentes a $0,08$ μ U/inseto. Para isso, calculamos a atividade presente em uma massa de alimento correspondente à massa do tubo digestivo de uma larva. Apesar do resto do corpo ter apresentado uma maior atividade por inseto, a cabeça foi o tecido que apresentou a maior atividade específica, com 1.100 ± 100 μ U/mg, seguida pelo resto do corpo com 71 ± 4 μ U/mg e tubo digestivo com 48 ± 4 (Figura 5.4 B).

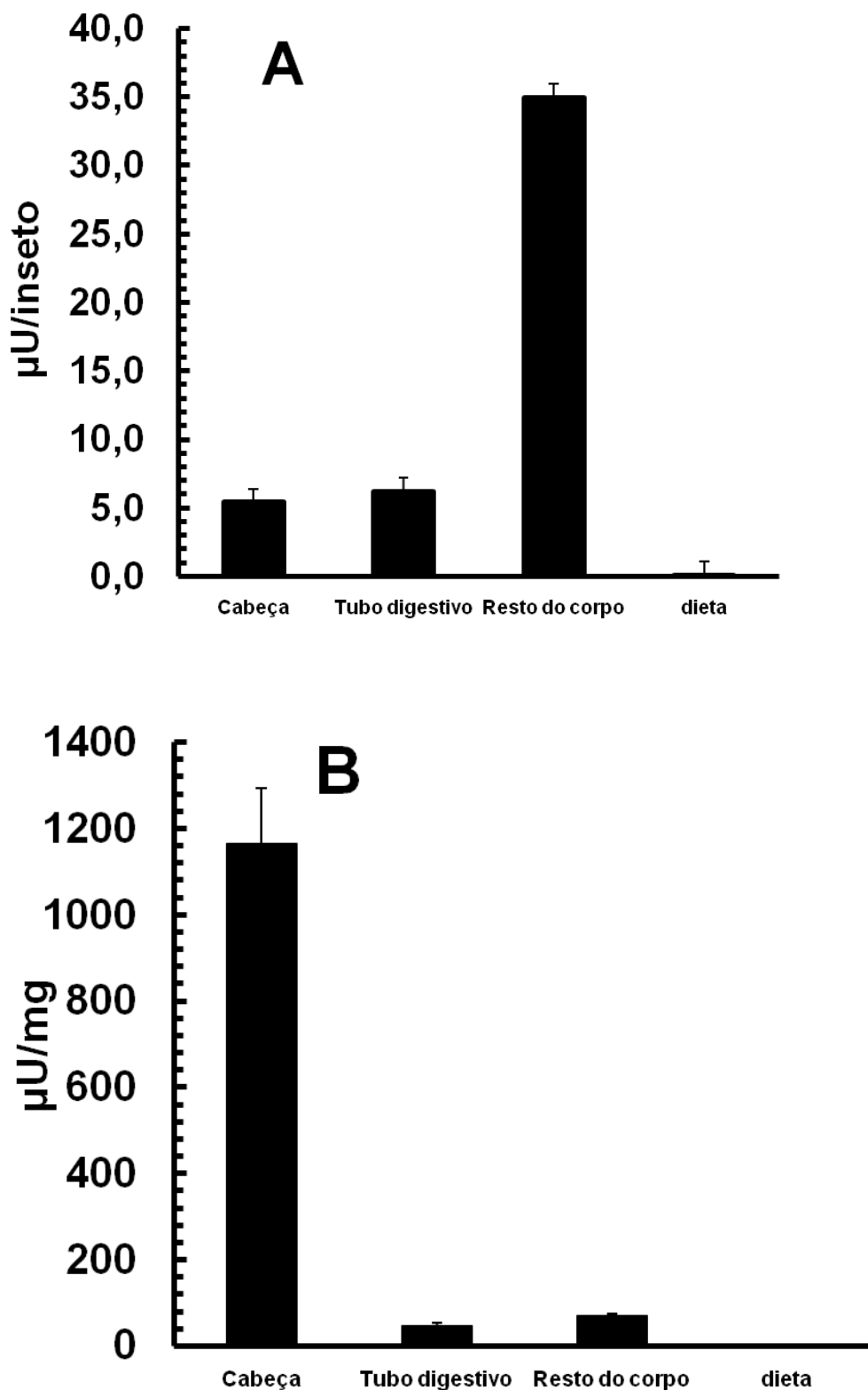


Figura 5.4 Atividades β -1,3- glucanásicas nos diferentes tecidos das larvas de *Ae. aegypti* e na dieta. A atividade foi determinada usando laminarina como substrato e tampão citrato, pH7, 200 mM sob temperatura ambiente. (A) Atividade enzimática total (μ U/inseto) e (B) Atividade específica (μ U/mg). Para o cálculo da atividade na dieta correspondente a um inseto, usou-se a massa de 0.01 mg por tubo digestivo, a qual foi obtida pela pesagem de 5 lotes contendo 5 intestinos cada.

5.2.3 Efeito do pH nas atividades β -1,3 glucanásicas presentes nos diferentes tecidos

Para caracterizar as atividades de β -1,3-glucanases encontradas em larvas de *Ae. aegypti* decidimos fazer comparações em termos de propriedades cinéticas e moleculares. Inicialmente, determinamos o efeito do pH nas atividades de β -1,3 -glucanases dos diferentes tecidos. As β -1,3-glucanases de larvas de *Ae. aegypti* apresentaram atividades máximas entre os pH 6-9 na cabeça (Figura 5.5A), 5-9 no tubo digestivo (Figura 5.5B) e 5-10 no resto do corpo (Figura 5.5C).

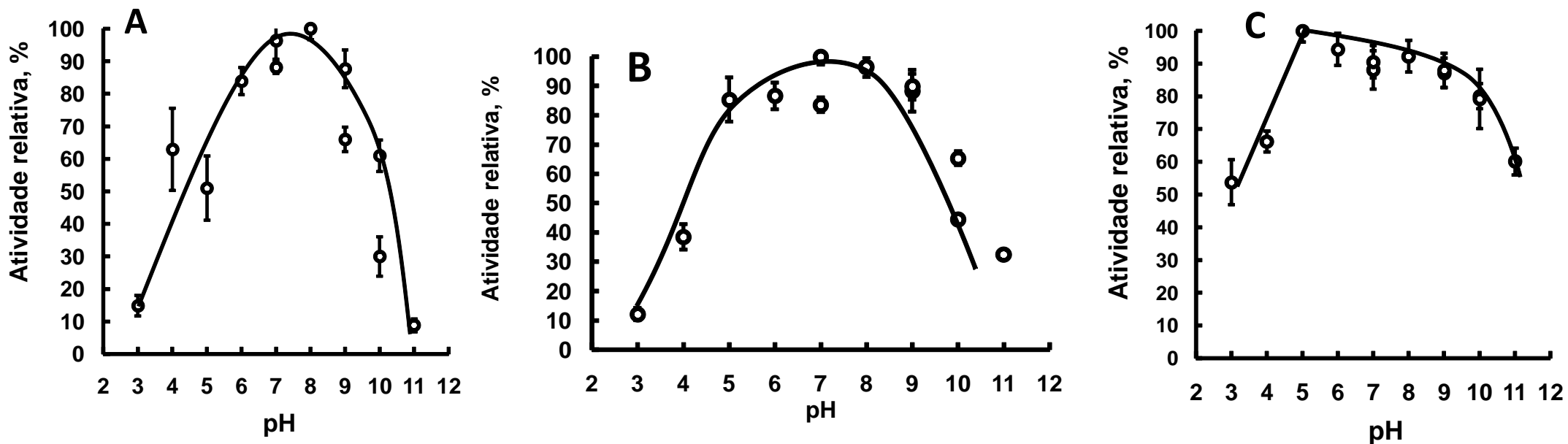


Figura 5.5. Efeito do pH nas atividades β -1,3-glucanásicas presentes na cabeça (A), tubo digestivo (B) e resto do corpo (C) de larvas de *Ae. aegypti*. A Atividade foi determinada usando laminarina como substrato e os tampões: citrato de sódio (pH 3-7, 200mM), EPPS (pH 7-9, 200 mM), AMPSO (pH 9-10,200 mM) e CAPS (pH10-11,200 mM), mantidos em temperatura ambiente.

5.2.4 Determinação da massa molecular de β -1,3-glucanases

O próximo passo foi submeter separadamente as frações solúveis dos homogenatos provenientes dos diferentes tecidos larvais a uma cromatografia de filtração em gel (coluna Superdex 200/AKTA-FPLC), de forma a determinar a massa molecular nativa das β -1,3-glucanases em cada tecido do inseto. Observamos a presença de diferentes atividades de β -1,3-glucanase e foram e suas respectivas massas moleculares foram estimadas (Figura 5.6). A atividade da fração solúvel do tubo digestivo foi eluída da coluna na forma de um pico com massa molecular relativa de 41 kDa. As atividades de cabeça e resto do corpo apresentaram-se também na forma de um único pico com respectivas massas moleculares de 142 kDa e 150 kDa.

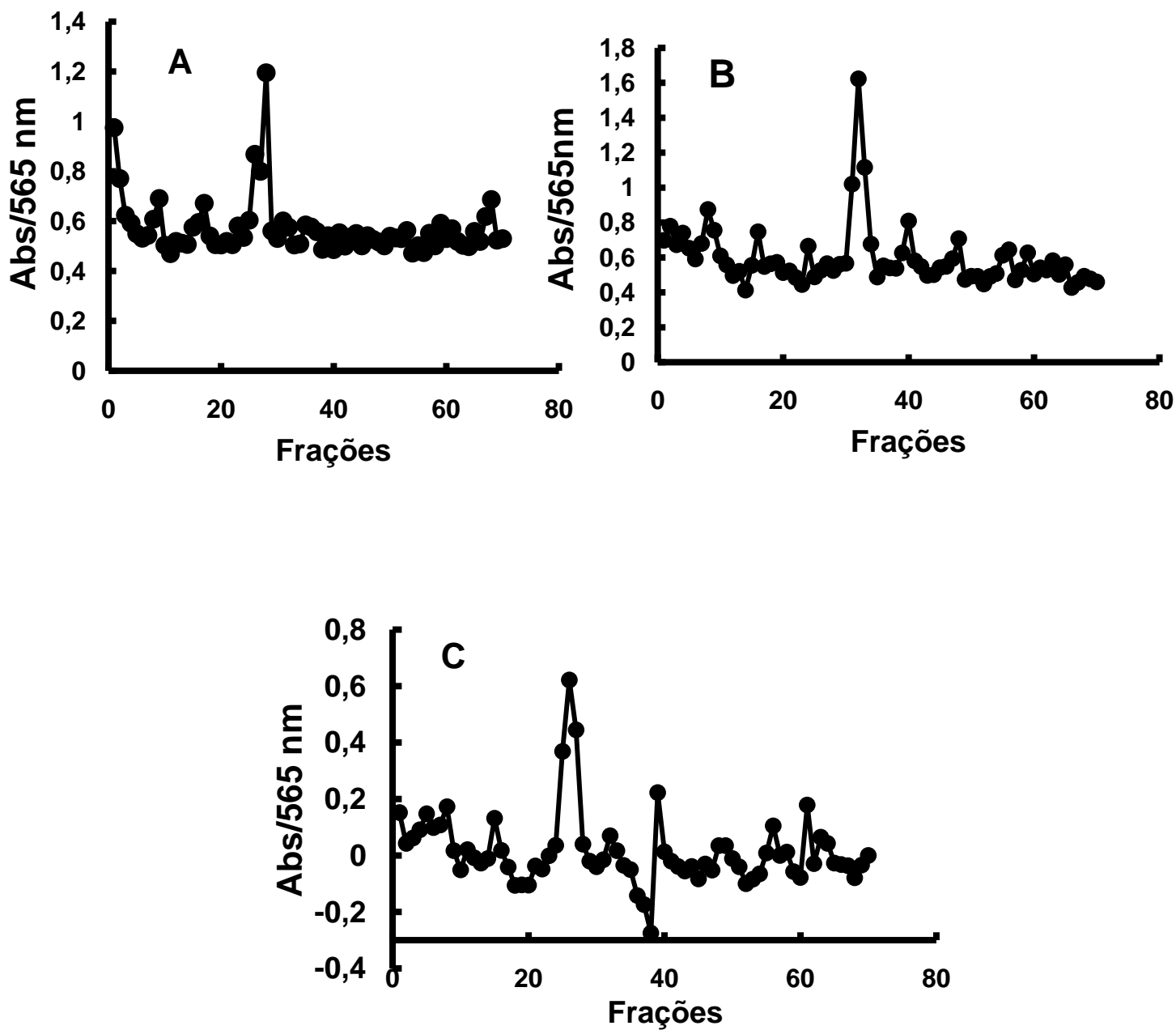


Figura 5.6. Perfis de atividade sobre laminarina após cromatografia de filtração em gel coluna Superdex 200/AKTA FPLC. Os perfis de eluição correspondem às cromatografias da fração solúvel da (A) cabeça, (B) tubo digestivo e (C) resto do corpo.

5.3 Digestão de leveduras e indução de β -1,3-glucanases em larvas de *Ae. aegypti*

5.3.1 Parâmetros fisiológicos de larvas alimentadas com leveduras

Algumas larvas de culicídeos ou mosquitos são conhecidas por possuírem a interessante característica de serem filtradoras quando separadas por grupos funcionais de alimentação. Insetos filtradores alimentam-se de material orgânico particulado fino, filtrando partículas em suspensão ou detritos finos do sedimento. Dentro desse contexto, os estádios imaturos de *Ae. aegypti* são modelos de insetos filtradores e por isso alimentem-se de diversos micro-organismos presentes no ambiente, incluindo leveduras. Apesar das larvas aquáticas serem denominadas detritívoras, pouco se sabe realmente sobre a fonte desses detritos e como ocorre a digestão do mesmo. As β -1,3-glucanases digestivas apresentam atividade enzimática considerável em insetos, destacando-se sua capacidade de digestão de leveduras em *Tenebrio molitor* e *Periplaneta americana* (Genta *et al.* 2003, 2009).

Decidimos inicialmente avaliar se larvas de *Ae. aegypti* são capazes de se alimentar exclusivamente de uma dieta de leveduras e se alguns parâmetros fisiológicos do inseto seriam alterados. No primeiro experimento de alimentação foram utilizadas duas espécies de leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* (cepa H14) e uma levedura do gênero *Ustilago*, ainda não caracterizada, isolada do tubo digestivo de flebotomíneos da região Nordeste do Brasil (Teresina, Piauí) pelo Prof. Rod Dillon (Universidade de Lancaster). Quando expostas a uma dieta com as duas espécies distintas de leveduras autoclavadas, observamos que larvas alimentadas com *Ustilago* sp apresentaram uma massa corporal maior do que os insetos controle ou alimentados com *S. cerevisiae* ($p < 0,05$) (Figura 5.7).

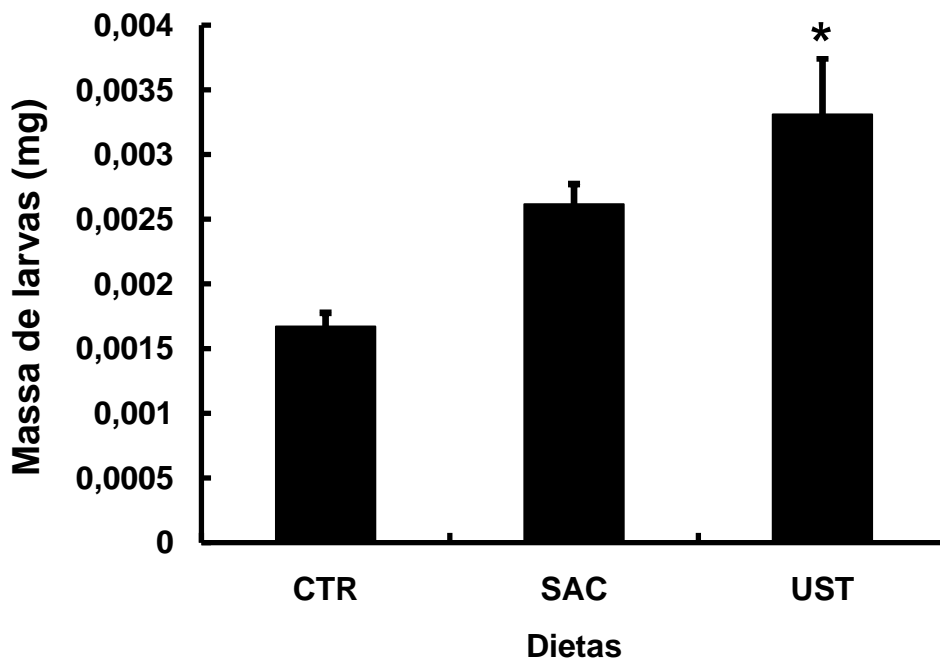


Figura 5.7 Medidas das massas de larvas de *Ae. aegypti* alimentadas com diferentes dietas: ração de gato (controle-CTR), *Saccharomyces cerevisiae* (SAC) e *Ustilago* sp (UST). * $p < 0.05$. Larvas foram avaliadas no estágio L4 intermediário em grupos de 5.

Uma vez que as larvas apresentaram um massa corporal maior em uma dieta contendo exclusivamente *Ustilago* sp, decidimos testar se as mesmas são capazes de sobreviver em uma dieta composta exclusivamente de células de *Ustilago* sp vivas, a partir da eclosão dos ovos. Avaliamos as massas das larvas em estágio L4, pupas e adultos (machos e fêmeas), a porcentagem de pupação, emergência de adultos e a mortalidade de larvas e pupas (Figuras 5.8, 5.9 e 5.10).

Ae. aegypti parece se desenvolver de forma satisfatória em uma dieta exclusiva de *Ustilago* sp, apresentando novamente larvas com uma maior massa corporal ($p < 0,05$) e parâmetros de desenvolvimento como pupação e emergência de adultos com valores de p significativamente diferentes do controle ($p < 0,0001$).

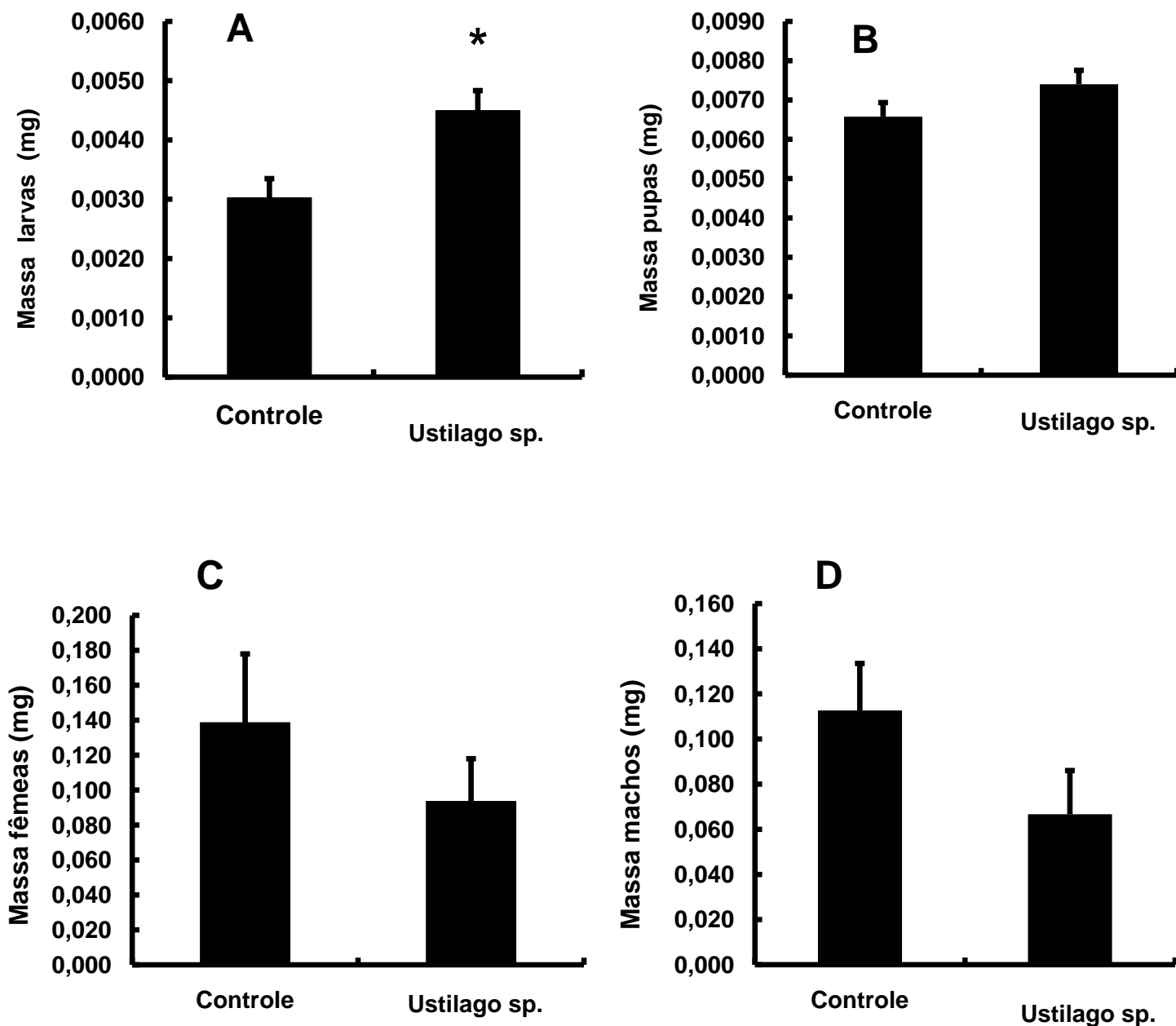
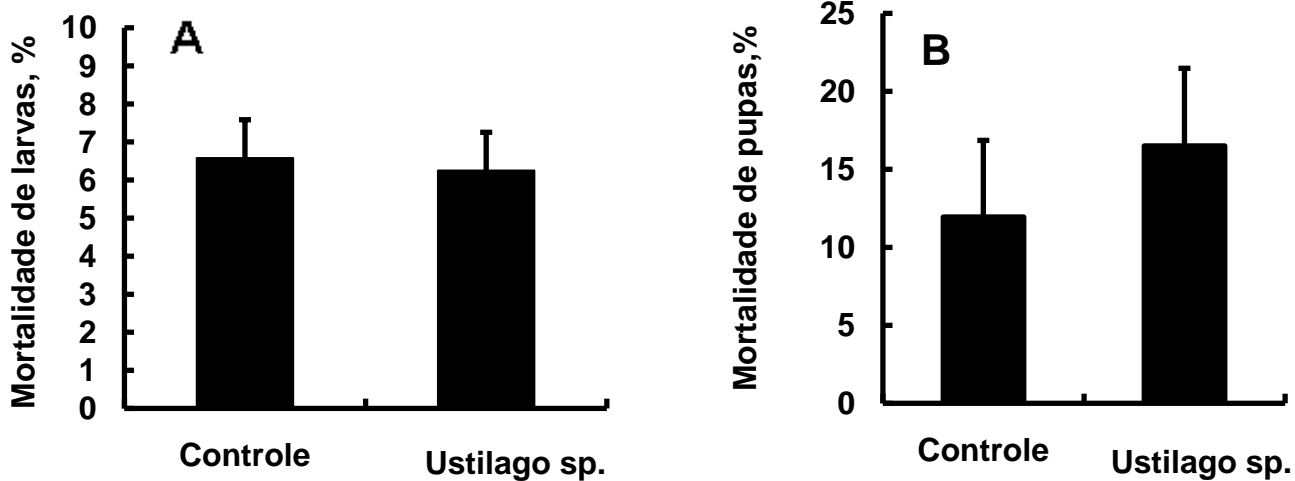
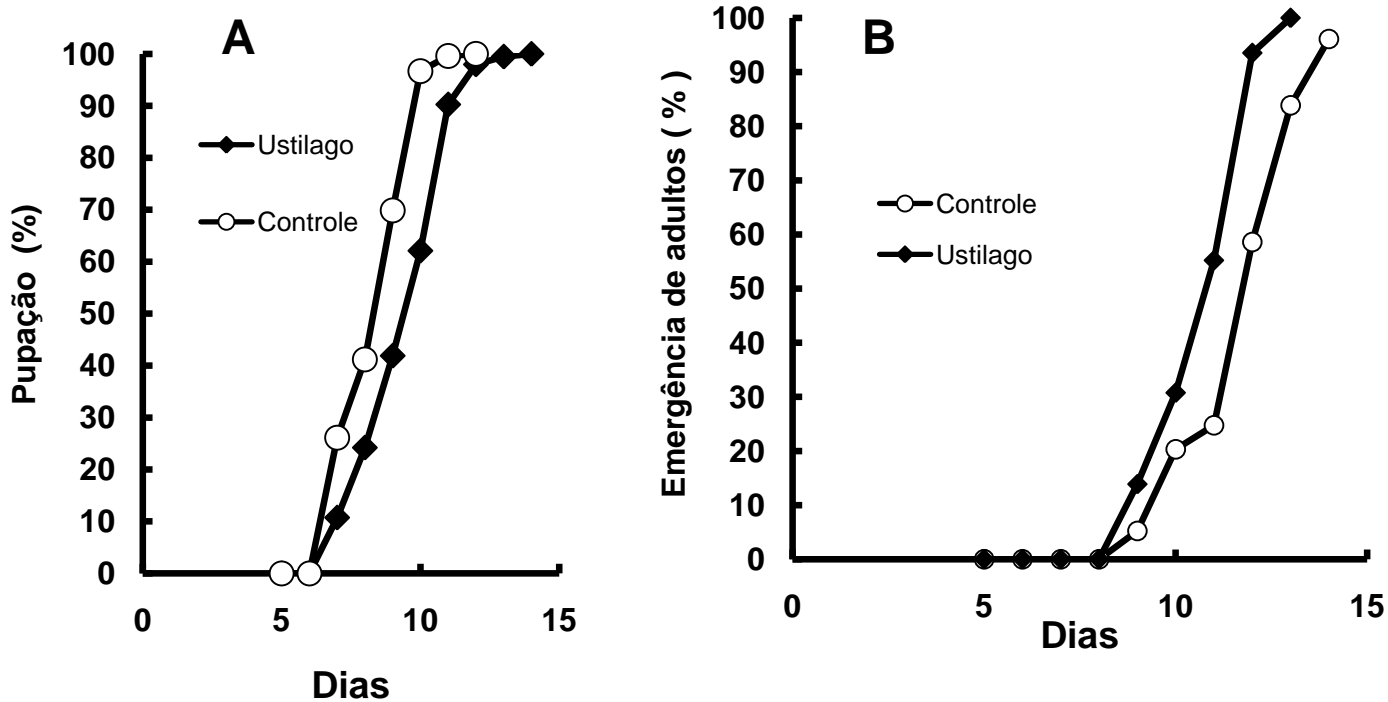


Figura 5.8. Massas corporais de *Ae. aegypti* alimentadas com ração de gato (controle) e *Ustilago* sp. (A) Massa das larvas, (B) Massa das pupas, (C) Massa de adultos fêmea e (D) Massa de adultos machos. *p value < 0.05. Larvas foram pesadas no estágio L4 intermediário em grupos de 5, pupas foram pesadas em grupos de 3 e os adultos foram pesados em grupos de 3 indivíduos.



O homogenato do tubo digestivo das larvas de *Ae. aegypti* parece possuir enzimas capazes de digerir as paredes de *Ustilago* sp ocasionando a morte celular dessa levedura em meio hipotônico (Figura 5.11). Apenas 30 % dessas células continuaram viáveis depois de 4 h de incubação com o homogenato do intestino das larvas (Figura 5.11). Os resultados sugerem que as enzimas presentes no conteúdo luminal das larvas sejam capazes de atacar a parede celular desse fungo.

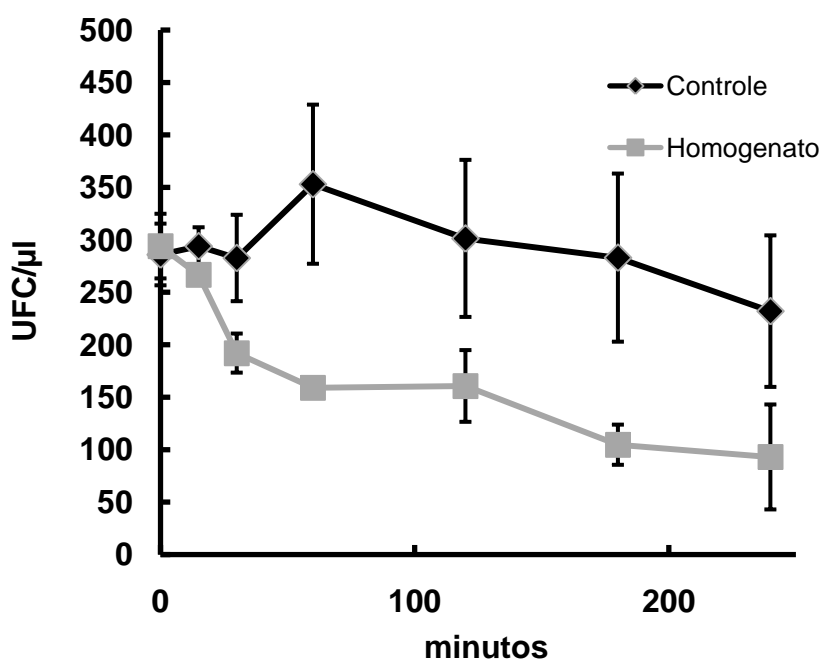


Figura 5.11 Lise de células de *Ustilago* sp em meio hipotônico durante incubação com extrato do homogenato de tubo digestivo das larvas de *Ae.aegypti*. UFC (Unidades formadoras de colônia)

5.3.2 A atividade de β -1,3-glucanases em larvas de *Ae. aegypti* alimentadas com leveduras

Como já mencionado anteriormente, larvas de *Ae. aegypti* são consideradas detritívoras, utilizando como fonte nutricional a ingestão de fungos, algas, bactérias e outros materiais orgânicos particulados. O comportamento alimentar dos insetos está diretamente relacionado com a digestão, e o processamento desses alimentos adquiridos irá prover as necessidades para o crescimento e o desenvolvimento das larvas. Uma vez que observamos que dietas com leveduras são favoráveis ao desenvolvimento das larvas do inseto, decidimos pesquisar se larvas de *Ae. aegypti* alimentadas com células vivas de *Ustilago* sp seriam capazes de induzir uma atividade maior de β -1,3-glucanases. Foram avaliadas as frações solúveis e insolúveis de todos os tecidos das larvas assim como das dietas testadas. A análise de frações insolúveis foi realizada apenas nas amostras de cabeça e tubo digestivo. Nossa hipótese se baseava na possibilidade dessas enzimas estarem aderidas nas paredes das leveduras e permanecerem no precipitado após os procedimentos de centrifugação. Não conseguimos observar um aumento da atividade enzimática de β -1,3-glucanases nas larvas alimentadas apenas com leveduras vivas (Figuras 5.8 a 5.10). O resto do corpo continua a ser o tecido com maior atividade enzimática por animal (8 ± 4 e $3,5 \pm 0,9$ μ U/inseto-valores de controle e *Ustilago* respectivamente) seguido por tubo digestivo ($3,5 \pm 0,9$ e $3,1 \pm 0,8$ μ U/inseto) e cabeça ($2,9 \pm 0,4$ e $1,2 \pm 0,4$ μ U/inseto). Esses resultados sugerem que essas atividades não sofreram alterações quando as larvas são expostas a uma dieta rica em leveduras vivas (Figura 5.12). As atividades encontradas nas alíquotas das dietas são desprezíveis (dados não mostrados).

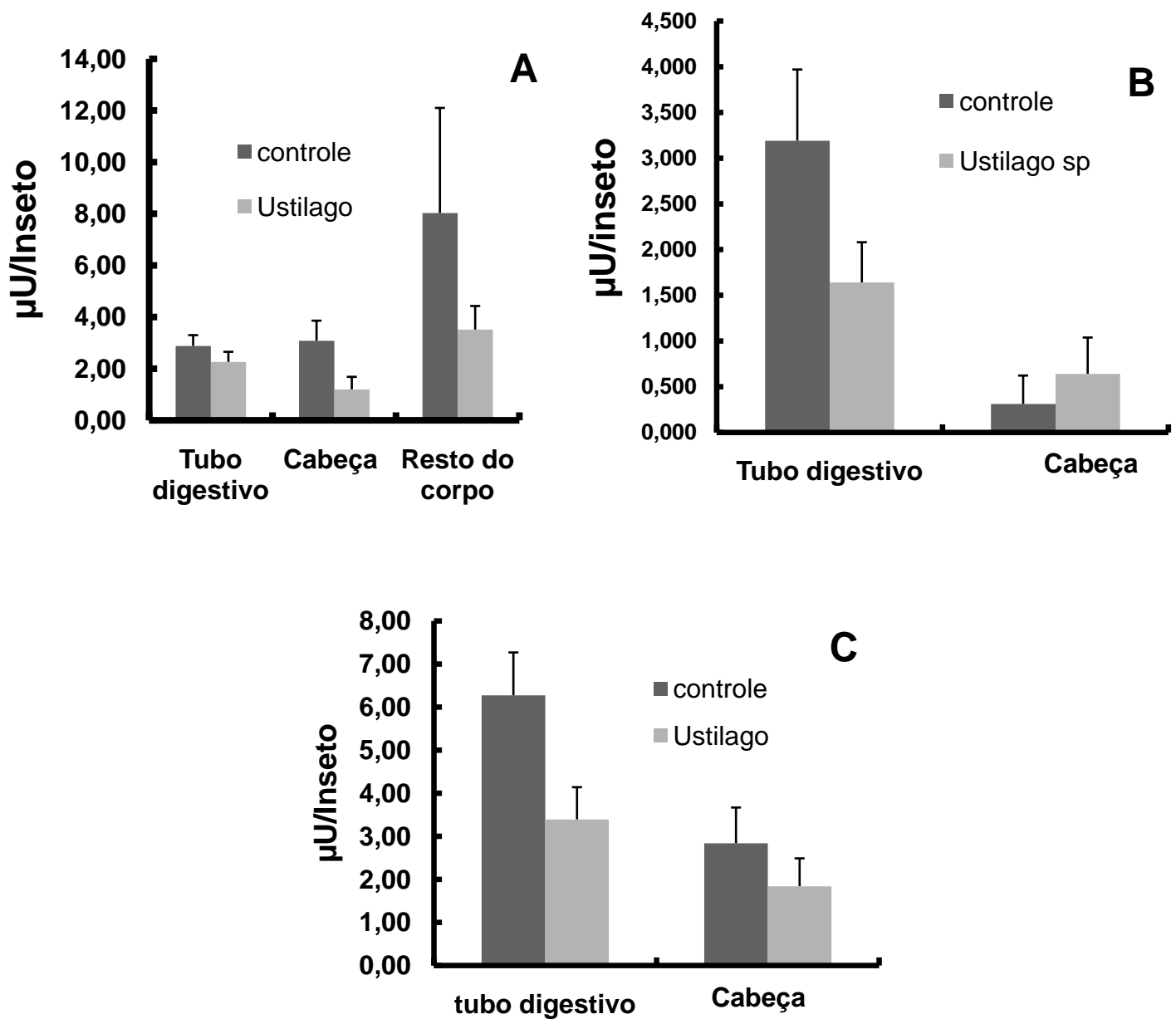


Figura 5.12. Atividades de β -1-3-glucanases (substrato laminarina) nos diferentes tecidos das larvas de *A.aegypti* após alimentação com diferentes dietas (ração de gato ou células de *Ustilago* sp vivas). (A) Distribuição da atividade enzimática (μ U/animal) nas frações solúveis, (B) distribuição das atividades enzimáticas (μ U/animal) nas frações insolúveis e (C) Perfil da soma entre as frações solúveis e insolúveis de tubo digestivo e cabeça

Em uma nova tentativa de averiguar se as atividades enzimáticas de β -1,3-glucanases podem ser induzidas a um aumento significativo por uma dieta de leveduras, alimentamos as larvas com células de *Ustilago* sp autoclavadas. Nossa hipótese era que as enzimas processassem mais rapidamente a parede da levedura já previamente rompida (Figura 5.13). Novamente foram testadas todas as frações solúveis dos tecidos. Dessa vez, além de ensaiar as frações insolúveis da cabeça e do tubo digestivo, ensaiamos também o material precipitado do resto do corpo. De maneira bastante similar ao experimento passado, não observamos uma indução dessa atividade enzimática quando alimentamos com leveduras autoclavadas. Aparentemente o tubo digestivo das larvas parece ter mais atividade na fração insolúvel (3 ± 1 e 4 ± 2 $\mu\text{U/inseto}$ -valores de controle e *Ustilago* respectivamente) do que na solúvel ($0,6 \pm 0,3$ e $0,8 \pm 0,4$ $\mu\text{U/inseto}$). O resto do corpo continua sendo a amostra que apresenta maior atividade por inseto (8 ± 2 e 11 ± 2 $\mu\text{U/inseto}$ nas solúveis e 4 ± 1 e 4 ± 4 $\mu\text{U/inseto}$ nas insolúveis). Curiosamente a amostra de cabeça apresentou um perfil de atividade muito baixo em insetos alimentados com *Ustilago* sp autoclavados ($0,4 \pm 0,2$ e 0 em controles e *Ustilago* nas frações solúveis e 3 ± 2 e $0,1 \pm 0,1$ $\mu\text{U/inseto}$ nas insolúveis) (Figura 5.13) .

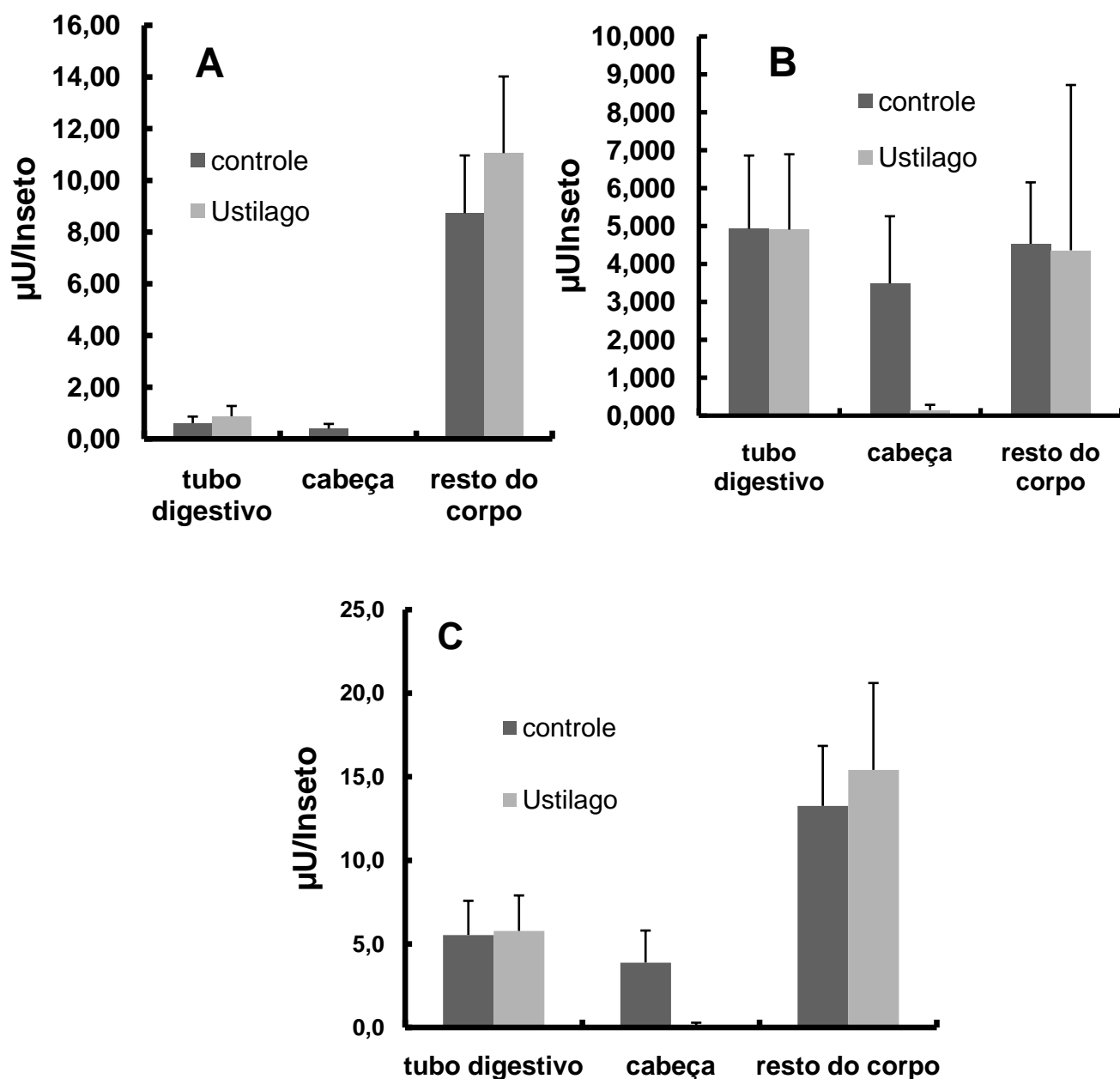


Figura 5.13 Atividades de β -1-3-glucanases (substrato laminarina) nos diferentes tecidos das larvas de *Ae. aegypti* após alimentação com diferentes dietas (ração de gato ou células de *Ustilago* sp autoclavadas). (A) Distribuição da atividade enzimática ($\mu\text{U}/\text{animal}$) nas frações solúveis, (B) distribuição das atividades enzimáticas ($\mu\text{U}/\text{animal}$) nas frações insolúveis e (C) Soma das atividades solúveis e insolúveis.

5.4 Caracterizações da expressão de genes da GHF 16 em larvas de *Ae. aegypti*

5.4.1 Expressão dos genes GHF16 nos diferentes tecidos

A expressão de transcritos codificantes de GHF 16 (β -glucanases ou proteínas ligantes de β -glucana) foi avaliada em larvas inteiras e nos tecidos das larvas: cabeça, tubo digestivo e resto do corpo.

Oligonucleotídeos específicos foram desenhados e utilizados na técnica de amplificação de fragmentos a partir de DNA genômico e moldes de fitas simples de cDNA (RT-PCR). Foram amplificados fragmentos com tamanhos concordantes ao esperado tanto a partir de DNA (Figura 5.14) como de cDNA (Figura 5.15). Todos os tecidos das larvas parecem expressar os seis genes em diferentes níveis.

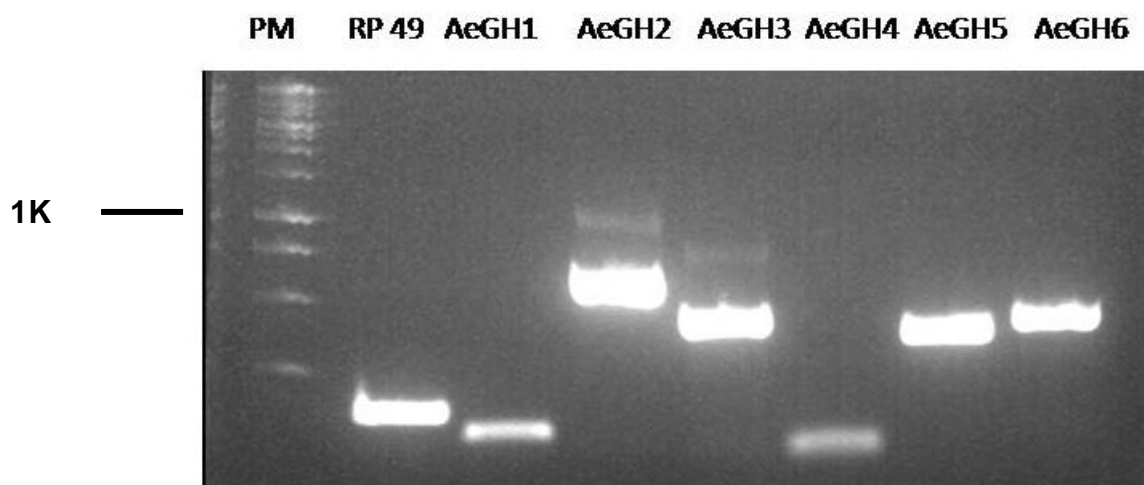


Figura 5.14 Amplificação por PCR de fragmentos dos genes que codificam para proteínas GHF16 a partir do DNA genômico de larvas L4 de *Ae. aegypti*. (PM - Padrão molecular de 1KB PROMEGA #100787-018; RP49 - gene constitutivo ribossomal; AeGH1, AeGH 2, AeGH3, AeGH4, AeGH5 eAeGH6 são os seis genes que codificam para genes GHF16). Foi extraído o DNA genômico das larvas e foram utilizados iniciadores específicos para cada gene. Após 40 ciclos os produtos de PCR foram analisados em um gel de agarose e revelados por uma solução contendo brometo de etídeo.

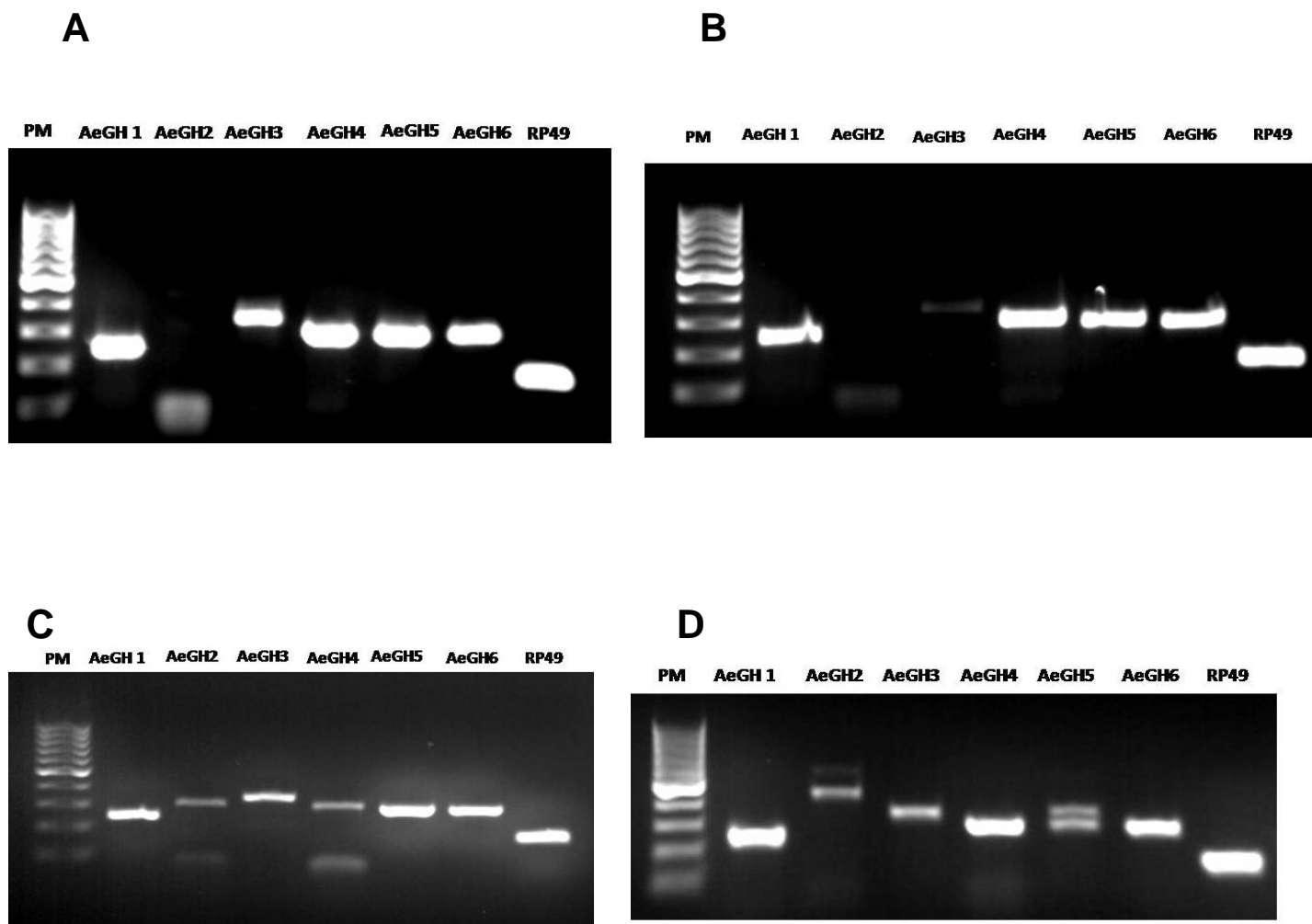


Figura 5.15 Amplificação de fragmentos dos transcritos que codificam proteínas GHF16 a partir do cDNA obtido de (A) larva L4, (B) cabeça, (C) tubo digestivo e (D) resto do corpo. (PM - Padrão molecular de 100pb PROMEGA #15628-019; RP49 - gene constitutivo ribossomal; AeGH1, AeGH2, AeGH3, AeGH4, AeGH5 e AeGH6 são os seis genes que codificam para GHF16). Foi extraído o RNA das larvas e tecidos, o cDNA gerado a partir desse RNA por RT foi utilizado para as reações de PCR com iniciadores específicos. Após 40 ciclos de amplificação os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose e revelados com brometo de etídeo. A banda mais intensa equivale a 500pb.

5.4.2 Cálculo das expressões relativas dos genes de GHF16

Para tentar diferenciar os níveis de expressão desses genes nos tecidos e na larva inteira, decidimos calcular a expressão relativa de forma semi quantitativa através de várias reações de RT-PCR. Foram testados diferentes números de ciclos, gerando uma curva de saturação do produto amplificado e fornecendo dados para se criar uma correlação de um ou mais genes com um tecido específico e assim sugerir quais genes parecem ser mais ou menos expressos nas larvas e nos diferentes tecidos. As larvas inteiras parecem expressar mais os genes AaeGH16.4, AeGH16.5 e AaeGH16.6, utilizando-se 27 ciclos como parâmetro ideal de avaliação do produto amplificado antes da saturação (Figura 5.16). Na cabeça das larvas os genes mais expressos são AeGH16.1 e AaeGH16.4, usando 27 ciclos para comparação (Figura 5.17).

No tubo digestivo AaeGH16.5 e AeGH16.6 utilizando-se 24 ciclos (Figura 5.18) e no resto do corpo AaeGH16.1 e AeGH16.4, usando 27 ciclos (Figura 5.19). Os genes AaeGH16.2 e AaeGH16.3 parecem ser poucos expressos em larvas de *Ae. aegypti*.

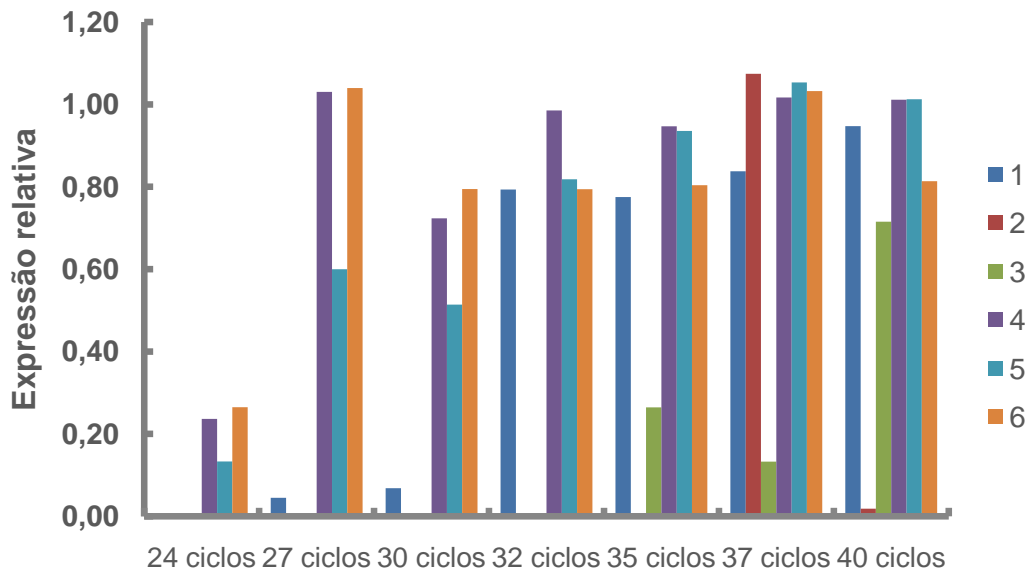


Figura 5.16. Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas GHF 16 em larvas L4 de *Ae. aegypti*. Curva de saturação dos seis genes após reações de PCR com número crescentes de ciclos (de 24 a 40 ciclos).

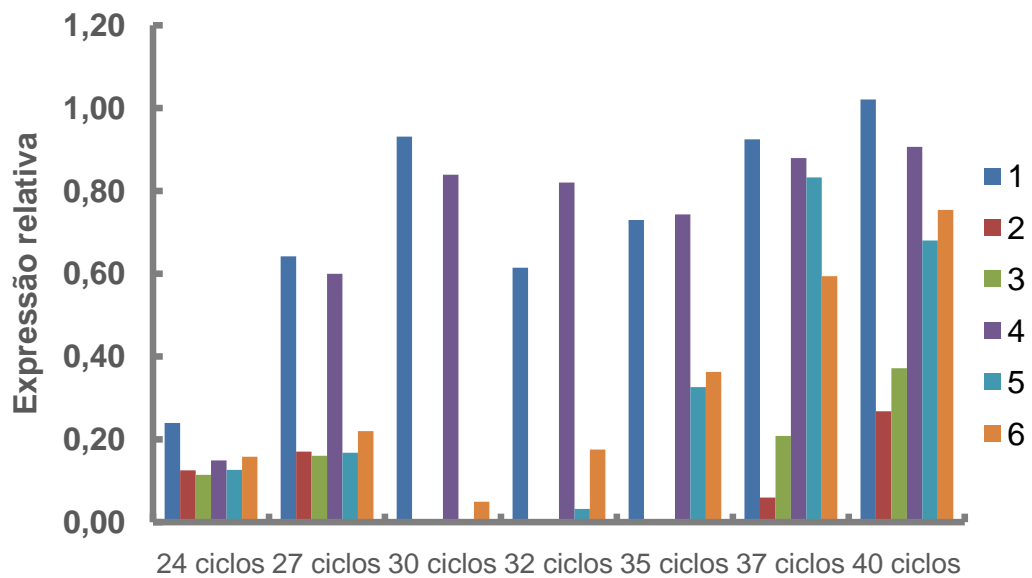


Figura 5.17 Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas da GHF 16 na cabeça das larvas L4 de *Ae. aegypti*. Curva de saturação dos seis genes após reações de PCR com número crescentes de ciclos (24 a 40 ciclos).

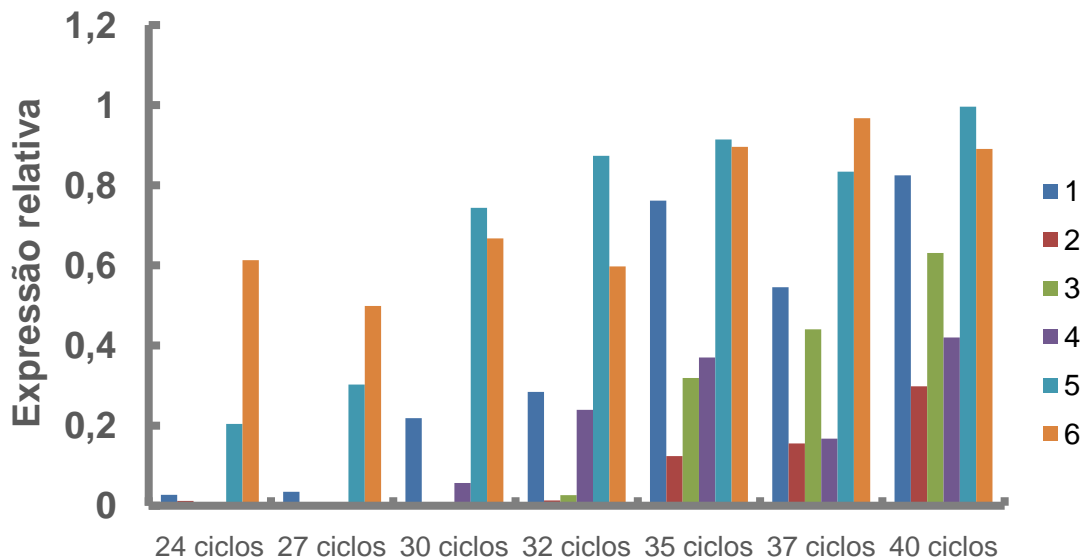


Figura 5.18 Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas da GHF 16 no tubo digestivo das larvas L4 de *Ae. aegypti*. Curva de saturação dos seis genes após reações de PCR com número crescentes de ciclos (24 a 40 ciclos).

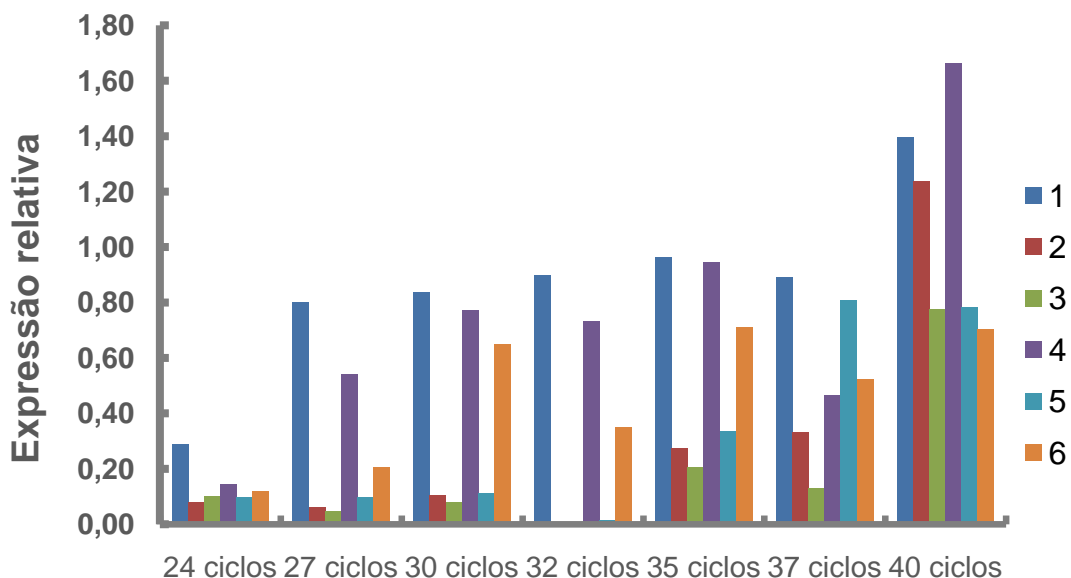


Figura 5.19 Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas da GHF 16 no resto do corpo das larvas L4 de *Ae. aegypti*. Curva de saturação dos seis genes após reações de PCR com número crescentes de ciclos (24 a 40 ciclos).

5.5 Investigação das funções de proteínas da GHF16 em larvas de *Ae. aegypti*

5.5.1 Silenciamento dos genes que codificam para proteínas da GHF16

RNA de interferência (RNAi) tem revolucionado estudos para determinação da função gênica. Para explorar a possibilidade de se usar a ferramenta de RNAi em larvas de *Ae. aegypti* e entender um pouco mais o papel de cada um dos genes que codificam para GHF 16, nós utilizamos o protocolo bem sucedido de Singh *et al.* 2013. Os RNAs foram escolhidos de acordo com os resultados obtidos no padrão da expressão gênica (Figuras 5.16 a 5.19) e os genes mais expressos nas larvas foram selecionados, sendo eles os genes: AeGH16.1, AeGH16.4, AeGH16.5 e AeGH16.6. Como controles utilizamos larvas alimentadas somente com água e larvas alimentadas com dsRNA para GFP.

Nós avaliamos a sobrevivência das larvas até o quinto dia após a ingestão de dsRNA. Os dados da curva de sobrevivência indicam que o *knockout* gene GH 5 esta associado com uma maior mortalidade, seguido respectivamente pelos genes GH6, GH4 e GH1, se comparados aos grupos controles GFP e água (Figura 5.20). Em todos os experimentos levamos em consideração as comparações dos grupos controles entre si e dos controles individualmente com cada um dos genes silenciados. Os controles apresentaram curvas de sobrevivência e porcentagens de pupação normais. O grupo GH4 foi o único que apresentou parâmetros (taxa de mortalidade e porcentagem de pupação) semelhantes à dos controles.

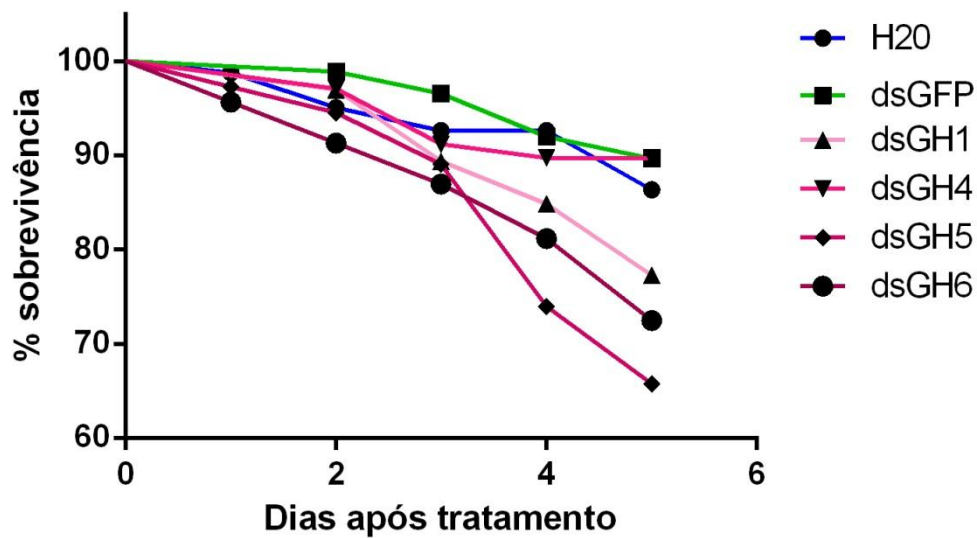


Figura 5.20 Curva de sobrevivência de larvas de *Ae. aegypti* após tratamento com dsRNA ao longo dos dias. GH1/GH4/GH5/GH6 (genes alvo) e GFP/H₂O (genes controle).

O próximo parâmetro biológico avaliado foram as taxas de pupação, e foi observado que as larvas tratadas sofrem um atraso da pupação, destacando-se as larvas silenciadas para o gene GH5, que apresentou a taxa de pupação mais lenta, seguidos por GH6, GH1 e GH4. Não foram observadas alterações estruturais na aparência externa das larvas em nenhum dos grupos experimentais (Figura 5.21).

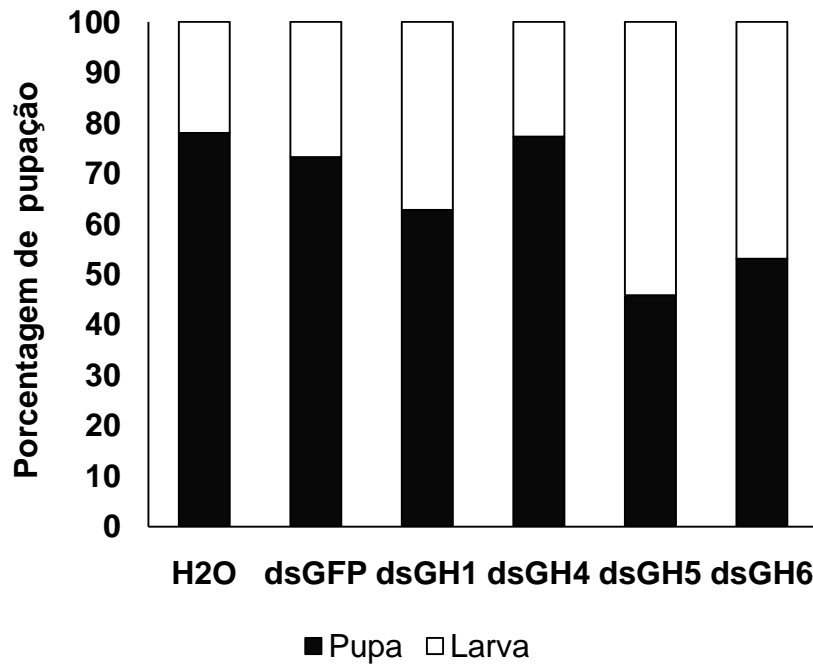


Figura 5.21 Percentual de larvas e pupas de *Ae.aegypti* nos diferentes grupos após tratamento com dsRNA e desenvolvimento por 12 dias em dieta controle (ração de gato). GH1/GH4/GH5/GH6/GFP/H₂O equivalem aos genes silenciados e aos grupos controles, respectivamente.

Larvas de mosquitos passam por enormes desafios bióticos e abióticos que afetam seu desenvolvimento e sobrevivência. Uma vez que obtivemos um fenótipo moderado (Figuras 5.20 e 5.21) decidimos repetir o experimento em condições de estresse, usando os genes silenciados que apresentaram uma maior mortalidade nas larvas e um maior atraso na pupação, sendo eles os genes AeGH16.1, AeGH16.5 e AeGH16.6. Separamos uma quantidade maior de larvas e restringimos as mesmas a compartimentos muito menores e não foi adicionado nenhum tipo de alimentação durante 2 dias. Essas condições desfavoráveis de alta densidade e restrição alimentar resultaram na morte de quase todas as larvas dos grupos silenciados e uma sobrevivência de 100% das larvas tratadas com água e de mais da metade das larvas tratadas com GFP (Figura 5.22).

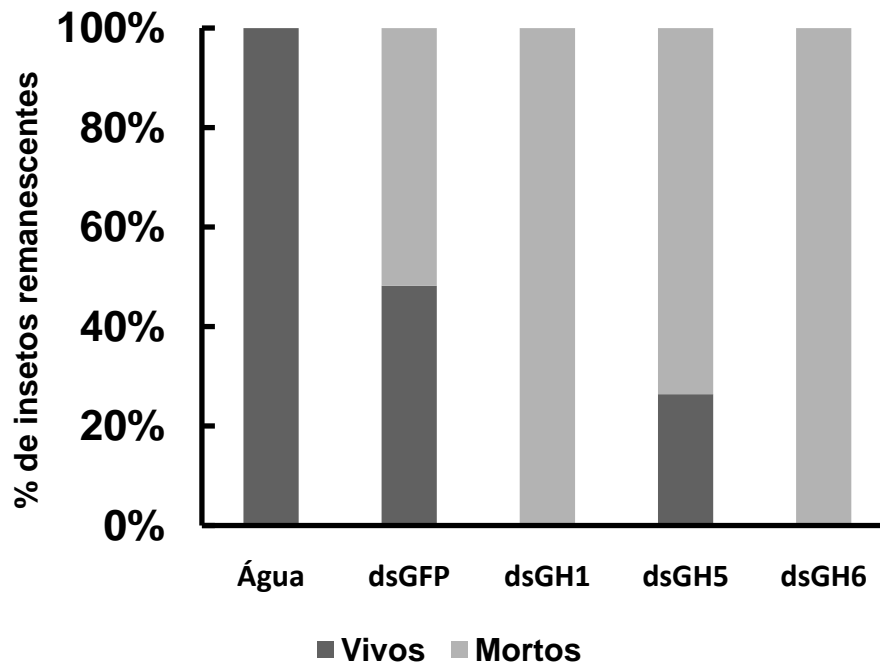


Figura 5.22. Mortalidade e sobrevivência de larvas de *Ae. aegypti* tratadas com dsRNA sob condições de alta densidade e restrição alimentar. GH1/GH4/GH5/GH6 (genes alvo) e GFP/H₂O (genes controle).

Para nos certificarmos de que o efeito “*knockdown*” do silenciamento dos genes GH1, GH4, GH5 e GH6 estava ocorrendo nas larvas alimentadas com dsRNA, 5 dias depois do tratamento, isolamos o RNA total das larvas inteiras, dos tubos digestivos e restos de corpos separadamente, para analisarmos os níveis de expressão de cada transcrito. Conseguimos observar efeito de silenciamento em larvas inteiras no gene GH4, no tubo digestivo no gene GH5 e no resto do corpo no gene GH6. Aparentemente GH1 não foi silenciado nos tecidos experimentados (Figura 5.23).

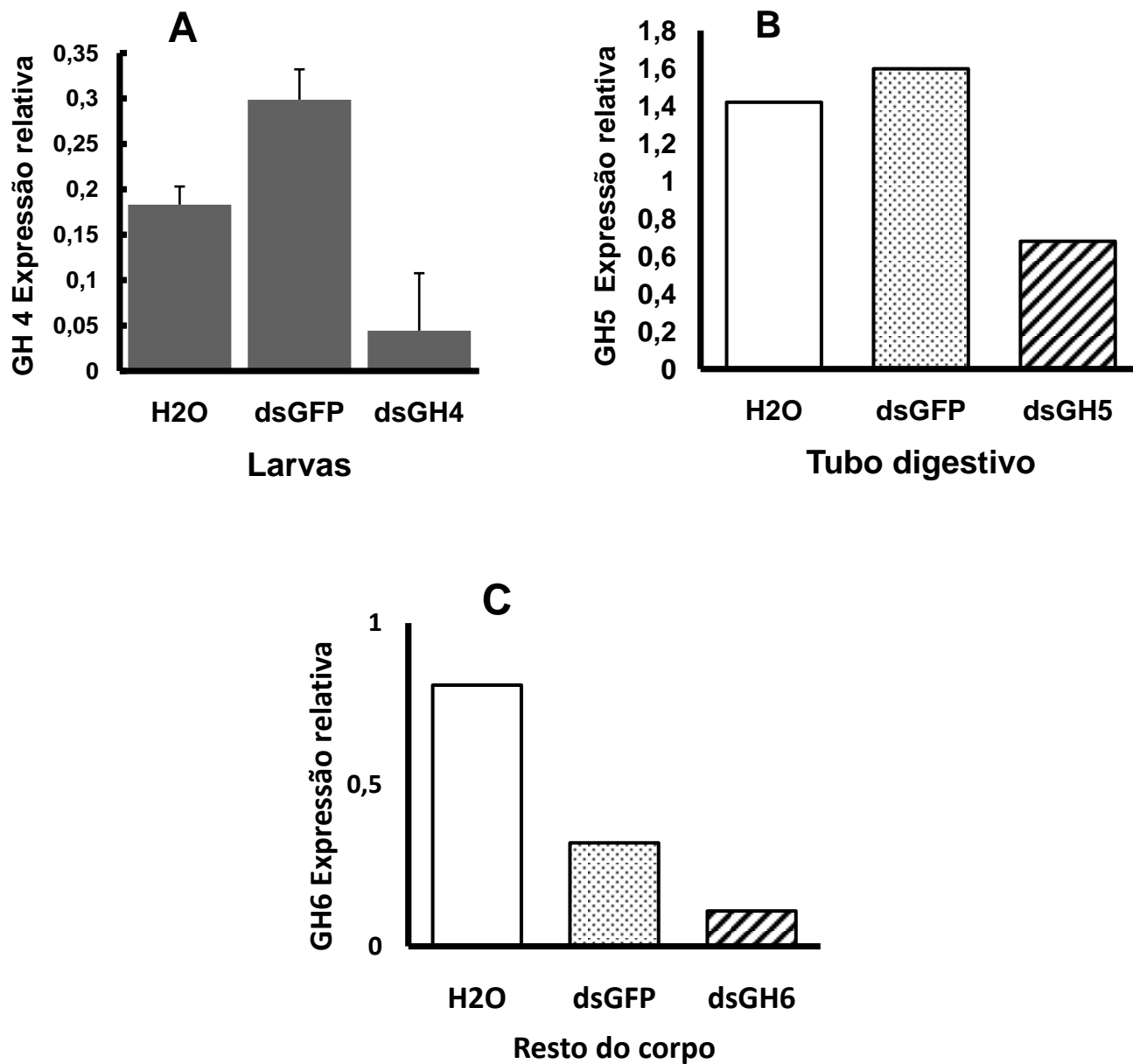


Figura 5.23. Níveis de expressão dos genes GH4, GH5 e GH6 em larvas de *Ae. aegypti* tratadas com dsRNA. (A) Perfil de expressão relativa do gene GH4 em larvas inteiras. (B) Perfil de expressão relativa do gene GH5 no tubo digestivo. (C) Perfil de expressão relativa do gene GH6 no resto do corpo. Em todos os casos, insetos ou tecidos tiveram seu RNA extraído, os cDNA preparados a partir do RNA dos insetos tratados foram utilizados como molde para reações de RT-PCR utilizando pares de primers específicos para cada gene. Como gene constitutivo utilizamos o gene ribossomal RP 49. Utilizamos 24 ciclos para *AeGH16.4* (GH4) e 27 ciclos para *AeGH16.5* (GH5) e *AeGH16.6* (GH6). Os produtos amplificados de PCR foram analisados em um gel de agarose e corados com brometo de etídeo.

5.5.2 Atividades de β -1,3-glucanases em larvas silenciadas

Procurando investigar mais profundamente a importância dos genes que codificam para GHF16 nas larvas de *Ae. aegypti*, decidimos realizar ensaios bioquímicos com amostras de larvas silenciadas para os genes GH5 (AaeGH16.5) e GH6 (AaeGH16.6). Esses foram os genes que apresentaram maior atividade relativa no tubo digestivo (Figura 5.18) e obtiveram um efeito de silenciamento considerável (Figura 5.21). Realizamos ensaios de atividade de β -1,3 glucanases das frações solúveis nos tubos digestivos e resto do corpo em larvas que haviam sido alimentadas com dsRNA para GH5 e GH6. Observamos um decréscimo da atividade glucanásica solúvel no tubo digestivo de larvas silenciadas no gene GH5, com valores de $0,7 \pm 0,1$ μ U/inseto. Em comparação, larvas tratadas com dsRNA para GH 6 apresentaram $1,3 \pm 0,1$ μ U/inseto, larvas tratadas com água $1,5 \pm 0,4$ μ U/inseto e dsRNA para GFP $1,8 \pm 0,5$ μ U/inseto. Os ensaios de atividade dos silenciados para resto do corpo não apresentaram alterações significativas nos níveis de atividade: 10 ± 1 μ U/inseto para água, 9 ± 1 μ U/inseto para dsRNA GFP, 10 ± 1 μ U/inseto para dsRNA GH5 e 12 ± 1 μ U/inseto para GH6 (Figura 5.24).

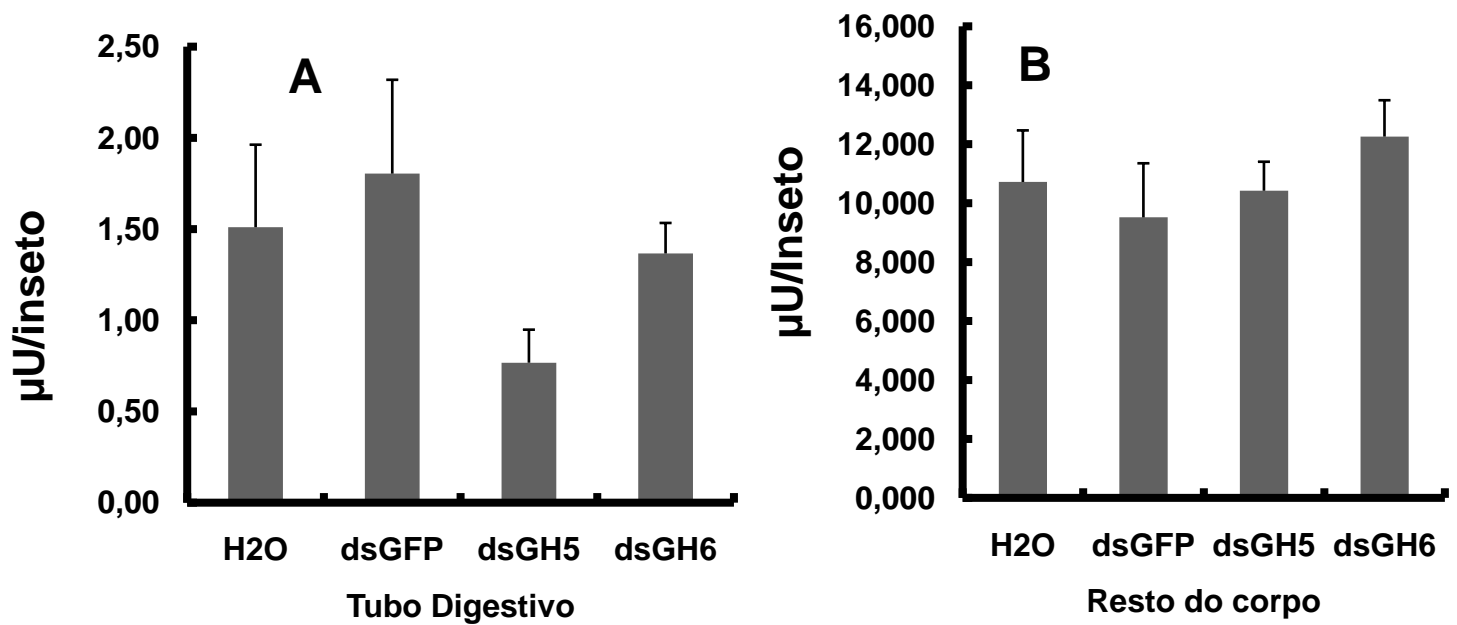


Figura 5.24 Atividade enzimática de β -1,3-glucanase (substrato laminarina) nas frações solúveis do tubo digestivo (A) e resto do corpo (B) de larvas L4 de *Ae. aegypti* alimentadas com H₂O ou dsGFP, dsGH5 e dsGH6.

Outro ensaio bioquímico realizado foram cromatografias de filtração em gel (coluna Superdex 200/AKTA-FPLC) da fração solúvel do intestino dos insetos alimentados com dsRNA, para testar se no perfil de atividade na cromatografia também iria ocorrer algum tipo de alteração. Amostras do tubo digestivo dos insetos alimentados com dsRNA para o gene GH5 apresentaram um pico de atividade no perfil cromatográfico muito menor em comparação aos demais (Figura 5.25).

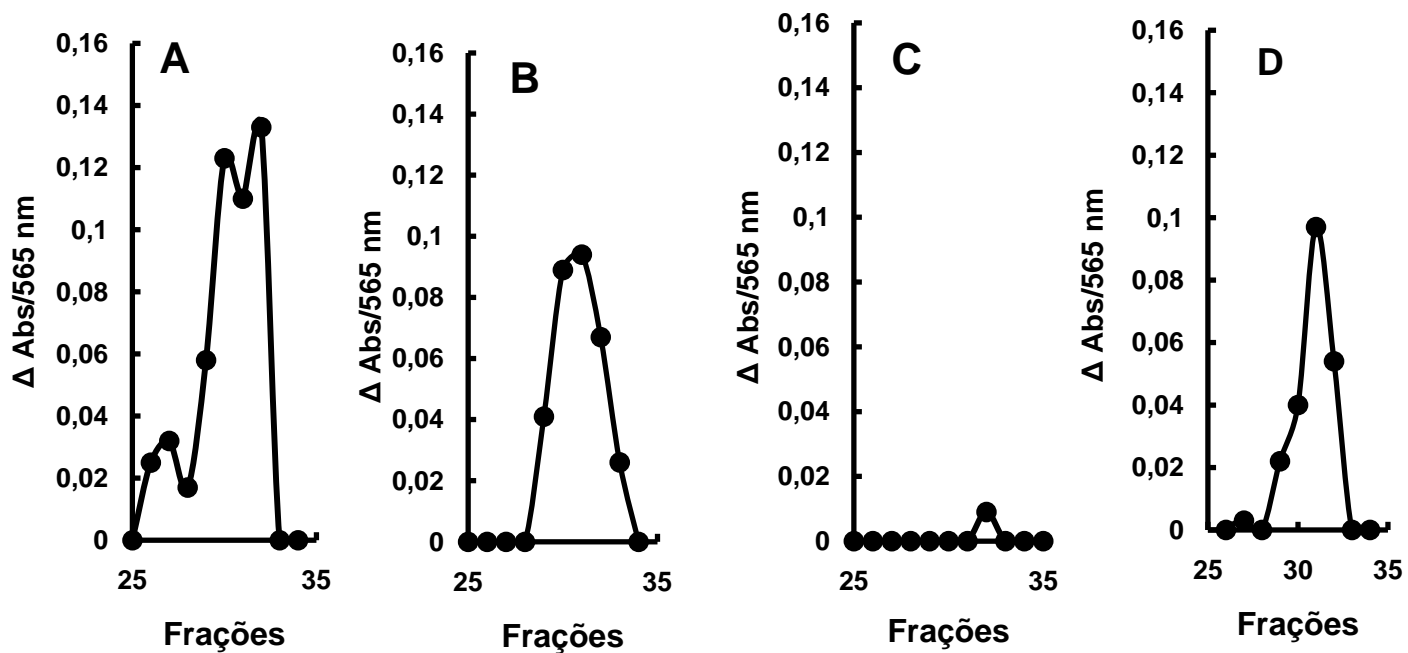


Figura 5.25 Perfis de atividade de β -1,3-glucanase (substrato laminarina) após cromatografia de filtração em gel (coluna Superdex 200/AKTA-FPLC) da fração solúvel do intestino em larvas L4 de *Ae. aegypti* após ingestão de (A) água, (B) dsGFP, (C) dsGH5 e (D) dsGH6. Os dados estão apresentados como a variação de absorvância (Δ Abs) em relação à linha de base do perfil cromatográfico.

6 DISCUSSÃO

6.1 Busca e análise das sequências de proteínas da GHF 16 no genoma de *Ae. aegypti*

β -1,3-glucanases digestivas já foram descritas em várias ordens de insetos (Orthoptera, Diptera, Coleoptera, Trichoptera, Isoptera, Collembola, Dictyoptera). Devido à importância do mosquito como vetor da dengue e sua ampla distribuição geográfica, decidimos investigar a presença dessas enzimas em larvas de *Ae. aegypti*, nos baseando nos hábitos detritívoros desses insetos (Clements 1973; Ameen 1978).

Carboidratos desempenham um importante papel na natureza, estando presentes em glicoproteínas, glicolípídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (David e Nelson 2011). Organismos vivos obtêm uma série de vantagens com o processamento de carboidratos, que podem auxiliar nas funções de reserva, estrutura e na sinalização celular. A hidrólise seletiva de ligações glicosídicas presentes nos carboidratos é fundamental para a obtenção de energia, degradação de compostos, expansão da parede celular e no “*turnover*” de moléculas.

β -1-3-glucanases estão inseridas em diversas famílias de glicosídeo hidrolases (Davies e Henrissat, 1995; Coutinho e Henrissat 1999), incluindo a família GHF16, no qual encontramos as β -1,3-glucanases de insetos (Genta *et al.* 2009; Bragatto *et al.* 2010). A busca no genoma de *Ae. aegypti* revelou seis sequências com características compartilhadas entre os membros da família 16 das glicosídeo hidrolases, como o domínio PFAM-00722 (Bateman *et al.* 2004). Encontramos diversas informações sobre as características principais desses genes (tabela 5.1) e construímos uma ilustração do tamanho de éxons e íntrons (Figura 5.1).

Os membros de cada família compartilham características estruturais apresentando a mesma estrutura tridimensional, a mesma posição anomérica do produto liberado (no caso de GHF 16 com a retenção da configuração beta) e a mesma estratégia de catálise, com os resíduos catalíticos conservados. Cinco das seis sequências de *Ae.aegypti* (AeGH16.1, AeGH16.2,AeGH16.3, AeGH16.5 e AeGH16.6) apresentaram resíduos de glutamato conservados

com a região consenso SGE (I/V)DL(M/L) ES (R/K), atuando como doadores e aceptores de prótons para a atividade enzimática de β -1,3-glucanases (Hahn *et al.* 1995), enquanto tais resíduos estavam ausentes na sequência AeGH16.4 (Figura 5.2). Os resíduos de glutamato no sítio ativo são essenciais para a atividade catalítica de β -1,3-glucanases (Zhang *et al.* 2003), sendo conservados em todas as subfamílias de glucanases, mas não nas proteínas ligantes de β -1, -3-glucanas (β LP) ou proteínas reconhecedoras de β -1,-3-glucanas (β RP).

Sendo assim, acreditamos que *Ae. aegypti* tenha cinco β -1,3-glucanases com regiões catalíticas conservadas e que AeGH16.4 seria uma β LP ou β RP, não possuindo sequência de peptídeo sinal nem de resíduos catalíticos conservados. Essas características sugerem que esta proteína não possui atividade enzimática e que não é secretada para o meio extracelular. Essa divergência funcional entre glucanases e β LP/ β RP é conhecida por estar envolvida na perda da atividade catalítica de β -1,3-glucanase e a adição de uma região N terminal ou um domínio de reconhecimento de carboidratos (Zhang *et al.* 2003; Pauchet *et al.* 2009).

Embora β -1,3-glucanases e β LP/ β RP possam estar associadas a funções distintas na fisiologia dos insetos, a primeira exercendo papel digestivo e a outra na imunidade, todas essas informações se cruzam nas buscas de bancos de dados e anotações confusas fazem com que a análise do papel exercido por essas moléculas seja bastante dificultada. Por serem proteínas homólogas, alguns autores sugerem que β -1,3-glucanases e β LP/ β RP tenham se originado a partir da duplicação de um gene de β -1,3- glucanase ancestral com origem no antecessor dos Hexapoda, e que β LP/ β RP tenham perdido sua atividade catalítica, porém mantido a característica de reconhecimento e de ligação a polissacarídeos como β -1,3-glucanas (Bragatto *et al.* 2010; Hughes 2012).

AeGH16.3 e AeGH16.4 apresentaram pontos isoelétricos (pI) diferentes das demais proteínas GHF16 de *Ae.aegypti*, com valores de 9,8 e 7,6 respectivamente (Tabela 5.1). Essas proteínas parecem ser mais carregadas positivamente (tabela de porcentagem de resíduos de aminoácidos no Anexo 2) do que as outras, ou seja, possuem mais resíduos básicos com um pKa da cadeia lateral mais alto. O pKa de qualquer grupo funcional é significativamente

afetado por seu ambiente químico, um fenômeno às vezes explorado no sítio ativo de enzimas para promover mecanismos de reação adaptados, dependendo de valores de pKa modificados para grupos doadores/aceptores de prótons em resíduos específicos. Existe uma relação importante entre a carga líquida de uma proteína e o pH de uma solução, pois os componentes de cargas de uma proteína dependem do valor de pH. Sendo assim, de acordo com a localização compartimental no inseto e a relação entre pH e carga líquida dessas duas proteínas, os valores diferenciados de pI podem estar relacionados com a atuação em diferentes funções biológicas no inseto, dependentes de suas propriedades ácido-básicas (Belton 2000), como o reconhecimento de β -1,3-glucanas ou adesão á matriz extracelular com o auxílio de gliconjugados.

O conhecimento da sequência de aminoácidos em uma proteína pode oferecer informações sobre sua estrutura tridimensional, função, localização celular e evolução. O estudo da evolução molecular em geral foca-se em famílias de proteínas intimamente relacionadas. Com o intuito de analisar a informação disponível em bancos de dados das sequências gênicas de proteínas que codificam para GHF16, construímos uma árvore filogenética com o algoritmo Neighbor-Joining (Tamura *et al.* 2011) utilizando sequências de insetos de diferentes ordens (Figura 5.3). O objetivo final era criar uma árvore detalhada que descrevesse a relação evolutiva entre β -1,3-glucanases e β LP/ β RP de *Ae. aegypti* com as proteínas da GHF16 de outras espécies de insetos.

Dois grandes clados foram encontrados, um clado monofilético reunindo as sequências com resíduos catalíticos verdadeiros (β -1-3-glucanases) e outro clado parafilético, que não apresentou resíduos catalíticos (β LP). Como muitas das sequências de dípteros nematoceros ficaram agrupadas em sub-ramos monofiléticos das β -1,3-glucanases, nossa hipótese é que tenha ocorrido uma duplicação nas cópias dos genes de β -1,3-glucanases nesse grupo, incluindo sequências de Anofelinos e Culicídeos.

Um gene existente pode ser duplicado, criando assim, um par de genes inicialmente idênticos dentro do genoma. A partir daí esses dois genes podem divergir. Uma vez que um gene tenha sido duplicado, uma das duas cópias gênicas estará livre para sofrer mutações e tornar-se especializada em realizar

funções diferentes dentro de um mesmo organismo (Albert 2010). Todas as espécies de cupins apresentaram duas cópias de genes com resíduos verdadeiros, indicando uma possível seleção positiva para esses genes (Bulmer e Crozier 2006). Utilizando-nos dessa hipótese, sugerimos que possa ter ocorrido uma expansão do gene de β -1,3-glucanases nas cópias de Dipteros nematóceros, já que estão agrupados em um mesmo clado e a maioria possui o mesmo número de cópias dos genes.

6.2 Atividade e caracterização de β -1,3-glucanases em larvas de *Ae. aegypti*

Buscando resultados que confirmassem bioquimicamente a presença de β -1,3-glucanases em larvas de *Ae. aegypti*, realizamos ensaios dessa atividade enzimática, algo que ainda não tinha sido observado em culicídeos. Nesse contexto, ensaios foram feitos para testar a presença de enzimas capazes de clivar um polímero de glicose utilizado como reserva para algas pardas, conhecido como laminarina. As β -1,3-glucanases que reconhecem e clivam esse substrato também podem ser conhecidas como laminarinases, pertencendo ao EC 3.2.1.39 (Terra e Ferreira 2005).

Devido às pequenas dimensões do modelo estudado, a cabeça e o tubo digestivo foram retirados integralmente, enquanto denominamos resto do corpo respectivamente ao conjunto formado por carcaça, corpo gorduroso, hemolinfa, traquéias e outros componentes do inseto que estejam inseridos nesse material. Todos os tecidos avaliados apresentaram atividade enzimática de β -1,3-glucanases (Figura 5.4). O resto do corpo foi o tecido que apresentou maior atividade total por inseto, enquanto cabeça apresentou a maior atividade específica. A atividade específica normalmente possui maior significado biológico, porque leva em consideração a quantidade de proteínas presentes naquele tecido. Contudo, um compartimento com uma quantidade menor de proteína pode ter um valor de atividade específica aumentado, enquanto, inversamente uma menor atividade específica pode ser o resultado de um compartimento com mais proteínas, e isso não significa necessariamente uma pequena atividade enzimática naquele tecido. A quantidade de proteínas nos

diferentes compartimentos da larva varia muito, afetando assim a relação entre as atividades específicas encontradas.

Para nos certificarmos de que a atividade presente no tubo digestivo da larva não era proveniente em parte ou totalmente da dieta, decidimos avaliar alíquotas da ração oferecida às larvas durante o seu desenvolvimento. Os resultados obtidos sugerem que as atividades encontradas no tubo digestivo não são originadas da dieta. Apesar de alguns micro-organismos serem capazes de secretar β -1,3-glucanases, como fungos e bactérias (Tiunova *et al.* 1983; Klebl e Tanner 1989; De La Cruz, Pintor-Toro *et al.* 1995; Gueguen, Voorhorst *et al.* 1997; Planas 2000) e de que em alguns modelos, como o *Lutzomya longipalpis*, apresentam alta atividade de β -1,3-glucanase na dieta (Moraes *et al.* 2012), não foi possível detectar uma atividade considerável nos ensaios da ração de gato oferecida às larvas.

Seria de se esperar que o tecido com a maior atividade enzimática fosse o tubo digestivo, levando-se em consideração a dieta das larvas, amplamente diversificada, com todo tipo de matéria orgânica particulada e micro-organismos, inclusive fungos, que possuem β -1,3-glucana em sua parede (Manners *et al.* 1973). Como o resto do corpo foi o tecido que apresentou a maior atividade total, é possível que essa atividade, exerça algum papel como componente do sistema imune humoral, apresentando funções de catálise ainda não descritas para *Ae. aegypti*. Essa hipótese é interessante, pois, no resto do corpo, como foi dito anteriormente, encontram-se todos os tecidos adjacentes da larva e importantes para o sistema imune do inseto, incluindo corpo gorduroso e hemócitos, que são responsáveis por secretar as proteínas ligantes que circulam na hemolinfa (Ochiai and Ashida 2000; Fabrick *et al.* 2003; Zhang, Cho *et al.* 2003).

É importante destacar que a localização de enzimas no tubo digestivo não significa necessariamente uma função digestiva. São encontradas outras funções, como a de defesa imunológica. Um bom exemplo seria a amidase-PGRB-LB em *Drosophila*, (Zaidman-Rémy *et al.* 2006). O trabalho em questão destaca o papel fundamental das proteínas reconhecedoras de peptídeo glicanos (PGRPs) que codificam dois sensores de peptidoglicano, modulando o nível da resposta imune do hospedeiro à presença de micro-organismos infecciosos, como bactérias Gram negativas no tubo digestivo.

Em *Nasutitermes corniger* (Isoptera) foi demonstrado que β -1,3-glucanases possuem um papel efetivo na imunidade, estando localizadas em diferentes tecidos do inseto (tubo digestivo, glândulas salivares, corpo gorduroso e secreções). β -1,3-glucanases atuam como receptores de reconhecimento padrão e também como proteínas efetoras antimicrobianas. O trabalho se baseia na capacidade da proteína, designada *tGNBP-2*, de funcionar como um sensor que cliva e libera parte de componentes patogênicos atuando diretamente na defesa antimicrobiana (Bulmer, *et al.* 2009).

Pauchet *et al.* (2009) identificaram uma β -1,3-glucanase de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera), com aproximadamente 40 kDa, que possui sequência similar às que foram previamente descritas para β LP presentes na hemolinfa de outras Lepidopteras. Essa proteína é secretada dentro do lúmen intestinal das larvas, não sendo identificada na hemolinfa. Experimentos com transcritos indicaram que o RNAm é constitutiva e predominantemente expresso no intestino médio das larvas, sendo induzido somente por uma dieta rica em bactérias Gram negativas. O grupo sugere que essas enzimas possam pertencer a uma recente família de enzimas, da qual β LP são derivadas, continuando a funcionar como enzimas catalíticas na digestão e/ou na defesa contra organismos invasores.

Outras glicosídeos hidrolases também são capazes de exercer um papel dual, ou seja, tanto na digestão quanto na imunidade em insetos. Uma β -glicosidase da família GHF1, proveniente do tubo digestivo de *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), denominada RfBGluc-1, foi capaz de digerir celulose e defender o inseto contra patógenos, demonstrando atividade contra componentes de paredes celulares exógenas (Scharf *et al.* 2010). Um fato que prejudica o esclarecimento do papel de fatores imunes das GHF16 com atividade catalítica seria o pouco detalhamento da origem dessas enzimas na literatura e o fato de que β LP sejam muito similares β -1,3- glucanases, gerando assim, uma série de classificações equivocadas confundindo-se enzimas que atuam na imunidade com atividade catalítica com β LP (Genta *et al.* 2004; Pauchet *et al.* 2009).

Obtendo dados da atividade de β -1,3-glucanases, começamos a pesquisar alguns parâmetros bioquímicos dessas enzimas nas larvas. Os

valores da faixa de atividade ótima em relação ao pH nos diferentes tecidos de larvas de *Ae. aegypti* (Figura 5.5) são similares aos obtidos em outros insetos como os de *Periplaneta americana* pHo=6, *Tenebrio molitor* pHo=6, *Abracris Flavolineata* pHo=6 (Genta *et al.*; 2003, 2007 e 2009) e *Lutzomia longipalpis* pHo=6-8, (Vale *et al.* 2012). Apesar das faixas de atividade máxima das enzimas nos diferentes tecidos serem próximas, os gráficos sugerem a presença de diferentes β -1,3-glucanases em cada um dos tecidos das larvas.

As massas moleculares de β -1,3-glucanases nos diferentes tecidos apresentaram tamanhos distintos (Figura 5.6). O tubo digestivo apresentou uma enzima com massa molecular diferente da observada para a cabeça e o resto do corpo, e parecida com a massa molecular de outras β -1,3-glucanases intestinais de insetos (Genta 2003, 2007; Bragatto, 2010). Para uma investigação mais refinada, essas amostras serão submetidas à análise proteômica. A identificação das sequências de aminoácidos poderá esclarecer a origem das atividades correspondentes de cada tecido e também a possível presença de outros complexos protéicos que estejam interagindo com as β -1,3-glucanases em questão.

Em se tratando de uma enzima ainda não purificada nas larvas de *Ae. aegypti*, os extratos brutos dos tecidos testados nos experimentos bioquímicos podem gerar questionamentos sobre a possível detecção de outras glicosidases na mistura dos ensaios. Podemos citar as β -glicosidases, que são importantes enzimas para o metabolismo dos insetos e para interação inseto-planta. Estão envolvidas, assim como as β -1,3-glucanases, na hidrólise de vários carboidratos e também foram caracterizadas em muitos insetos (Ferreira *et al.* 2001; Azevedo *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 2003). Entretanto, apesar de algumas β -glicosidases possuírem uma atividade considerável sobre laminarina, é possível diferenciar as duas enzimas através de seus diferentes perfis cromatográficos (Genta *et al.* 2009). Nesse caso, seria importante ensaiar as frações da cromatografia de filtração em gel com um substrato específico para β -glicosidases, como p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo.

6.3 Alimentação, digestão e indução de β -1,3-glucoanases nas larvas de *Ae. aegypti* alimentadas com leveduras

Em termos gerais, a nutrição diz respeito à natureza e ao processamento de alimentos necessários para prover as necessidades para o crescimento e o desenvolvimento, envolvendo o comportamento alimentar e a digestão. Os insetos com frequência apresentam dietas pouco usais ou restritivas (Cranston, 2012).

Larvas de mosquitos ocorrem em uma enorme variedade de habitats aquáticos, e normalmente a fonte nutricional encontrada nesses locais é composta de micro-organismos, associados à matéria orgânica particulada ou detrito e biofilme. A maioria dos detritos originados de plantas presentes no ambiente aquático é colonizada e degradada por fungos e bactérias e parcialmente digerido pela fauna aquática (Crawford, *et al.* 1982; Sieburth 1983; Münster, Heikkinen *et al.* 1997).

Durante o curso do desenvolvimento larval de um mosquito, habitats aquáticos podem variar seu conteúdo nutricional e a densidade larval exerce seus efeitos no desempenho dos adultos, na reserva de nutrientes, produção de ovos e longevidade de fêmeas adultas (Juliano e Stoffregen 1994; Barrera 1996; Juliano 1998; Daughterty *et al.* 2000; Brasks *et al.* 2004; Alto *et al.* 2005, 2008 a; Murrell e Juliano 2008; Reiskind e Lounibos 2009).

Obter uma boa fonte nutricional e digeri-la adequadamente podem afetar o desenvolvimento larval de diversas maneiras. Araujo, *et al.* 2012, demonstraram que a quantidade de alimento afeta o tempo de desenvolvimento, traços biológicos da sobrevivência de adultos e pode influenciar na capacidade vetorial de *Anopheles darlingi* em condições laboratoriais. Sob condições semi-naturais, competições densidade-dependentes e alterações na disponibilidade de nutrientes podem atuar negativamente no desempenho e na fisiologia do mosquito *Culex pipiens*, de forma a comprometer sua expectativa de vida. Condições ambientais que promovam privação de nutrientes podem estar associadas ao risco de transmissão de patógenos e ter consequências para a longevidade (Alto *et al.* 2012).

Estudos sobre ecologia de mosquitos, principalmente na fase larval podem promover enormes subsídios para o desenvolvimento de estratégias para o controle de vetores. A digestão de leveduras e de micro-organismos nas larvas aquáticas e a possibilidade de essa fonte nutricional afetar a indução de enzimas digestivas nesses insetos não foi bem elucidada até o momento. Para compreender melhor a influência desse tipo de alimento para a larva, testamos uma alimentação a partir do estágio L3, contendo somente leveduras autoclavadas, usando espécies de *S. cerevisiae* e *Ustilago* sp. A levedura do gênero *Ustilago* ocorre em locais com matéria vegetal e no próprio solo. Esse gênero é considerado um patógeno das sementes e flores de cereais, trigo, milho, e ervas (Perkins 1949; Holliday 1974; Antonio *et al.* 2010). Dados das massas das larvas no estágio L4 indicaram um valor estatisticamente maior para os insetos alimentados com *Ustilago* sp (Figura 5.7).

Os experimentos de alimentação com células de *Ustilago* sp vivas nos permitiu investigar se larvas de *Ae.aegypti* seriam capazes de se manterem desde a eclosão dos ovos até a fase adulta, somente com essa dieta. Essa espécie de fungo, até então, tinha suas propriedades nutricionais desconhecidas para larvas de *Ae. aegypti*, mas aparentemente demonstrou ser um tipo de alimento adequado para a manutenção e desenvolvimento das larvas.

O desenvolvimento das larvas parece ser normal ao se alimentarem com leveduras *Ustilago* sp vivas, apresentando um aumento significativo no peso das larvas (Figura 5.8). Com relação ao surgimento de pupas, larvas alimentadas com células vivas de *Ustilago* sp apresentaram um atraso considerável em sua taxa de pupação quando comparadas aos insetos controle, contudo quando avaliamos a emergência de adultos, observamos que o grupo alimentado com as leveduras parece emergir um pouco antes do que os insetos adultos alimentados com ração de gato (Figura 5.9). Não ocorreram mudanças significativas quando comparamos as taxas de mortalidade de ambas as dietas (Figura 5.10). Isso sugere que as larvas conseguem sobreviver em uma mono-dieta rica em células vivas de *Ustilago* sp e também

são capazes de se nutrir delas, realizando a digestão, retardando a pupação e se desenvolvendo de até a fase adulta.

A propriedade lítica de β -1,3-glucanases provenientes de insetos já foi descrita anteriormente (Genta *et al.* 2003, 2009; Genta, Dumont *et al.* 2007). Essa capacidade sugere um papel de defesa contra fungos, também podendo permitir a obtenção de nutrientes a partir dessas células. Insetos detritívoros vivem em ambientes que apresentam uma grande diversidade de matéria orgânica em decomposição, com inúmeras espécies de fungos e outros micro-organismos decompositores. Após a incubação de laminarinase na presença de células vivas de *S. cerevisiae*, a viabilidade das células de levedura decresce no decorrer do tempo (Genta 2004). Aparentemente, o homogenato de tubo digestivo das larvas de *Ae. aegypti* promove a lise das células de *Ustilago* sp, isso acontecendo em menos de 4 horas de incubação (Figura 5.11). Como o extrato não se encontra purificado, é possível que outras enzimas também estejam envolvidas na lise dessas células, através de sinergismo (Jongedijk *et al.*, 1995).

Nesse trabalho, decidimos utilizar larvas alimentadas com células vivas de *Ustilago* sp para realizar ensaios bioquímicos e verificar se ocorre alguma indução da atividade enzimática nos diferentes tecidos estudados.

Não foi observado um aumento significativo das atividades de β -1,3-glucanases nos tecidos de larvas alimentadas com células vivas ou autoclavadas de *Ustilago* sp (Figura 5.12). Todas as frações solúveis dos tecidos foram ensaiadas e também todas as frações insolúveis, inclusive as do resto do corpo (Figura 5.13). Tanto as frações solúveis, quanto as insolúveis e até mesmo a soma total dessas atividades não apontaram uma mudança significativa no nível de atividade de β -1,3-glucanases. Os resultados não apresentaram indícios de modulação da expressão influenciada por nenhuma das duas dietas com leveduras. Interessantemente, cabeça foi o único tecido que apresentou um decréscimo da atividade de β -1,3-glucanases, quando as larvas foram alimentadas com leveduras autoclavadas.

No coleóptero *T. molitor*, a atividade laminarinásica foi testada sob diferentes dietas contendo bactérias e fungos, mas também não foram encontradas diferenças entre as amostras, mesmo esse inseto tendo alta atividade lítica contra fungos (Genta 2004).

A respeito da atividade reduzida que foi detectada na cabeça quando alimentamos com *Ustilago* sp autoclavado, estamos associando-a as glândulas salivares, importantes estruturas presentes na cabeça dos insetos. Diversos tipos de células secretoras podem ocorrer nas glândulas salivares. As secreções dessas células são transportadas ao longo de dutos circulares e despejadas na cavidade pré-oral. As secreções salivares diluem o alimento ingerido e ajustam o pH e o conteúdo iônico (Chapman 1998). Alguns autores acreditam que as glândulas salivares não somente podem atuar na digestão dos insetos, como também podem exercer papéis significativos na imunidade. Diferentes genes de lisozimas foram encontrados em glândulas salivares e no tubo digestivo de *D. melanogaster*, ambos estando envolvidos na defesa antibacteriana quando o intestino é desafiado com bactérias. Com injeções de bactérias na hemocele, o nível desses transcritos desaparece (Kylsten *et al.* 1992). Em *N.corniger* β -1,3-glucanases encontradas nas glândulas salivares também foram incriminadas como componentes imunes (Bulmer *et al.* 2009). Nossa hipótese, é que as atividades detectadas na cabeça de larvas de *Ae. aegypti* também desempenhem um papel significativo na imunidade do inseto já que a atividade enzimática praticamente desaparece após a alimentação com leveduras autoclavadas.

Acreditamos que β -1,3-glucanases de larvas de *Ae. aegypti* exerçam um papel expressivo tanto na digestão da parede de fungos como também na imunidade.

6.4 Expressão de genes da GHF 16 e padrão de expressão tecidual em larvas de *Ae. aegypti*

O padrão da expressão gênica foi analisado em larvas inteiras de *Ae. aegypti* e nos seguintes tecidos separadamente: cabeça, tubo digestivo e resto do corpo. Amplificamos fragmentos do DNA genômico das larvas inteiras e encontramos o tamanho de bases esperado (Figura 5.14). Além disso, todos os seis genes são expressos nas larvas e nos diferentes tecidos (Figura 5.15).

A expressão relativa desses genes foi quantificada através de RT-PCR. Dos seis genes estudados, três parecem ser mais expressos em larvas

inteiras: AaeGH16. 4, AeGH16.5 e AaeGH16.6. Enquanto os tecidos cabeça e resto do corpo aparentemente expressam mais os mesmos dois genes AeGH16. 1 e AaeGH16.4, o tubo digestivo parece expressar mais AaeGH16.5 e AeGH16.6, e os genes AaeGH16.2 e AeGH16.3 parecem ser pouco expressos nas larvas de *Ae.aegypti*. Destacamos essa interessante semelhança no padrão de expressão dos mesmos genes para cabeça e resto do corpo (AeGH16. 1 e AaeGH16. 4). Esses tecidos podem estar também envolvidos na resposta imune das larvas e esses dados de expressão corroboram com os dados bioquímicos obtidos para as atividades de β -1,3-glucanases (Figuras 5.4, 5.12 e 5.13).

Não existem atualmente muitos trabalhos detalhados sobre o padrão de expressão gênica de GHF16 em larvas de *Ae. aegypti*. Um resumo da expressão geral dos seis genes, a maioria em pupas e adultos, foi encontrado no banco de dados Vector Base (<https://www.vectorbase.org/>). O único resultado encontrado, porém de um trabalho ainda não publicado, que discute a expressão em larvas foi o de Harker *et al.* (2007). Os autores investigaram a capacidade de desenvolvimento das larvas e observaram uma significativa queda na regulação da expressão em adultos em relação a pupas e larvas.

6.5 RNAi em larvas de *Ae.aegypti*

Desde sua descoberta no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.* 1998), a técnica de RNAi vem sendo utilizada como uma importante ferramenta em várias ordens de insetos, incluindo Diptera (Lum *et al.* 2003; Dietzl *et al.* 2007), Lepidoptera (Chen *et al.* 2008; Yu *et al.* 2008; Tian *et al.* 2009; Terenius *et al.* 2011), Coleoptera (Arakane *et al.* 2004; Suzuki *et al.* 2008), Isoptera (Zhou *et al.* 2008), Orthoptera (Meyering-Vos e Muller 2007) e Hymenoptera (Schluns e Crozier 2007). Os estudos baseados em RNAi vêm aprimorando o conhecimento de funções gênicas e devido a sua especificidade, a técnica de RNAi também oferece um grande potencial para estratégias de controle de pestes (Baum *et al.* 2007; Price e Gatehouse 2008; Huvenne e Smagghe 2010; Singh *et al.* 2013).

Singh, *et al.* (2013), obtiveram um conjunto de dados extremamente interessantes, utilizando a técnica de “soaking” em larvas de *Ae.aegypti*. Foram silenciados quatro genes, e o silenciamento de dois desses genes (β -tubulina e quitina-sintase I) resultou na redução do crescimento das larvas e/ou em altas taxas de mortalidade. Os autores sugerem a utilização de dsRNA como um potencial larvicida, diante da importância do vetor em questão. Esses autores, também utilizaram o modelo *D. melanogaster* para reforçar sua hipótese de utilização do RNAi como ferramenta de controle. Larvas de *Drosophila* foram mergulhadas em solução contendo dsRNA específico para seus próprios genes de β -tubulina e para o genes de β -tubulina de *Ae.aegypti*. Só foram observadas mortalidades significativas em larvas de moscas tratadas em solução contendo dsRNA para o seu próprio gene alvo, sugerindo que pesticidas à base de dsRNA podem ser espécie-específicos.

A relativa facilidade da operação e os resultados obtidos pelo grupo de Singh com larvas de *Ae.aegypti*, influenciaram para que decidíssemos aplicar a técnica na pesquisa com a GHF 16 nesse inseto. Sabemos que larvas de *Ae.aegypti* possuem genes que codificam para GHF 16, que possuem atividade para β -1,3-glucanases e que conseguem sobreviver em uma dieta exclusiva de leveduras. Acreditamos na importância fisiológica desses genes para o inseto e por isso iniciamos um novo bloco de experimentos, dessa vez utilizando essa sofisticada técnica de biologia molecular para promover o silenciamento desses genes e entender a sua possível função no inseto.

Para estudar as funções dos genes da GHF16 em larvas de *Ae. aegypti*, selecionamos quatro dos seis genes encontrados no genoma para tentarmos o silenciamento. Com base nas expressões relativas de cada gene, optamos por testar AaeGH16.1, AaeGH16.4, AaeGH16.5 e AaeGH16.6. O silenciamento do gene AaeGH16.5 foi o que apresentou uma maior taxa de mortalidade, seguido pelos genes AaeGH16.6, AaeGH16.1 e AaeGH16.4 respectivamente. De maneira similar, o gene AaeGH16.5 foi o que apresentou a menor taxa de pupação, seguido por AaeGH16.6. Aparentemente, essa mortalidade na fase larval e o tamanho menor das larvas alimentadas com dsRNA para o gene alvo AaeGH16.5 estejam implicados em uma função digestiva, já que o desenvolvimento das larvas é claramente prejudicado.

Para tentarmos compreender melhor um possível fenótipo ocasionado pelo silenciamento desses genes, mantivemos as larvas em condições de estresse ao longo de cinco dias. As larvas foram mantidas em recipientes menores com uma população mais densa e não foram alimentadas durante dois dias. Telang, Qayum *et al.* (2012) já haviam demonstrado que o estresse nutricional em larvas de mosquitos leva a emergência de adultos com deficiência imune. Entre as várias defesas do inseto, a linha que recobre o epitélio do tubo digestivo é a primeira barreira a ser vencida por patógenos. Uma vez que os insetos tenham sido desafiados, os hemócitos circulantes disparam as vias *Toll* e *Imd* produzindo sinais para o recrutamento de peptídeos antimicrobianos como parte da defesa imune humoral. Os autores mantiveram as larvas mal nutridas e posteriormente analisaram o tamanho do epitélio do tubo digestivo de fêmeas adultas, a população de hemócitos circulantes e a expressão de genes imunes por qPCR. Tendo essas três linhas de defesa quantificadas em resposta ao estresse nutricional larval, os autores demonstraram que, sob condições de rearranjo do ambiente as funções imunes das fêmeas de *Ae. aegypti* são alteradas.

Observamos que larvas silenciadas e mantidas sob estresse com uma alta densidade populacional e poucos nutrientes apresentaram uma mortalidade de 100% para os genes AeGH16.1 e AeGH16.6. O gene AaeGH16.5 também apresentou uma alta taxa de mortalidade, mas não a totalidade do número de larvas. É possível que os genes AeGH16.1 e AeGH16.6 exerçam uma função imune nas larvas e que as condições adversas em que as larvas permaneceram ao decorrer de cinco dias tenham desafiado esse sistema culminando na morte massiva das mesmas. Conseguimos obter resultados de silenciamento, ao nível de transcritos, em larvas inteiras no gene AeGH16.4 e no tubo digestivo e resto do corpo nos genes AaeGH16.5 e AaeGH16.6 respectivamente. Apesar de ambos os genes serem mais expressos no tubo digestivo, AeGH16.6 foi silenciado no resto do corpo, o que sugere que esse gene pode não estar sendo expresso preferencialmente no tubo digestivo, mas em algum outro tecido adjacente como hemócitos ou corpo gorduroso, por exemplo. Diversas limitações não permitem que somente por essa técnica seja possível discriminar em quais tecidos específicos esses genes são mais expressos, podemos apenas sugerir uma localização geral.

Para que os genes e suas respectivas proteínas sejam associados a seus locais de expressão, seria preciso que obtivéssemos uma expressão heteróloga da proteína recombinante, seguida por uma imunocitocalização com anticorpos específicos. Não foi possível verificar o silenciamento efetivo do gene AeGH16.1. Um dos fatores geralmente limitantes para a técnica de RNAi é justamente o processo de internalização do dsRNA pelas células do organismo. Sendo assim, pode-se fazer uma distinção entre o RNAi intracelular e o RNAi extracelular. Para se introduzir o dsRNA dentro das células, muitos pesquisadores se utilizam de técnicas como a eletroporação, a transfecção ou injeções dentro de células ou em tecidos embrionários. O primeiro experimento de sucesso em relação aos experimentos de RNAi em insetos *in vivo* foi com uma microinjeção de dsRNA em células embrionárias de *Drosophila* (Kennerdell e Carthew 1998). Técnicas como “soaking”, alimentação ou injeção de dsRNA dentro da hemocele do inseto requerem que as moléculas de dsRNA sejam internalizadas pelas células, o que pode ou não ocorrer.

Nesse trabalho, acreditamos que o efeito de silenciamento devido à ingestão de dsRNA é capaz de se propagar do tubo digestivo para outros tecidos do corpo, o que já foi visto em outros estudos (Zangh *et al.* 2010; Singh *et al.* 2013). Entretanto, os mecanismos de transporte de dsRNA célula a célula ou de um tecido para o outro para induzir o efeito de RNAi sistêmico ainda não foram bem elucidados (Voinnet 2005, Whangbo e Hunter 2008, Huvenne e Smaghe 2010). Em *C. elegans* a internalização ocorre através de uma proteína transmembranar conhecida como SID-1, capaz de transportar dsRNA da superfície para o interior da célula, sendo essencial para que o silenciamento intracelular ocorra (Winston *et al.* 2002; Feinberg e Hunter 2003; Jose e Hunter 2007). Homólogos de SID-1 foram identificados em quase todos os genomas de eucariotos, mas curiosamente essa proteína está ausente nos genomas de insetos da ordem Diptera (Gordon e Waterhouse 2007; Tomoyasu *et al.* 2008; Huvenne e Smaghe 2010). Apesar de SID-1 estar ausente em dípteros, células S2 de *D. melanogaster*, parecem ser capazes de internalizar dsRNA. Dois receptores, SR-C1 e EATER, normalmente envolvidos na fagocitose bacteriana, parecem ser capazes de endocitar dsRNA (Ulvila *et al.* 2006). Os autores acreditam que os receptores possuam a capacidade de reconhecer múltiplos ligantes na superfície celular, conseguindo assim

reconhecer dsRNA. Saber se as mesmas proteínas estão associadas ao reconhecimento de dsRNA pelas células do tubo digestivo pode ser interessante, assim como indentificar se diferentes espécies de Dipteros compartilham esses mecanismos. Em outras espécies, uma variedade de componentes foram envolvidos nas vias de receptores mediando a endocitose, o que pode desempenharum importante papel na internalização de dsRNA em Dipteros (Saleh *et al.* 2006).

O nosso trabalho demonstrou que nenhuma transfecção foi necessária para que o silenciamento ocorresse nas células do tubo digetivo. Foi verificado o efeito de silenciamento no tubo digestivo de larvas que ingeriram dsRNA para o gene AeGH16.5 e o efeito de RNAi sistêmico no resto do corpo em larvas silenciadas para o gene AeGH16.6, apenas utilizando o método de “soaking” em solução contendo dsRNA.

No conjunto de dados que obtivemos, todos os genes de GHF16 testados apresentaram fenótipo moderado em situações normais e fenótipo grave sob condições estressantes. Contudo, não foi possível verificar um silenciamento, no nível de transcritos, no gene AeGH16.1, sugerindo que especificamente para esse gene não conseguimos obter efeito de RNAi intracelular. Em insetos, a maioria dos experimentos de silenciamento utilizando a técnica de “soaking” foram realizados em linhagens de células. Essa técnica parece apresentar um silenciamento menos potente do que as microinjeções diretamente na hemocele, devido a barreiras como a cutícula dos insetos e por isso parece ser muito mais aplicável e eficaz em culturas de células. Sendo assim, pode ser que o silenciamento observado para os genes de GHF16 em larvas de *Ae.aegypti* não tenham alcançado todo o potencial esperado. Ainda assim, destacamos que é possível utilizar a técnica de “soaking” em insetos inteiros de forma eficiente. Outro exemplo de bastante sucesso, além do de Singh *et al.* (2012) foi o de autores que utilizaram jatos de “*spray*” contendo dsRNA para realizar “soaking” em *Ostrinia furnacalis* recém eclodidas, resultando em uma considerável mortalidade, por volta de 40% durante o tratamento e 100% após o tratamento ter sido realizado, tendo o grupo verificado o silenciamento por qPCR (Wang *et al.* 2011).

Ensaio bioquímicos das atividades de β -1,3-glucanases também foram realizados em tecidos de larvas de *Ae.aegypti* silenciadas. Foram avaliados

tubo digestivo e resto do corpo nas larvas silenciadas para os genes AeGH16.5 e AeGH16.6. Nos ensaios de tubo digestivo do gene AeGH16.5 as atividades de β -1,3-glucanases sofreram uma queda considerável, porém, não ocorreram alterações nas atividades encontradas no resto do corpo. Quando utilizamos os mesmos tecidos para analisar o perfil cromatográfico dessas atividades em uma filtração em gel, o perfil de diminuição da atividade de β -1,3-glucanases se manteve no tubo digestivo para AeGH16.5, apresentando um pico muito menor de atividade quando comparado ao gene AeGH16.6 e aos grupos controles com GFP e água.

Esses dados sugerem que AeGH16.5 seja de fato uma β -1,3-glucanase digestiva e AeGH16.6 seja uma enzima envolvida na resposta imune. Contudo, para que essa hipótese seja provada novos experimentos precisam ser realizados, principalmente utilizando desafios com patógenos reconhecidos e mais ensaios bioquímicos.

7. CONCLUSÕES

- O genoma de *Ae. aegypti* possui seis genes que codificam para proteínas da GHF 16.
- A árvore consenso se divide em dois clados: grupos que possuem resíduos catalíticos e grupos que não possuem resíduos catalíticos. Aparentemente ocorreu uma duplicação nos genes de β -1,3-glucanases no ancestral da subordem dos Dipteros nematoceros em Anophelinae e Culicinae.
- Larvas L4 de *Ae. aegypti*, possuem atividades de β -1,3- glucanases em seus diferentes tecidos (cabeça, tubo digestivo e resto do corpo), sendo o resto do corpo o tecido que apresentou maior atividade enzimática por inseto (μ U/inseto) e cabeça o tecido que apresentou maior atividade específica (μ U/mg).
- O efeito de pH na atividade β -1,3-glucanásica assim como as medidas de massa molecular pode sugerir a presença de diferentes enzimas.
- Larvas de *Ae. aegypti*, são capazes de se nutrirem e desenvolverem em uma dieta composta exclusivamente por leveduras *Ustilago* sp.
- As atividades de β -1,3-glucanases não são induzidas por uma dieta composta de *Ustilago* sp,
- Enzimas do intestino de larvas de *Ae. aegypti* parecem ser capazes de clivar as paredes de *Ustilago* sp após 4 horas de incubação,
- Todos os genes GHF16 encontrados no genoma de *Ae. aegypti* foram expressos nos tecidos das larvas L4 com diferentes níveis de expressão.
- Larvas de *Ae. aegypti* apresentaram alteração moderada quando silenciadas para os genes AeGH16. 1, AeGH16.5 e AeGH16.6 em condições de tratamento normais e um fenótipo grave sob condições de estresse populacional e nutricional para os genes AeGH16.1 e AeGH16.6,
- Aparentemente, AeGH16. 5 é uma β -1,3-glucanase digestiva e AeGH16.6 parece estar relacionada com a imunidade do inseto.

8 REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter, P. Biologia molecular da célula; Molecular Cell Biology. Artmed.2008.

Alexander RD, Sherman, PW. Local mate competition and parental investment in social insects. *Science*, 1977; 196 (4289): 494-500.

Alto BW, Lounibos, LP, Higgs S, Juliano, SA. Larval competition differentially affects arbovirus infection in *Aedes* mosquitoes. *Ecology*. 2005; 86 (12): 3279-3288.

Alto BW, Muturi EJ, Lampman RL. Effects of nutrition and density in *Culex pipiens*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2012; 26(4): 396-406.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215(3): 403-410.

Ameen MU, Iversen, TM. Food of *Aedes* larvae (Diptera, Culicidae) in a temporary forest pool. *Archiv für Hydrobiologie*. 1978; 83: 552-564.

Antonio CJ, Lucila, OC, Miriam TS, José RH. Functional analysis of the pHresponsive pathway Pal/Rim in the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*. 2010; 47(5): 446-457.

Arakane Y, Hogenkamp D G, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, Beeman RW, *et al.* Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle *Tribolium castaneum* and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2004; 34 (3):291-304.

Araújo MS, Luiz Herman S. Gil. Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darlingi* under laboratory conditions. *Malaria journal*. 2012; 11(1): 261.

Aspinall G.O. (Ed.) *The Polysaccharides*. New York: Academic Press. 1982 ; 1-2: 340 e 503.

Azevedo TR, WR Terra, *et al.* Purification and characterization of three β -glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 33(1): 81-92.

Bacic A, Harris P.J, Stone B.A. Structure and function of plant cell walls. In: Stumpf, PK, Conn EE (Eds), *The Biochemistry of Plants* Academic Press. New York 1998; p.297-371.

Barbehenn RV. Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Archives of insect biochemistry and physiology*.2001; 47(2): 86-99.

Barbosa P, T Peters. Comparative study of egg hatching techniques for *Aedes aegypti* (L.). Mosquito News, 1969.

Barrera R. Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes. Ecological Entomology. 1996; 21(2):117-127.

Barrera R, Amador M, Clark G. Ecological factors influencing *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) productivity in artificial containers in Salinas, Puerto Rico. Journal of medical entomology. 2006; 43(3): 484-492.

Barret AJ, Kirshke H. Methods Enzymol.1981; 80: 535–561.

Barrett A, Kembhavi A, Brown M, Kirschke H, Knight C, Tamai M, Hanada K. L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. Journal of Biochemistry, 1982; 201 (1): 189–98. PMID 7044372

Bartnicki-Garcia S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Annual Review of Microbiology. 1968; 22:87-108.

Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S *et al.* The Pfam protein families database. Nucleic acids Research. 2004; 32(suppl 1): D138-D141.

Belton PS. Nuclear magnetic resonance studies of the hydration of proteins and DNA. Cellular and Molecular Life. 2000; Sci.57: 993-998.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72(1): 248-254.

Braga IM, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epidemiologia e serviços de saúde. 2007; 16(2): 113-118.

Braga IM, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde. Brasília. 2007; 16(4): 279-293

Braga IM e Valle, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 2007; 16(4): 295-302.

Bragatto I, Genta FA, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C. Characterization of a beta-1,3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to beta-glucan-binding proteins. Insect Biochemistry and Molecular Biology.2010; 40(12): 861-872.

Braks, MAH, Honório NA, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano SA. Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. Annals of the Entomological Society of America. 2004; 97(1): 130-139.

Brendtsen JD, Nielsen H, Heijine G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: Signal IP 3.0. *Journal of Molecular Biology*. 2004; 340: 783-795.

Bulmer MS, RH Crozier. Variation in positive selection in termite GNBP's and Relish. *Molecular Biology and Evolution*. 2006; 23(2): 317-326.

Bulmer MS, Bachelet I, Raman R, Rosengaus RB, Sasisekharan R. Targeting an antimicrobial effector function in insect immunity as a pest control strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 2009; 106(31): 12652-12657.

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Roberts J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*. 2007;25 (11): 1322-1326.

Centro de Controle e Prevenção de Doenças – CDC [online]. USA, 2012. [capturado em 17 de dezembro de 2013] Disponível em: <http://www.cdc.gov/dengue.html>.

Chapman RF. *The insects: structure and function*, Cambridge university press, 1998.

Chen X, Tian H, Zou L, Tang B, Hu J, Zhang W. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bulletin of Entomological Research*. 2008; 98(6): 613.

Christophers S. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, Bionomics and Structure. Rickard.1960.

Clemens JC, Worby CA, Simonson-Leff N, Muda M, Maehama T, Hemmings BA. *et al.* Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97(12): 6499-6503.

Clements AN. *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction*, CABI, Wallington, Oxfordshire, United Kingdom, 1:74-118.

Coelho GE, Burattini MN, Teixeira MDG, Coutinho FAB, Massad E. Dynamics of the 2006/2007 dengue outbreak in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008; 103(6): 535-539.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994.

Coutinho PM, Henrissat B, Gilberth HJ, Davies G, Svensson B. Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering. *Royal Society of chemistry: Cambridge*. 1999;3-12. Disponível em <http://www.cazy.org>

Craig B, F Nijhout. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes. *Entomologia. Experimentalis Et Applicata*. 1971; 14: 399-412.

Crawford RL, Johnson L, Martinson M. Bacterial enrichments in surface films of freshwater lakes. *Journal of Great Lakes Research*. 1982; 8(2): 323-325.

Dajoz R. Insects and the forest: role and diversity of insects in the forest environment. *Technique et Documentation Lavoisier*. 1998.

Daugherty MP, Alto BW, Juliano SA. Invertebrate carcasses as a resource for competing *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*. 2000; 37(3), 364.

Davies G, Henrissat B. Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases. *Structure*. 1995; 3:853-859.

De La Cruz J, Pintor-Toro JA, Benitez T, Llobell A, Romero LC. A novel endo-beta-1, 3-glucanase, BGN13. 1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*. 1995; 177(23): 6937-6945.

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. 2007; 448 (7150): 151-156.

Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews in Entomology*. 2004; 49(1): 71-92.

Dillon RJ, El Kordy, Lanee RP. The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1996; 90: 669-73.

Donalisio MR. O dengue no espaço habitado. Hucitec, 1999.

Douglas AE. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*. 2009; 23(1), 38-47.

Dyrløv Bendtsen J, Nielsen H, Von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*. 2004; 340(4): 783-795.

Fabrick JA, Baker JE, Kanost MR. cDNA cloning, purification, properties, and function of a beta-1,3-glucan recognition protein from a pyralid moth, *Plodia interpunctella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 33(6): 579-594.

Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2009; 104(1): 124-126.

Feinberg EH, Hunter CP. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*. 2003; 301(5639):1545-1547.

Ferreira AH, Marana SR, Terra WR, Ferreira C. Purification, molecular cloning, and properties of a beta-glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2001; 31(11): 1065-1076.

Ferreira AH, Terra WR, Ferreira C. Characterization of a beta-glycosidase highly active on disaccharides and of a beta-galactosidase from *Tenebrio molitor* midgut lumen. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 33(2): 253-265.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA., Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*.1998; 391 (6669):806-811.

Fisk FW, Shambaugh GF. Protease activity in adult *Aedes aegypti* mosquitoes as related to feeding, 1952.

Forattini OP. Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia. 1996; 2 Edusp.

Franco O. História da febre amarela no Brasil. Departamento Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro. 1969.

Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Brasília: Funasa; 2002.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*. 2003; 31(13): 3784-3788.

Genta FA, Dillon RJ, Terra WR, Ferreira C. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*.2006; 52: 593–601.

Genta FA, Dumont AF, Marana SR, Terra WR, Ferreira C. The interplay of processivity, substrate inhibition and a secondary substrate binding site of an insect exo-beta-1,3-glucanase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2007; 1774(9): 1079-1091.

Genta FA, Bragatto I, Terra WR, Ferreira C. Purification, characterization and sequencing of the major beta-1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009; 39(12): 861-874.

Genta FA, Terra WR, Ferreira C. Action pattern, specificity, lytic activities, and physiological role of five digestive beta-glucanases isolated from *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 33(11): 1085-1097.

Genta FA. Purificação e caracterização de Beta-1,3-glucanases de insetos. São Paulo: IQ-USP, 2004:232.

Gentile C, Lima JBP, Peixoto AA. Isolation of a fragment homologous to the *rp49* constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100(6): 545-547.

Geering K, Freyvogel TA. Lipase activity and stimulation mechanism of esterases in the midgut of female *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 1975; 21(6): 1251-1256.

Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*. 1997; 42(1): 611-643.

Gordon KH, Waterhouse PM. RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology*. 2007; 25(11):1231-1232.

Gorin PA, Spencer JF. Structural chemistry of fungal polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry e Biochemistry*. 1968; 23:367-417.

Gorman M J, Kankanala P, Kanost MR. Bacterial challenge stimulates innate immune responses in extra-embryonic tissues of tobacco hornworm eggs. *Insect Molecular Biology*. 2004; 13:19-24.

Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary entomology*. 2005; 18 (3): 215-227.

Grimald D, Engel MS. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, 2005.

Grimont PAD, Grimont F, Lysenko O. Species and biotype identification of *Serratia* strains associated with insects. *Current Microbiology*. 1979; 2: 139-42.

GT James. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethyldulfonyl fluoride in buffers. *Analytical Biochemistry*. 1978; 86 (2): 574. Doi: 10.1016/0003-2697(78)90784-4. PMID 26289.

Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging infectious diseases*. 1995; 1(2): 55.

Gueguen Y, Voorhorst WG, van der Oost J, de Vos WM. Molecular and Biochemical Characterization of an Endo- β -1,3-glucanase of the Hyperthermophilic *Archaeon Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(50): 31258-31264.

Gullan PJ, Cranston PS, McInnes KH, Hoenen SMM. Os insetos: um resumo de entomologia. *Roca*. 2007; 66-72.

Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Russo ES, Peixoto AMD, Bacci M, Berbert-Molina, MA, Lemos FJA. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007; 102: 919–924.

Hahn M, Olsen O, Politz O, Borriss R, Heinemann U. Crystal structure and site-directed mutagenesis of *Bacillus macerans* endo-1,3-1,4-beta-glucanase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270(7): 3081-3088.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*. 1999.

Hakim RS, Baldwin K, Smagghe G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual review of entomology*.2010; 55: 593-608.

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual review of entomology*.2009; 54: 285-302.

Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G. Conserved machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1995; 92: 7090-7094.

Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarity. *Journal of Biochemistry*.1991; 280:309-316.

Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Journal of Biochemistry*.1993; 293: 781-788.

Higgins DG. CLUSTAL V: Multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods Molecular Biology*.1994; 25: 307-318.

Holliday R. *Ustilago maydis*. *Bacteria, Bacteriophages, and Fungi*, Springer: 1974; 575-595.

Huber K, Luu Le L, Tran Huu H, Tran Khan T, Rodhain F, Failloux AB. *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L., 1762) (Diptera: Culicidae) le principal vecteur des virus de la dengue au Vietnam: écologie, structure génétique, compétence vectorielle et résistance aux insecticides. *Annales Société Entomologique France*. 2000; 36(2):109-120.

Hughes AL. Evolution of the betaGRP/GNBP/beta-1,3-glucanase family of insects. *Immunogenetics*. 2012; 64(7): 549-558.

Huvenne H, Smagghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of insect physiology*.2010; 56(3): 227-235.

IUBM: Enzyme Nomenclature. Recommendations. San Diego: Academic Press, 1992.

Jacobs, M. Dengue: emergence as a global public health problem and prospects for control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000; 94(1): 7-8.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002;20:197-216.

Jiang H, Ma C, Lu ZQ, Kanost MR. Beta- 1,3 glucan recognition protein-2 (betaGRP-2) from *Manduca sexta*; an acute-phase protein that binds beta-1,3 glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2004; 34:89-100.

Jongedijk E, Tigelaar H, Van Roekel JS, Bres-Vloemans SA., Dekker I, Van den Elzen, PJ. *et al.* Synergistic activity of chitinases and β -1, 3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*. 1995; 85. (1-3): 173-180.

Jose AM, Hunter CP. Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual Review of Genetics*. 2007; 41, 305-330.

Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*. 2005; 5: 153-64.

Juliano SA, Stoffregen TL. Effects of habitat drying on size at and time to metamorphosis in the tree hole mosquito *Aedes triseriatus*. *Ecology*. 1994; 97(3), 369-376.

Juliano, S.A. Species introduction and replacement among mosquitoes: interspecific resource competition or apparent competition? *Ecology*. 1998; 79(1): 255-268.

Jupp PG, Kemp A. What is the potential for future outbreaks of chikungunya, dengue and yellow fever in southern Africa? *South African medical journal= Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*. 1996; 86(1): 35-37.

Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* Act in the Wingless Pathway. *Cell*. 1998; 95 (7):1017-1026.

Kirk MP, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. *Dictionary of the Fungi*. 10th edition. Wallingford: CABI, 2008; 718. ISBN 0-85199-826-7.

Klebl F, Tanner W. Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1, 3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*. 1989; 171(11): 6259-6264.

Klowden MJ, Klowden MJ. *Physiological systems in insects*. Access Online via Elsevier, 2010.

Kohler LJ, Carton Y, Mastore M, Nappi AJ. Parasite suppression of the oxidations of eumelanin precursors in *Drosophila melanogaster*. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 2007; 66(2): 64-75.

Krainer E, Stark RE, Naider F, Alagramam K, Becker JM. Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning ¹³C-NMR. *Biopolymers*. 1994; 34(12):1627-35.

Kumagai Y, Ojima T. Enzymatic properties and the primary structure of a beta-1,3-glucanase from the digestive fluid of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*. 2009 Sep; 154(1):113-20. Epub 2009 May 14.

Kumagai Y, Ojima T. Isolation and characterization of two types of beta-1,3-glucanases from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*. 2010 Feb; 155(2):138-44.

Kuno G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *Journal of Medical Entomology*. 2010; 47(6): 957-971.

Kylsten P, Kimbrell D, Daffre S, Samakovlis C, Hultmark D. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Molecular and General Genetics*. 1992; MGG 232(3): 335-343.

Laird M. *The natural history of larval mosquito habitats*. Academic Press Ltd. 1988

Lamberty M, Zachary D, Lanot R, Bordereau C, Robert A, Hoffmann JA, Bulet P. Insect immunity constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(6): 4085-4092.

Lavine MD, Strand M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2002; 32(10):1295-1309.

Lee SY, Wang R, Söderhäll K. A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *Journal of Biochemistry*. 2000; 275:1337-43

Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*. 1997; 42(1): 525-550.

Lemaitre B, Hoffmann, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*. 2007; 25:697-743.

Lima EP, Paiva MHS, Araújo AP, Silva EVG, Silva UM, Oliveira LN. *et al.* Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites and Vectors*. 2011.

Lima JBP, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AKR, Soares SD. *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003; 68: 329–333.

Loke SR, Andy-Tan WA, Benjamin S, Lee HL, Sofian-Azirun M. Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. *Tropical Biomedicine*. 2010; 27(3): 493–503.

Lounibos LP. Invasion by insect vectors of human diseases. *Annual Review of Entomology*. 2002; 47: 233-266.

Lourenço-de-Oliveira R, Coura JR. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. Coura JR, In: Koogan G, ed. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias Rio de Janeiro*. 2005; 75-97.

Löwy I. Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil. *História, Ciências, Saúde Manguinhos*. 1999; 5(3):647-677

Lucena SA, Lima LS, Cordeiro Jr, LS, Sant'Anna C, Constantino R, Azambuja P, Genta FA. High throughput screening of hydrolytic enzymes from termites using a natural substrate derived from sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels*. 2001; 4(1), 1-9.

Lum L, Yao S, Mozer B, Rovescalli A, Von Kessler D, Nirenberg M, Beachy PA. Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science*. 2003; 299 (5615): 2039-2045.

Ma C, Kanost MR. A beta1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(11):7505-7514.

Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98(5): 703-708.

Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current Biology*. 2001; 11 (3): 171-176.

Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC. The structure of a beta-(1-> 3) glucan from yeast cell walls. *Biochemistry Journal*. 1993; 135: 19-30.

Marciniszyn J, Hartsuck JA, Tang J .Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. The Journal of Biological Chemistry. 1976; 251 (22): 7088–94. PMID 993206

Marinotti O, James AA. An α -glucosidase in the salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. Insect biochemistry.1990; 20(6): 619-623.

Ministério da saúde (Brasil), Departamento de Análise de Situação de Saúde. Brasília: 2013. 34 p

Merrit RW, Dadd RH, Walker ED. Feeding behaviour, natural food and nutritional relationships of larval mosquitoes. Annual Review of Entomology. 1992; 37: 349–376.

Meyering-Vos M, Müller A. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Journal of insect physiology. 2007; 53(8): 840-848.

Moczek AP. Phenotypic plasticity and diversity in insects.Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2010; 365(1540): 593-603.

Monath TP. Yellow fever: An update. Lancet Infectious Diseases. 2001;1:11-20.

Moraes CS. Caracterização Molecular e Bioquímica de Carboidrases Digestivas em Larvas de *Lutzomyia longipalpis*. [Tese]. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, outubro de 2012.

Moraes CS, Lucena SA, Moreira BH, Brazil RP, Gontijo NF, Genta FA .Relationship between digestive enzymes and food habit of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) larvae: Characterization of carbohydrases and digestion of microorganisms. Journal of Insect Physiology. 2012; 58(8): 1136-1145.

Münster U, Heikkinen E,Knulst J. Nutrient composition, microbial biomass and activity at the air–water interface of small boreal forest lakes.Hydrobiologia. 1997; 363(1-3): 261-270.

Nappi AJ, Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2005; 35(5), 443-459.

Nathan MB, Dayal-Drager R. Recent epidemiological trends, the global strategy and public health advances in dengue. WHO, Scientific Working Group – Report on Dengue. Geneva, Switzerland: WHO, 2007; 30-34.

Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Artmed. 2011.

Nelson MJ. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Organización Panamericana de la Salud, Washington: WHO,1986.

Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 2007; 316:1718-1723.

Nielsen. *Nature*. 1993; 199:1001

Nobre A, Antezana D, Tauil PL. Febre amarela e dengue no Brasil: epidemiologia e controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1994; 27(Supl III): 59-66.

Norkrans B. Surface microlayers in aquatic environments. *Advanced Microbial Ecology Research and Analysis*. 1980; 4:51-85.

Novak, R., Shroyer DA. Eggs of *Aedes triseriatus* and *Aedes hendersoni*: a method to stimulate optimal hatch. *Mosquito News*. 1978; 38,515-521.

Ochiai M, Ashida M. Purification of a beta-1, 3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*. 1988; 263(24):12056-12062.

Ochiai M, Ashida M. A pattern-recognition protein for beta-1,3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of beta-1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(7): 4995-5002.

Outbreaks RC. Chikungunya: no longer a third world disease, 2007.

Pauchet Y, Freitak D, Heidel-Fischer HM, Heckel DG, Vogel H. Immunity or digestion: glucanase activity in a glucan-binding protein family from Lepidoptera. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284(4): 2214-2224.

Perkins DD. Biochemical mutants in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Genetics*. 1949; 34(5): 607.

Pialoux G, Gaüzère BA., Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet infectious diseases*. 2007; 7(5): 319-327.

Planas A. Bacterial 1,3-1,4-beta-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2000; 1543(2): 361-382.

Price DR, Gatehouse JA. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*. 2008; 26 (7): 393-400.

Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black IV WC. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA*. 2010; net, 1(1).

Redinbaugh MG, Turley RB. Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Analytical Biochemistry*. 1986; 153(2): 267-271.

Rejmánková E, Harbin-Ireland A, Lege M. Bacterial abundance in larval habitats of four species of *Anopheles* (Diptera:Culicidae) in Belize, Central America. *Journal of Vector Ecology*. 2000; 25: 229–238.

Reiskind MH, Lounibos LP. Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2009; 23(1): 62-68.

Ribeiro AF, Ferreira C, Terra WR, Mellinger J. Morphological basis of insect digestion. In *Animal nutrition and transport processes*. 1. Nutrition in wild and domestic animals. 1990; 96-105. S. Karger AG.

Rigáu-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndan AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet*. 1998; 352: 971-977.

Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K. Yellow Fever. A decade of reemergence. *Journal of the American Medical Association*. 1996; 276:1157-1162.

Roriz-Cruz M, Sprinz E, Rosset I, Goldani L, Teixeira MG. Dengue and primary care: a tale of two cities. *Bulletin of the World Health Organization*. 2010; 88(4): 244-244A

Rosenberg DM, Danks HV, Lehmkuhl DM. Importance of insects in environmental impact assessment. *Environmental Management*. 1986; 10(6): 773-783.

Roux MM, Pain A, Klimpel KR, Dhar AK. The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spotvirus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*. 2002; Jul; 76(14):7140-9.

Royet J. Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. *Molecular Immunology*. 2004; 41(11): 1063-1075.

Saleh MC, Van Rij RP, Hekele A, Gillis A, Foley E, O'Farrell PH, Andino R. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature cell biology*. 2006; 8(8): 793-802.

San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH. *et al.* The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010; 82(1): 128.

Scharf ME, Kovaleva ES, Jadhao S, Campbell JH, Buchman GW, Boucias DG. Functional and translational analyses of a beta-glucosidase gene (glycosyl hydrolase family 1) isolated from the gut of the lower termite *Reticulitermes flavipes*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2010; 40(8): 611-620.

Schluns H, Crozier RH. Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Molecular Biology*. 2007; 16 (6):753-759.

Schomburg D, Salzman M, Stephan D. (Eds). Enzyme handbook. Springer.1997.

Scott TW, Takken W. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Cell Press*. 2012; 28(3): 114-121.

Seabra-Junio, ES, Matos ES, Condello HS, Mesquita RD. FAT (Functional Analysis Tool). 2010.

Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 2001; 47(2): 119-125.

Sheffield JB. Image J, a useful tool for biological image processing and analysis. *Microscopy and Microanalysis*.2007; 13:200-201.

Sieburth JM. Microbiological and organic-chemical processes in the surface and mixed layers. *Air-Sea Exchange of Gases and Particles*, Springer: 1983; 121-172.

Singh AD, Wong S, Calen PR, Steven W. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: Implications for pest mosquito. *Journal of Insect Science*. 2013; 13 (69). doi: 10.1673/031.013.6901.

Soper, Fred L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. *The American journal of tropical medicine and hygiene*.1965; 14 (6): 887-891.

Souza-Neto JÁ, Gusmão DS, Lemos FJA. Chitinolytic activities in the gut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and their role in digestion of chitin-rich structures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 2003, 136: 717–724.

Strand MR. The insect cellular immune response. *Insect Science*.2008; 15(1): 1-14.

Strode GK. Yellow Fever. *Yellow fever*.1951.

Sudeep AB, Parashar D. Chikungunya: an overview. *Journal of Biosciences*.2008; 33(4), 443-449.

Sun Z, Wu W, Zhang G. Structure and expression of β -1,3-glucan recognition proteins from the ghost moth, *Thitarodes pui* (Hepialidae), and their response to *Beauveria bassiana* infection. *Journal of Insect Physiology*. 2011; 57(12): 1660-1669.

Suzuki Y, Truman JW, Riddiford LM. The role of Broad in the development of *Tribolium castaneum*: implications for the evolution of the holometabolous insect pupa. *Development*.2008; 135 (3): 569-577.

Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*.1998; 282(5388): 430-431.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011; 28(10): 2731-2739.

Telang A, Qayum AA, Parker A, Sacchetta BR, Byrnes GR. Larval nutritional stress affects vector immune traits in adult yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*). *Medical and Veterinary Entomology*. 2012, 26(3): 271-281.

Tellam R., Wijffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1999; 29(2): 87-101.

Terra WR, Ferreira C, Jordao BP, Dillon RJ. Digestive enzymes. In *Biology of the Insect Midgut*. 1996; 153-194. Springer Netherlands.

Terra WR. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 2001; 47(2):47-61.

Terra WR. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas/Sociedade Brasileira de Biofísica...* [et al.]. 1988; 21(4):675.

Terra WR. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*. 1990; 35(1): 181-200.

Terra WR, Ferreira C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 1994;109(1): 1-62

Terra WR, Ferreira C. Biochemistry of digestion. *Comprehensive molecular insect science*. 2005; 4: 171-224.

Terriere LC. Induction of detoxication enzymes in insects. *Annual Review of Entomology*. 1984; 29: 71-88.

Tian H, Peng H, Yao Q, Chen H, Xie Q, Tang B, Zhang W. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One*. 2009;4 (7): 6225.

Tiunova NA, Kobzeva N, Zaikina IV, Eliakova LA, Nazarova N. [1,3-beta-Glucanases of actinomycetes]. *Mikrobiologia*. 1983; 52(4): 586-590.

Tomoyasu Y, Miller SC., Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*. 2008; 9(1): R10.

Ulvila J, Parikka M, Kleino A, Sormunen R, Ezekowitz RA, Kocks C, Rämetsä M. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281.20: 14370-14375.

Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*. 1970;23 (5): 259–62. Doi: 10.7164/antibiotics. 23.259. PMID 4912600.

Vale VF, Moreira BH, Moraes CS, Pereira MH, Genta FA, Gontijo NF. Carbohydrate digestion in *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera - Psychodidae). *Journal of Insect Physiology*. 2012; 58(10): 1314-1324.

Von Dungern P, Briegel H. Protein catabolism in mosquitoes: ureotely and uricotely in larval and imaginal *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 2001; 47: 131–141.

Voinnet, Olivier. Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS letters*. 2005; 579(26):5858-5871.

Walker ED, Olds EJ, Merritt RW. Gut content analysis of mosquito larvae (Diptera: Culicidae) using DAPI stain and epifluorescence microscopy. *Journal of Medical Entomology*. 1988; 25(6): 551-554.

Wang X, Fuchs JF, Infanger LC, Rocheleau TA, Hillyer JF, Chen CC, Christensen BM. Mosquito innate immunity: involvement of beta 1,3-glucan recognition protein in melanotic encapsulation immune responses in *Armigeres subalbatus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2005; 139(1): 65-73.

Wang Y, Sumathipala N, Rayaprolu S, Jiang H. Recognition of microbial molecular patterns and stimulation of prophenoloxidase activation by a Beta-1,3-glucanase-related protein in *Manduca sexta* larval plasma. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2011; 41(5): 322-331.

Wang Y1, Zhang H, Li H, Miao X. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PloS one*. 2011; 6 (4): 18644.

Weaver SC, Reisen WK present and future arboviral threats. *Antiviral Research*. 2010; 85: 328-345

Wessels J, Siestma J. Fungal cell walls: a survey. In: Tanner W, Loewus F. (Eds.) *Encyclopedia of Plant Plant Physiology. New Series, Plant Carbohydrates II*. Berlin: Springer-Verlag. 2010; 13B: 352-394.

Westaway EG, Briton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JL, Russell PK, Trent DW. Flaviviridae. *Intervirology*. 1985; 24:183-192.

Whangbo, Jennifer S, Hunter, Craig P. Environmental RNA interference. *Trends in Genetic*. 2008; 24(6): 297-305.

Wheeler QD. Insect diversity and cladistic constraints. *Annals of the Entomological Society of America*. 1990;83(6), 1031-1047.

Whyard S, Singh AD, Wong S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;39(11): 824-832.

Winfree R, Aguilar R, Vázquez DP, LeBuhn G, Aizen MA. A meta-analysis of bees responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*. 2009; 90(8): 2068-2076.

Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*. 2002; 295(5564): 2456-2459.

WHO—World Health Organization [online]. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet No. 117. <http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs117/2009>.

Yu N1, Christiaens O, Liu J, Niu J, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smaghe G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science*. 2013 Feb; 20(1):4-14. Doi: 10.1111/j.1744-7917.2012.01534.x. Epub 2012 Jul 5.

Zaidman-Rémy A, Hervé M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, Ueda R, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B. The *Drosophila* Amidase PGRP-LB Modulates the Immune Response to Bacterial Infection. *Immunity*. 2006; 24(4): 463-473.

Zhang R, Cho HY, Kim HS, Ma YG, Osaki T, Kawabata S, Söderhäll K, Lee BL. Characterization and properties of a 1, 3-beta-D-glucan pattern recognition protein of *Tenebrio molitor* larvae that is specifically degraded by serine protease during prophenoloxidase activation. *Journal of Biology and Chemistry*. 2003; 278(43): 42072-42079.

Zhang X. Characterization of chitin synthase and chitinase gene families from the African malaria mosquito. 2010

Zhao P, Li J, Wang Y, Jiang H. Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2007; 37(9): 952-959.

Zhou X, Wheeler MM, Oi FM, Scharf ME. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2008; 38(8): 805-815.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1- Tabela com os códigos utilizados na árvore consenso. Os codigos foram obtidos do GenBank ou do Vector Base (em itálico).

Organismo	Código	Organismo	Código
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	XM_0019477 95	<i>Anopheleschristyi</i>	ACHR004102
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	XM_0019444 38	<i>Anopheleschristyi</i>	ACHR005689
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP002798	<i>Anopheleschristyi</i>	ACHR008721
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP002799	<i>Anopheleschristyi</i>	ACHR001881
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP002796	<i>Anopheleschristyi</i>	ACHR009179
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP004456	<i>Anophelesdarlingi</i>	ADAR007290
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP006761	<i>Anophelesdarlingi</i>	ADAR007286
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP012409	<i>Anophelesdarlingi</i>	ADAR006526
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP004455	<i>Anophelesdarlingi</i>	ADAR009199
<i>Armigeres subalbatus</i>	AAT99011	<i>Anophelesdirus</i>	ADIR003516
<i>Drepanotermes rubriceps</i>	AAZ08491	<i>Anophelesdirus</i>	ADIR010616
<i>Drepanotermes rubriceps</i>	AAZ08504	<i>Anophelesdirus</i>	ADIR003518
<i>Drosophila melanogaster</i>	AF228472	<i>Anophelesdirus</i>	ADIR003625
<i>Drosophila melanogaster</i>	AF228474	<i>Anophelesdirus</i>	ADIR000553
<i>Drosophila melanogaster</i>	AF228473	<i>Anophelesepiroticus</i>	AEPI009258
<i>Glossina morsitans</i>	ABC25063	<i>Anophelesepiroticus</i>	AEPI010194
<i>Tribolium castenaum</i>	LOC660764	<i>Anophelesepiroticus</i>	AEPI009256
<i>Delias nigrina</i>	ACI32830	<i>Anophelesepiroticus</i>	AEPI005496
<i>Delias nigrina</i>	ACI32829	<i>Anophelesepiroticus</i>	AEPI002293
<i>Euphydryas aurinia</i>	AEV66277	<i>Anophelesfunestus</i>	AFUN006014
<i>Locusta migratoria</i>	AFD54025	<i>Anophelesfunestus</i>	AFUN009437
<i>Locusta migratoria</i>	AFD54026	<i>Anophelesfunestus</i>	AFUN006016
<i>Locusta migratoria</i>	AFD54027	<i>Anophelesfunestus</i>	AFUN002755
<i>Manduca sexta</i>	AAN10151	<i>Anophelesfunestus</i>	AFUN004083
<i>Manduca sexta</i>	ADK39022	<i>Anophelesgambiae</i>	AGAP002798
<i>Manduca sexta</i>	AEV66276	<i>Anophelesgambiae</i>	AGAP002799
<i>Anopheles arabiensis</i>	ACN38171	<i>Anophelesgambiae</i>	AGAP004456
<i>Anopheles arabiensis</i>	CAO83421	<i>Anophelesgambiae</i>	AGAP002796
<i>Anopheles bwambiae</i>	ABU80038	<i>Anophelesgambiae</i>	AGAP004455
<i>Anopheles gambiae</i>	ABU80032	<i>Anophelesgambiae</i>	AGAP006761
<i>Anopheles gambiae</i>	ACN38130	<i>Anophelesgambiae</i>	AGAP012409
<i>Anopheles gambiae</i>	CAO83469	<i>Anophelesminusus</i>	AMIN004837
<i>Anopheles melas</i>	ABU80011	<i>Anophelesminusus</i>	AMIN003902
<i>Anopheles merus</i>	ABU80005	<i>Anophelesminusus</i>	AMIN003903
<i>Anopheles quadriannulatus</i>	ACN38184	<i>Anophelesminusus</i>	AMIN003900
<i>Anthocharis cardamines</i>	ACI32832	<i>Anophelesminusus</i>	AMIN010081

<i>Apis andreniformis</i>	ACT66878	<i>Anopheles minimus</i>	AMIN008919
<i>Apis andreniformis</i>	ACT66880	<i>Anopheles quadri</i>	AQUA008516
<i>Apis cerana</i>	ACT66877	<i>Anopheles quadri</i>	AQUA009400
<i>Apis cerana</i>	ACT66883	<i>Anopheles quadri</i>	AQUA009402
<i>Apis dorsata</i>	ACT66875	<i>Anopheles quadri</i>	AQUA003848
<i>Apis dorsata</i>	ACT66881	<i>Anopheles quadri</i>	AQUA014348
<i>Apis koschevnikovi</i>	ACT66879	<i>Anopheles stephensi</i>	ASTE003966
<i>Apis koschevnikovi</i>	ACT66882	<i>Anopheles stephensi</i>	ASTE009324
<i>Apis mellifera</i>	ACT66876	<i>Anopheles stephensi</i>	ASTE009326
<i>Apis mellifera</i>	ACT66884	<i>Anopheles stephensi</i>	ASTE010371
<i>Armigeres subalbatus</i>	AAT99011	<i>Anopheles stephensi</i>	ASTE004573
<i>Bombyx mori</i>	ACU57045	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ004321
<i>Colias eurytheme</i>	ACI32831	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ003613
<i>Culex quinquefasciatus</i>	AEQ27734	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ003612
<i>Culex quinquefasciatus</i>	AEQ27734	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ004320
<i>Delias nigrina</i>	ACI32829	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ004324
<i>Delias nigrina</i>	ACI32830	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ004323
<i>Diatraea saccharalis</i>	ABR28479	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ004231
<i>Drepanotermes rubriceps</i>	AAZ08504	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ004325
<i>Drepanotermes rubriceps</i>	AAZ08491	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ008997
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF33849	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ004229
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF33850	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ013557
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF33851	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ013556
<i>Drosophila simulans</i>	AAQ64712	<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ005217
<i>Drosophila yakuba</i>	AAQ65045	<i>Glossinamorsitans</i>	GMOY011181
<i>Euphydryas aurinia</i>	AEV66277	<i>Glossinamorsitans</i>	GMOY010453
<i>Galleria mellonella</i>	CAK22401	<i>Glossinamorsitans</i>	GMOY011180
<i>Glossina morsitans</i>	ABC25063	<i>Phlebotomus papatasi</i>	PPATMP000880
<i>Heliconius melpomene</i>	AEV66278	<i>Phlebotomus papatasi</i>	PPATMP002587
<i>Helicoverpa armigera</i>	ABU98621	<i>Phlebotomus papatasi</i>	PPATMP002588
<i>Helicoverpa armigera</i>	ACI32825	<i>Phlebotomus papatasi</i>	PPATMP010440
<i>Helicoverpa armigera</i>	ACI32826	<i>Rhodnius prolixus</i>	RPRC011769
<i>Helicoverpa armigera</i>	ACI32827	<i>Rhodnius prolixus</i>	RPRC003210
<i>Helicoverpa armigera</i>	ACI32828	<i>Spodoptera littoralis</i>	ACH56895
<i>Hepialus pui</i>	ADZ45540	<i>Spodoptera littoralis</i>	ACI32819
<i>Hepialus pui</i>	ADZ45541	<i>Spodoptera frugiperda</i>	ABR28478
<i>Mamestra configurata</i>	AEA76308	<i>Spodoptera litura</i>	AEQ33590
<i>Mamestra configurata</i>	AEA76308	<i>Tenebrio molitor</i>	ACS36221
<i>Manduca sexta</i>	AEV66276	<i>Tenebrio molitor</i>	BAC99308
<i>Manduca sexta</i>	AAF44011	<i>Tenebrio molitor</i>	BAG14263
<i>Manduca sexta</i>	AAN10151	<i>Tumulitermes pastinator</i>	AAZ08503
<i>Manduca sexta</i>	ADK39022	<i>Apis mellifera</i>	XM_001121634
<i>Manica rubida</i>	ACT66840	<i>Apis mellifera</i>	FJ546099
<i>Myrmica brevispinosa</i>	ACT66839	<i>Apis mellifera</i>	FJ546107
<i>Myrmica fracticornis</i>	ACT66838	<i>Armigeres subalbatus</i>	AY603183
<i>Myrmica fracticornis</i>	ACT66838	<i>Bombyx mori</i>	NM_001043375
<i>Myrmica lobicornis</i>	ACT66832	<i>Bombyx mori</i>	NM_001135200

<i>Myrmica rubra</i>	ACT66835	<i>Bombyx mori</i>	NM_001166142
<i>Myrmica ruginodis</i>	ACT66831	<i>Bombyx mori</i>	NM_001043985
<i>Myrmica rugulosa</i>	ACT66837	<i>Bombyx mori</i>	NM_001163714
<i>Myrmica sabuleti</i>	ACT66836	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001845911
<i>Myrmica scabrinodis</i>	ACT66833	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001845228
<i>Myrmica sulcinodis</i>	ACT66834	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001845913
<i>Nasutitermes comatus</i>	AAZ08480	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001845759
<i>Nasutitermes comatus</i>	AAZ08493	<i>Culex quinquefasciatus</i>	JF907421
<i>Nasutitermes corniger</i>	AEK64800	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_002135149
<i>Nasutitermes corniger</i>	AEK64801	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001845915
<i>Nasutitermes dixonii</i>	AAZ08481	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001847484
<i>Nasutitermes dixonii</i>	AAZ08494	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001847484
<i>Nasutitermes exitiosus</i>	AAZ08482	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001845910
<i>Nasutitermes exitiosus</i>	AAZ08495	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001845757
<i>Nasutitermes fumigatus</i>	AAZ08483	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001864211
<i>Nasutitermes fumigatus</i>	AAZ08496	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XM_001845229
<i>Nasutitermes graveolus</i>	AAZ08484	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	XM_001352735
<i>Nasutitermes graveolus</i>	AAZ08497	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	XM_001353956
<i>Nasutitermes longipennis</i>	AAZ08485	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	XM_002135150
<i>Nasutitermes longipennis</i>	AAZ08498	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	XM_001353957
<i>Nasutitermes magnus</i>	AAZ08486	<i>Glossina morsitans</i>	DQ307159
<i>Nasutitermes magnus</i>	AAZ08499	<i>Simulium vittatum</i>	EU930267
<i>Nasutitermes pluvialis</i>	AAZ08487	<i>Spodoptera frugiperda</i>	EF641300
<i>Nasutitermes pluvialis</i>	AAZ08500	<i>Pieris rapae</i>	ACI32821
<i>Nasutitermes triodiae</i>	AAZ08488	<i>Pieris rapae</i>	ACI32824
<i>Nasutitermes triodiae</i>	AAZ08501	<i>Pieris rapae</i>	ACI32822
<i>Nasutitermes walkeri</i>	AAZ08489	<i>Pieris rapae</i>	ACI32823
<i>Nasutitermes walkeri</i>	AAZ08502	<i>Plodia interpunctella</i>	AAM95970
<i>Ochlerotatus triseriatus</i>	ACU30929	<i>Plutella xylostella</i>	ACI32820
<i>Ostrinia nubilalis</i>	ACI32836	<i>Reticulitermes flavipes</i>	ADJ19004
<i>Periplaneta americana</i>	ABR28480	<i>Reticulitermes flavipes</i>	AEK64796
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	ADH94599	<i>Reticulitermes virginicus</i>	AEK64797
<i>Rhodnius prolixus</i>	ABU96697	<i>Reticulitermes virginicus</i>	ADJ19023
<i>Simulium vittatum</i>	ACH56895		

9.2 ANEXO 2 – Tabela com a porcentagem dos aminoácidos dos genes de GHF 16 em *Ae. aegypti*

Protein: AAEL003889-PA gram-negative bacteria binding protein

Amino Acid	Number	Mol%
Ala A	30	7,16
Cys C	5	1,19
Asp D	19	4,53
Glu E	25	5,97
Phe F	24	5,73
Gly G	47	11,22
His H	6	1,43
Ile I	13	3,10
Lys K	16	3,82
Leu L	30	7,16
Met M	5	1,19
Asn N	38	9,07
Pro P	22	5,25
Gln Q	10	2,39
Arg R	22	5,25
Ser S	26	6,21
Thr T	29	6,92
Val V	23	5,49
Trp W	17	4,06
Tyr Y	11	2,63

Protein: AAEL003894-PA gram-negative bacteria binding protein

Amino Acid	Number	Mol%
Ala A	25	6,33
Cys C	4	1,01
Asp D	26	6,58
Glu E	19	4,81
Phe F	24	6,08
Gly G	37	9,37
His H	8	2,03
Ile I	21	5,32
Lys K	21	5,32
Leu L	24	6,08
Met M	8	2,03
Asn N	28	7,09
Pro P	20	5,06
Gln Q	10	2,53
Arg R	12	3,04
Ser S	32	8,10
Thr T	30	7,59
Val V	20	5,06
Trp W	15	3,80
Tyr Y	10	2,53

Protein: AAEL007064-PA gram-negative bacteria binding protein

Amino Acid	Number	Mol%
Ala A	20	5,38
Cys C	7	1,88
Asp D	16	4,30
Glu E	13	3,49
Phe F	20	5,38
Gly G	39	10,48
His H	5	1,34
Ile I	17	4,57
Lys K	20	5,38
Leu L	24	6,45
Met M	6	1,61
Asn N	30	8,06
Pro P	21	5,65
Gln Q	16	4,30
Arg R	23	6,18
Ser S	27	7,26
Thr T	15	4,03
Val V	22	5,91
Trp W	16	4,30
Tyr Y	14	3,76

Protein: AAEL007626-PA gram-negative bacteria binding protein

Amino Acid	Number	Mol%
Ala A	21	6,40
Cys C	2	0,61
Asp D	19	5,79
Glu E	19	5,79
Phe F	20	6,10
Gly G	20	6,10
His H	6	1,83
Ile I	12	3,66
Lys K	14	4,27
Leu L	34	10,37
Met M	6	1,83
Asn N	21	6,40
Pro P	21	6,40
Gln Q	10	3,05
Arg R	22	6,71
Ser S	18	5,49
Thr T	20	6,10
Val V	20	6,10
Trp W	7	2,13
Tyr Y	15	4,57

Protein: AAEL009176-PA gram-negative bacteria binding protein

Amino Acid	Number	Mol%
Ala A	34	8,79
Cys C	6	1,55
Asp D	18	4,65
Glu E	19	4,91
Phe F	23	5,94
Gly G	41	10,59
His H	7	1,81
Ile I	15	3,88
Lys K	10	2,58
Leu L	23	5,94
Met M	7	1,81
Asn N	30	7,75
Pro P	24	6,20
Gln Q	12	3,10
Arg R	20	5,17
Ser S	23	5,94
Thr T	24	6,20
Val V	20	5,17
Trp W	17	4,39
Tyr Y	13	3,36

Protein: AAEL009178-PA gram-negative bacteria binding protein

Amino Acid	Number	Mol%
Ala A	22	5,57
Cys C	4	1,01
Asp D	22	5,57
Glu E	27	6,84
Phe F	19	4,81
Gly G	38	9,62
His H	6	1,52
Ile I	11	2,78
Lys K	21	5,32
Leu L	37	9,37
Met M	6	1,52
Asn N	31	7,85
Pro P	27	6,84
Gln Q	8	2,03
Arg R	16	4,05
Ser S	24	6,08
Thr T	27	6,84
Val V	18	4,56
Trp W	15	3,80
Tyr Y	15	3,80