

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

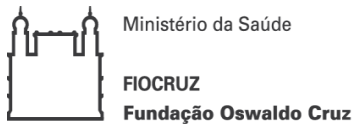
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO

Alexandre de Souza Menezes

**Avaliação da resposta imune de genes da via de sinalização Toll em *Anopheles*
aquasalis infectado por *Plasmodium vivax***

MANAUS – AM

2019



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO

Alexandre de Souza Menezes

Avaliação da resposta imune de genes da via de sinalização Toll em *Anopheles*
aquasalis* infectado por *Plasmodium vivax

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. Claudia María Ríos Velásquez

MANAUS – AM

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

M543a	Menezes, Alexandre de Souza
<i>Anopheles</i>	Avaliação da resposta imune de genes da via de sinalização Toll em <i>aquasalis</i> infectado por <i>Plasmodium vivax</i> . / Alexandre de Souza Menezes.
—	Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.
	51 f.
	Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.
	Orientador: Prof ^a . Dr ^a . Claudia Maria Ríos Velásquez.
	1. Malária 2. Plasmodium vivax 3. Anopholes aquasalis I. Título
	CDU 616.936 (043.3)
	CDD 616.9362
	22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – CRB-11/ 287

Alexandre de Souza Menezes

Avaliação da resposta imune de genes da via de sinalização Toll em *Anopheles aquasalis* infectado por *Plasmodium vivax*

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia María Ríos Velásquez

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Prof. Dr. Luis André Morais Mariuba - Membro externo

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira - Membro interno

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane por oferecer estrutura física: laboratórios e equipamentos, adequados para que tornasse possível realizar nossos trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação, por oferecer um curso de qualidade de capacitação no meio acadêmico, à Seca pelo serviço administrativo de qualidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEAM e PROEP pelo financiamento do projeto.

Às instituições colaboradoras Fundação de Medicina Tropical e Instituto Oswaldo Cruz.

Um agradecimento especial à Dr^a Claudia María Ríos Velásquez, pelos ensinamentos, amizade e ajuda em todas as etapas do mestrado. Ao Jordam William Pereira Silva pela amizade e auxílio em todas etapas do trabalho. Ao Dr. Felipe Arley Costa Pessoa pelos ensinamentos e amizade.

Aos pesquisadores envolvidos no trabalho Yara Traub Csekö, Rosa Santana, Henrique Silveira e Graça Alecrim.

Ao grupo do laboratório EDTA e turma da Pós-Graduação pela amizade e ajuda nas etapas do mestrado.

A minha família pela ajuda em todos os momentos e compreensão pela ausência em muitas confraternizações.

A todos vocês meu agradecimento de coração.

RESUMO

A malária é uma doença transmitida por mosquitos anofelinos fêmeas e está presente na maior parte dos países tropicais e subtropicais. Mesmo havendo um grande progresso para controle e eliminação em alguns lugares do mundo, as medidas aplicadas não são totalmente eficazes, além do mais, ainda não foi possível desenvolver vacinas ou terapias eficazes para eliminação da doença. O estudo das interações patógeno-vetor é um ponto importante na busca de novas moléculas que possam ser utilizadas para o desenho de estratégias de controle, tais como o desenvolvimento de drogas e vacinas de bloqueio de transmissão. Neste trabalho, exploramos marcadores imunológicos em *Anopheles aquasalis* infectados com sangue de paciente com *Plasmodium vivax* por processo de infecção artificial por membrana. Nós avaliamos a expressão de genes da via Toll. O supressor da cascata: o gene Cactus, um gene efetor: Cecropina que atua como um peptídeo antimicrobiano; e a serino protease Clip que atua como uma enzima proteolítica. Na avaliação dos genes por qPCR observamos que para Cactus houve maior expressão no 2º dia após a infecção comparado ao grupo não infectado $p = 0,0004$ período que os oocinetos estão atravessando as células do epitélio do intestino. Avaliando o efeito do silenciamento do gene Cactus na infecção, as médias foram 3.9 e 5 para os grupos dsB3M e dsCactus, respectivamente. Após silenciamento de Cactus observamos uma indução na expressão de Cecropina 36h após silenciamento e uma maior expressão em 48h que foi 4 vezes maior que o grupo dsB33M. A expressão de Clip entre o grupo dsCactus e SI foram bem similares, no grupo SI a expressão em 48h foi 2,6 vezes maior que o grupo não infectado. Nossos dados fornecem informações importantes sobre a participação de Cactus na fase inicial da infecção e uma relação entre o peptídeo antimicrobiano Cecropina e a via Toll.

Palavras Chave: *Anopheles aquasalis*, *Plasmodium vivax*, Resposta imune e Via Toll.

ABSTRACT

Malaria is a disease transmitted by *Anopheles* spp. mosquitoes, which is widespread in most tropical countries. Although great progress has been made in control and elimination in certain parts of the world, effective vaccines and therapies towards elimination and eradication have not yet been developed. To achieve this goal, basic biology studies based on interaction between pathogen and vector are paramount to finding transmission-blocking drugs and vaccines. In our work, we explored immunological markers in *Anopheles aquasalis* infected with *Plasmodium vivax* feed by blood of patients through artificial membrane feeding assay. We evaluated gene expression of the suppressor Toll Pathway: Cactus, a gene acts as supressior, Cecropin, a gene the acts as an antimicrobial peptide and serine protease Clip that acts as a cytokine. In the evaluation by qPCR we find that for Cactus there was greater expression on the 2° day after infection compared to the uninfected ($p = 0,0004$) period that the ookinets are crossing the intestinal epithelial cells. Evaluating the effect of block gene on the infection, the means were 3.9 and 5 for the dsB3M and dsCactus groups, respectively. In the experiments of gene expression after blocking the Cactus gene, we observed an induction on Cecropin expression 36h after silencing an increase of expression, and it was 4 fold greater in 48h in the dsCactus than dsB3M group. Expression's Clip between group dsCactus and SI was similar, in SI groups the level expression in 48h was 2.6 fold greater than uninfected. Our results provide important information about Cactus participation in the early phase after infection and relationship between the Cecropin antimicrobial peptide and Toll Pathway.

Keywords: *Anopheles aquasalis*, *Plasmodium vivax*, Immune response and Toll Pathway

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig 1 Mapa dos principais países endêmicos de casos de malária no mundo em 2017.....	13
Fig 2 Mapa de risco em 2017 no Brasil para Malária	14
Fig 3 Ciclo do desenvolvimento biológico do <i>Plasmodium</i> spp. em humanos e vetores	19
Fig 4 Células participante na resposta imune	20
Fig. 5 Vias de Sinalização	21
Fig. 6 Insetário do laboratório EDTA. A- Manutenção de larvas em bandejas. B- Criação de mosquitos na fase adulta em gaiolas	29
Fig. 7 Sistema de alimentação artificial para experimento de infecção com sangue de paciente para os mosquitos	29
Figura 8. Amplicons gerados por PCR convencional. A- Para confirmar a integridade do cDNA usando o gene da proteína ribossomal 49 (RP49). B- Amostras de infecção por <i>P. vivax</i> usando o gene RNA ribossomal de <i>P. vivax</i>	33
Figura 9. Expressão do gene Cactus em <i>An. aquasalis</i> infectados com <i>P. vivax</i> , em diferentes tempos após a infecção	34
Fig. 10 A: Expressão de Cactus em <i>An. aquasalis</i> injetados intratoracicamento com RNA dupla fita dos genes B3M (dsB3M) e Cactus (dsCactus)	35
Figura 11. Média de oocistos em mosquitos apenas infectados com sangue de paciente e microinjetados com dsCactus e dsB3M replicata 1	36
Figura 12. Expressão de Cecropina em <i>An. aquasalis</i> A- Mosquitos alimentados com sangue infectado (SI) e não infectado (SNI). B- Mosquitos injetados intratoracicamento com RNA dupla fita dos genes B3M (dsB3M) e Cactus (dsCactus) e alimentados com sangue infectado	36
Figura 13. Expressão de Clip em <i>An. aquasalis</i> . A- Mosquitos alimentados com sangue infectado (SI) e não infectado (SNI). B- Mosquitos injetados intratoracicamento com RNA dupla fita dos genes B3M (dsB3M) e Cactus (dsCactus) e alimentados com sangue infectado	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Genes para PCR convencional	31
Tabela 2. Genes para Qpcr	32
Tabela 3 Número de gametócitos, taxa de infecção e média de oocistos desenvolvidos em <i>Anopheles aquasalis</i> infectados por <i>Plasmodium vivax</i>	33
Tabela 4 Número de gametócitos, taxa de infecção e média de oocistos desenvolvidos em <i>Anopheles aquasalis</i> infectados por <i>Plasmodium vivax</i> e microinjetados com os genes dsB3M e dsCactus	35

ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Acquired Immuno Deficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

AMPs – Antimicrobial Peptides (Peptídeos Antimicrobianos)

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar

dsRNA – Double strand RNA (RNA de dupla fita)

FIG- Figura

Imd – Immune Deficiency ou Deficiência imunológica

iRNA – Ribonucleic Acid interference (Ácido ribonucleico interferente)

JAK – Janus Kinase

NF- κ B – Nuclear Factor kappa B (Fator nuclear kappa B)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia Polimerase)

RT-qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia Polimerase quantitativa em Tempo Real)

RNA - Ribonucleic Acid interference (Ácido ribonucleico)

STAT – Signal Transducers and Activators of Transcription (Transdutor de Sinal Ativador de Transcrição)

SI – Sangue Infectado

SNI – Sangue Não Infectado

PRRs - Pattern Recognition Receptors (Receptores de Reconhecimento Padrão)

PAMPs - Pathogen-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)

UpD – Ligand Unpaired

SUMÁRIO

1 Introdução	13
1.1 Epidemiologia	13
1.2 Parasito	15
1.3 Vetores	17
1.4 Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	18
1.5 Defesa imune em insetos	19
1.5.1 Sinais de modulação e amplificação	21
1.5.2. As vias de sinalização	23
1.5.3 iRNA	26
2 Objetivos	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 Metodologia	28
3.1 Coleta de sangue e aspectos éticos	28
3.2 Colonização de mosquitos	30
3.3 Infecção experimental	29
3.4 Contagem de oocistos	30
3.5 Extração e purificação de RNA	30
3.6 Síntese de cDNA	30
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	30
3.8 PCR em tempo real (qPCR)	31
3.9 RNA de interferência	31
3.10 Análise de dados	32
4 Resultados	33
4.1 Expressão de Cactus em <i>Anopheles aquasalis</i> infectados por <i>Plasmodium vivax</i> ..	33
4.2 Silenciamento do gene Cactus	34
4.3 Efeito do silenciamento de Cactus na infecção em mosquitos	35
4.4 Expressão de genes após silenciamento de dsCactus	36
5 Discussão	38
6 Conclusão	41
7 Referências	42

8 Anexo	49
8.1 Infecção Experimental	49
8.2 Avaliação da expressão de genes	49
8.3 Síntese de cDNA	50
8.4 Silenciamento com dsCactus	50
8.5 Avaliação do efeito do silenciamento de Cactus na infecção em <i>Anopheles aquasalis</i> infecção por <i>P. vivax</i>	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A malária é uma doença febril aguda, conhecida popularmente como impaludismo, sezão, febre palustre, maleita, febre terçã ou quartã. É considerada uma das três principais doenças em importância para a saúde no mundo, assim como, a Tuberculose e AIDS. Houve um grande progresso no combate contra a Malária entre os anos 2000 e 2015. Em 2000 ocorreram 262 milhões de casos, quinze anos depois, houve uma queda de 18,24% no número de casos. No entanto, a partir de 2015, houve um aumento de 2,24% até o último ano registrado. Em 2017 foram registrados 219 milhões de casos segundo a Organização Mundial da Saúde.⁽¹⁾

No mundo há 87 países endêmicos e estão distribuídos principalmente em regiões tropicais. A África lidera o número de casos de malária no mundo com cerca de 200.500.000 de casos, 92% do total registrado. Enquanto que a Região Sudeste da Ásia e Região do Leste Mediterrâneo foram registrados 11.290.000 (5%) e 4.410.000 (2%), respectivamente.⁽¹⁾

O número de mortes vem caindo. No ano de 2000 foram estimadas 839 mil mortes, enquanto que em 2017 foram estimadas 435 mil mortes, uma queda de 48,15%. No último ano contabilizado, 93% dessas mortes ocorreram na África.^(1,2)

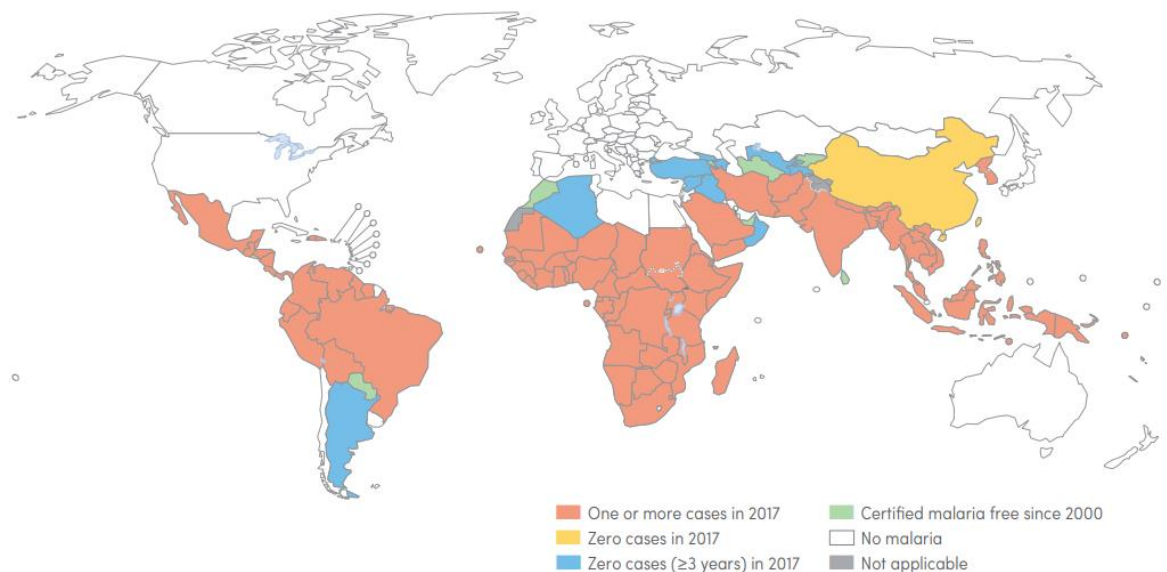


Figura 1. Mapa dos países endêmicos para malária no mundo em 2017.⁽¹⁾

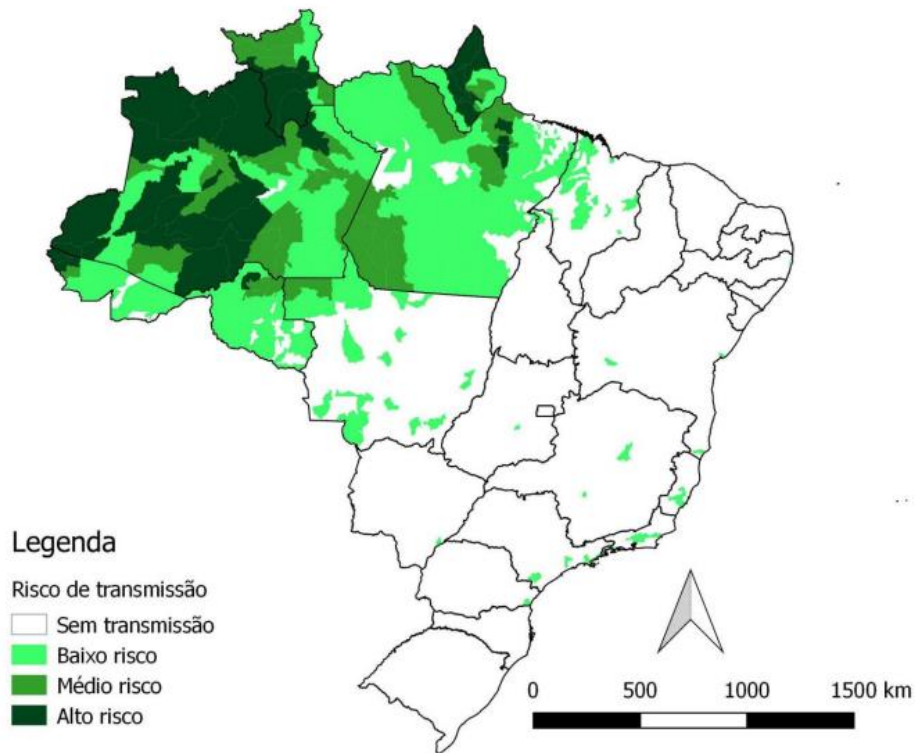


Figura 2. Mapa do Brasil mostrando áreas de risco para transmissão de malária em 2017.⁽³⁾

Nas Américas, 21 países são endêmicos. Em 2017 foram registrados 776.444 casos, dos quais 93% foram registrados no Brasil, Colômbia, Guiana, Haiti, Perú e Venezuela.⁽⁴⁾

No Brasil, a Região Amazônica, com 195.193 casos registrados em 2018, é responsável por cerca de 99,81% dos casos, sendo os estados de Amazonas, Pará e Roraima⁽⁵⁾ os que aportam maior número de casos (Figura 2). Na Região Extra-Amazonica, em 2018 foram registrados 732 casos, ocorrendo principalmente nos estados do Espírito Santo, São Pulo, Bahia e Rio de Janeiro.⁽⁶⁾ Alguns anos atrás, a maior parte desses casos era importada da Região Norte ou da África, mas nos últimos anos tem-se registrado casos envolvendo malária zoonótica causada por *Plasmodium simium* na Região Sudeste.⁽⁷⁾

1.2 Parasito

As principais espécies de *Plasmodium* que causam malária em humanos são *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*.⁽⁸⁾ As três primeiras espécies circulam no Brasil. Recentemente, duas espécies de *Plasmodium* zoonóticas foram consideradas como patogênicas para o homem: *Plasmodium knowlesi*, no Sudeste Asiático;⁽⁹⁾ e *Plasmodium simium*, no Brasil.⁽¹⁰⁾ Essa última espécie, caracterizada por infectar primatas não humanos, foi recentemente apontada como responsável por casos autóctones de malária humana na região de Mata Atlântica.⁽¹¹⁾

Plasmodium falciparum é a espécie mais predominante no mundo, seu ciclo eritrocítico leva 48 horas, e é capaz de invadir tanto hemácias jovens quanto maduras. As formas gametocíticas levam cerca de 15 dias para serem detectadas na corrente sanguínea por microscopia de luz. Esta espécie é conhecida por estar relacionada a sintomas graves, tais como obstrução vascular dos capilares no cérebro (malária cerebral), edema pulmonar levando a problemas respiratórios, quadros clínicos de acidose, anemia e icterícia. Diferente do que acontece no resto do mundo, nas Américas não é a mais prevalente, correspondendo com 25.9% dos casos. No Brasil, foi mais prevalente até o final da década de 80.^(5,12-14)

Plasmodium vivax é uma espécie amplamente distribuída no mundo, é a mais prevalente no Continente Americano, causando aproximadamente 74,1% dos casos registrados, e no Brasil, cerca de 88,8% dos casos. Seu ciclo eritrocítico leva 48 horas e invade preferencialmente hemácias jovens. As formas gametocíticas de *P. vivax* levam cerca de 4 dias para serem encontradas na corrente sanguínea, e por isso, há a necessidade de um diagnóstico e medicação rápida para conter a transmissão do patógeno.⁽¹⁵⁾ Até pouco tempo atrás, a malária causada por *P. vivax* era considerada benigna, mas estudos recentes por Lacerda et al.⁽¹⁸⁾ encontraram relação com quadros clínicos graves envolvendo anemia, trombocitopenia, síndrome neurológica, edema pulmonar, falha renal aguda, icterícia e acidose metabólica.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ Uma característica importante de *P. vivax* é a formação de hipnozoítos, formas do parasito que se alojam no fígado e permanecem em estado dormente por tempo variável. Após um tempo elas reativam seu desenvolvimento biológico e voltam a circular na corrente sanguínea para

invadir novamente as hemácias, por isso são responsáveis por reincidência da doença, além de dificultar sua eliminação.⁽¹⁹⁾

Plasmodium malariae é amplamente distribuído no mundo. Seu ciclo eritrocítico leva cerca de 72 horas, invade preferencialmente células vermelhas maduras, produz um número baixo de merozoítos.⁽²⁰⁾ O diagnóstico por gota espessa causa deformação no parasito, sendo confundido com *P. vivax*, e, portanto, subnotificado. Os sintomas são brandos, mas podem evoluir para estado crônico. Os casos de morte são raros.⁽²¹⁾

Plasmodium ovale é mais prevalente na África, mas também há casos na Ásia e Oceania. No Brasil os casos registrados são importados da África. Este parasito possui características morfológicas similares com *Plasmodium vivax*, além de também ser capaz de desenvolver formas hipnozoíticas.⁽²²⁾

Plasmodium knowlesi é um parasito zoonótico que infecta naturalmente macacos, no entanto, no sudeste da Ásia há registros de infecção em humanos. Inicialmente confundido com *Plasmodium malarie* por ser morfolologicamente similar, pode ser confirmado através de técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), foi considerado como a quinta espécie do gênero *Plasmodium* spp. capaz de infectar humanos. É um parasito que invade células vermelhas jovens e maduras, seus sintomas não são específicos, apresentando febre, calafrios, dores de cabeça, mialgia.⁽⁹⁾

Plasmodium simium, um parasito de macacos, foi recentemente relacionado a casos de infecção em humanos nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. Por apresentar características morfológicas muito similares ao *Plasmodium vivax*, tem sido tratado da mesma maneira. Essa descoberta foi possível através de análise da sequência do genoma mitocondrial das amostras de sangue de pacientes.^(10,11) Este trabalho corrobora a tese de Leônidas Deane que já havia proposto que macacos seriam reservatórios para o parasito que eventualmente seria transmitido ao ser humano pelo mosquito em áreas de região da Mata Atlântica.

1.3 Vetores

Os mosquitos do gênero *Anopheles* estão classificados na Ordem Diptera e, Família Culicidae. Esses insetos são holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa, passando pelos estágios de ovo, larva (com quatro estádios larvais), pupa e adulto.⁽²³⁾

As formas larvais se alimentam de matéria orgânica na água, as pupas não se alimentam, os adultos se alimentam de carboidratos providos das seivas, flores e frutos. As fêmeas adultas possuem hábitos hematofágicos, pois precisam das proteínas do sangue para a formação dos ovos e é através da hematofagia que adquirem e transmitem agentes patogênicos.⁽²⁴⁾

O gênero *Anopheles* é composto por 475 espécies, 41 das quais têm sido incriminadas como principais vetores.⁽²⁵⁾ No mundo as principais espécies de importância médica são *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. stephensi*, *An. dirus*, *An. culicifacies*, *An. darlingi*, *An. albitarsis*, *An. nuneztovari*, *An. cruzii* e *An. bellator*.⁽²⁶⁾

Anopheles darlingi é a principal espécie vetora, e é caracterizada por apresentar ampla distribuição geográfica na América do Sul, suscetibilidade ao *Plasmodium*, capacidade de habitar criadouros artificiais e naturais e hábitos antropofílicos.⁽²⁷⁾ Na região Amazônica as principais espécie vetoras são *An. darlingi*, *An. albtarsis* e *An. aquasalis*. Na Região Extra-amazônica os principais vetores são *Anopheles bellator*, *An. aquasalis* e *Anopheles cruzii*.

Anopheles aquasalis está distribuída em áreas costeiras, desde o México até a Argentina. Tem sido encontrada naturalmente infectada com *P. vivax* no leste da Amazônia. É uma espécie facilmente colonizada em condições de laboratório, e suas taxas de infecção por *P. vivax* são semelhantes às encontradas em *An. darlingi*.⁽²⁸⁾ Por isso, é considerado um bom modelo experimental para o desenvolvimento de estudos sobre interação patógeno-hospedeiro.

1.4 Ciclo de vida do *Plasmodium*

O *Plasmodium* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, precisando de dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado, para completar seu ciclo de desenvolvimento. No hospedeiro vertebrado ocorre o ciclo esquizogônico ou assexual, e no hospedeiro invertebrado o ciclo esporogônico ou sexual.⁽²⁹⁾

A transmissão para um hospedeiro vertebrado começa quando um mosquito infectado inocula esporozoítos junto com a saliva. Ao serem injetados nos vasos sanguíneos, eles migram pela circulação periférica sanguínea para as células hepáticas por tropismo. Ao invadir as células do fígado, inicia a fase assexuada exoeritrocítica esquizogônica. Os esporozoítos se transformam em trofozoítos, posteriormente em esquizontes, e merozoítos que são liberados na circulação sanguínea. Esses merozoítos invadem as células vermelhas e se transformam em trofozoítos, esquizontes e novamente são liberados na forma de merozoítos na corrente sanguínea. Alguns parasitos continuam infectando células vermelhas, e outras se diferenciam em gametas, formas infectantes para o mosquito.⁽¹⁵⁾

O ciclo de vida sexuado do *Plasmodium* no mosquito inicia quando o mosquito ingere as formas sexuais do parasito durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. No intestino médio do mosquito os gametas se diferenciam em microgametas (masculinas) e macrogametas (femininas). Um microgameta fecunda um macrogameta, formando o zigoto,⁽³⁰⁾ que se transforma em oocineto móvel que atravessa as células do epitélio intestinal e alcança a lâmina basal, onde se transforma em oocisto. Dentro desses oocistos, se formam milhares esporozoítos. Após uma ou 2 semanas, os esporozoítos são liberados na hemocele, e dali migram e invadem as glândulas salivares, onde permanecem pelo resto de vida do mosquito ou até serem inoculados em outro hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo.⁽³¹⁾

O tempo de desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito demora entre uma e duas semanas, dependendo das espécies de parasitos e vetores. Em geral, a fase inicial da infecção do mosquito demora aproximadamente de 2 a 3 dias, e se estende desde o repasto sanguíneo até a formação do oocisto. A fase tardia da infecção demora aproximadamente de 4 a 14 dias, e compreende o desenvolvimento do oocisto e a invasão da glândula salivar pelo esporozoíto.⁽³²⁾

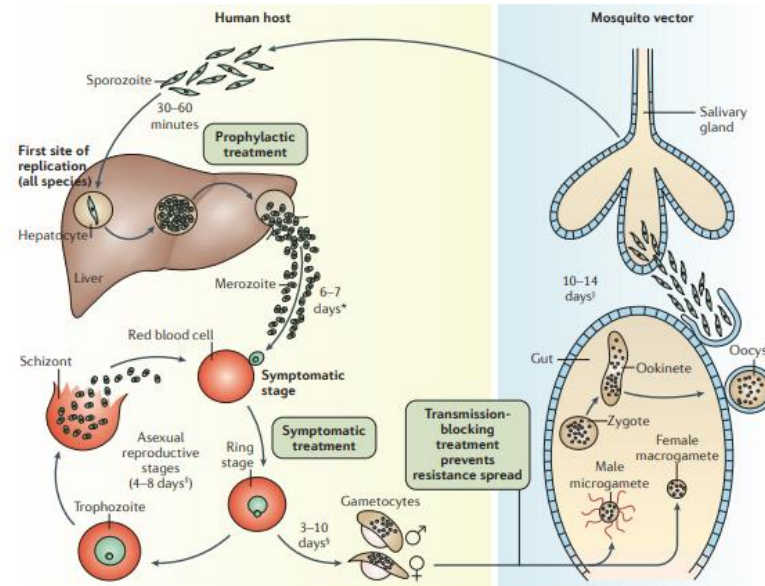


Figura 3. Ciclo do desenvolvimento biológico do *Plasmodium* spp. em humanos e vetores.⁽³³⁾

1.5 Defesa imune em insetos

Os insetos estão amplamente distribuídos nos mais diversos tipos de ambientes, sejam aquáticos ou terrestres, e por isso, estão expostos a diversos tipos de parasitos: bactérias, fungos, protozoários ou vírus. Para combater a invasão desses agentes patogênicos, os insetos dispõem de barreiras físicas e defesas humorais e celulares de maneira que contenha e elimine o parasito.^(34,35)

Como principal barreira física, os insetos possuem a cutícula, que é o revestimento externo do corpo do inseto, o qual é composto por hidrocarbonetos e lipídios. Essa camada externa atua como exoesqueleto para o corpo, servindo como um verdadeiro escudo para evitar a perda de água interna, ajudar na camuflagem, oferece proteção contra a radiação solar e a invasão de microorganismos. Ela é secretada pelas células da epiderme e formada por uma primeira camada interna mais grossa, a protocutícula, logo abaixo, uma camada mais interna e fina, a epicutícula.⁽²³⁾

A bomba cibarial e o lúmen intestinal também representam as barreiras físicas que impedem a invasão por microorganismos no corpo do hospedeiro.⁽³⁶⁾ A matriz peritrófica é uma importante barreira física secretada pelas células do epitélio intestinal logo após a ingestão do sangue. Durante o desenvolvimento do *Plasmodium*, apenas os oocinetos que se encontram próximos às células que secretam a matriz, são capazes de

ultrapassá-la, pois a matriz ainda está em formação.⁽³⁷⁾

A resposta imune inata é a última linha de defesa contra microorganismos invasores. O sistema imune dos insetos é semelhante ao dos organismos vertebrados e está composto por resposta celular e humoral.⁽³⁸⁾ A defesa celular é exercida pelos hemócitos, células que realizam fagocitose, encapsulamento, coagulação e melanização. Essas células podem estar fixadas na parede do corpo ou circulando no fluxo da hemolinfa.⁽³⁹⁾ A resposta imune humoral é mediada por proteínas do sistema do complemento, citocinas e proteínas intracelulares que desencadeiam a transcrição de peptídeos antimicrobianos que atuam direto na morte do parasito.⁽⁴⁰⁾

Outro importante componente da defesa imune é a melanização, processo que existe apenas no filo artropoda. Possui funções de cicatrização e encapsulamento em colaboração com as células hemocíticas, com o objetivo de isolar um microorganismo e impedir sua disseminação.^(41,42)

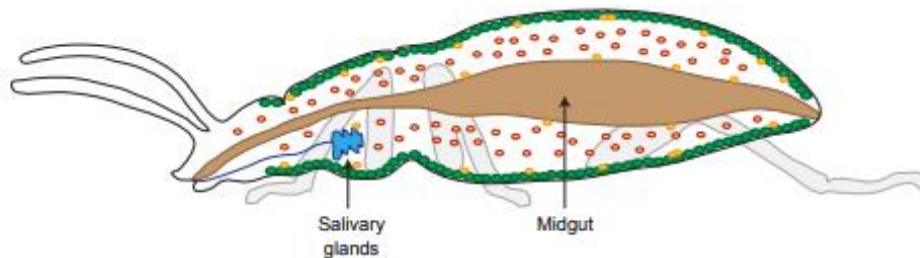


Figura 4. Células participantes na resposta imune em insetos.⁽⁴³⁾ Pontos vermelhos: Hemócitos circulantes, Pontos amarelos: hemócitos fixados; Pontos verdes: Células do corpo gorduroso.

Essa resposta é iniciada através proteínas denominadas de receptores de reconhecimento padrão - PRRs (Pattern Recognition Receptors) e são capazes de detectar antígenos do microorganismo invasor. Esses antígenos estão presentes na superfície do patógeno e possuem estruturas moleculares conservadas denominadas padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns).^(44,45)

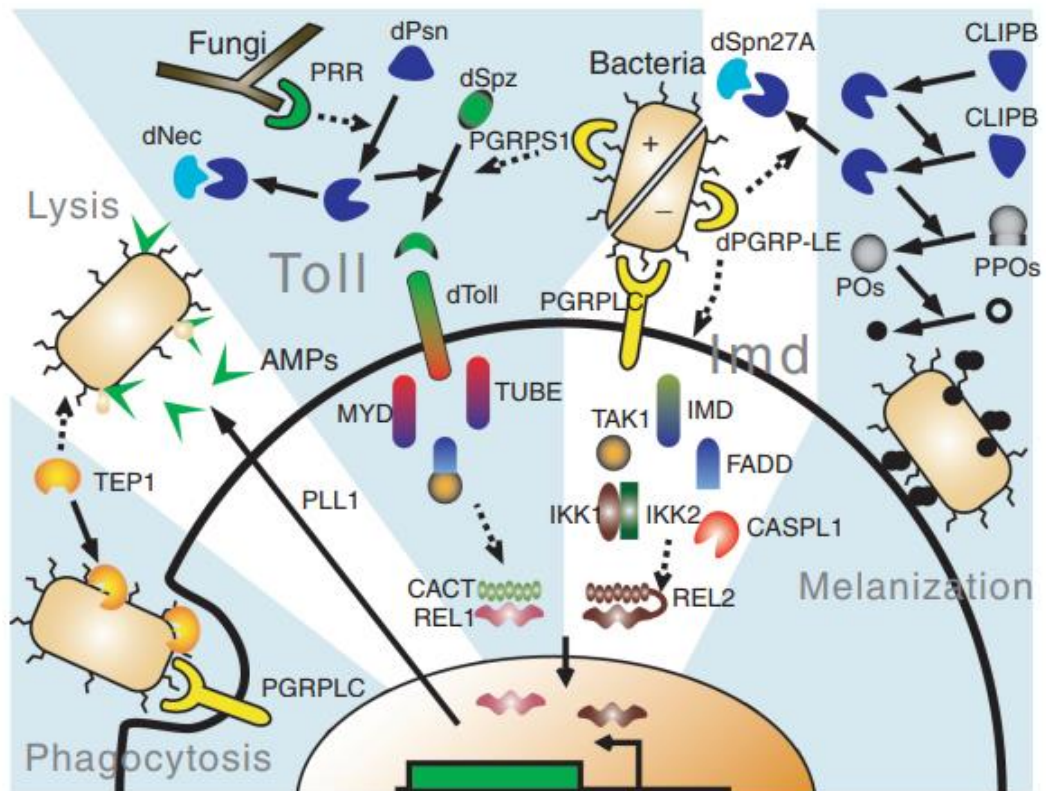


Figura. 5. Visão geral das vias de sinalização imune em insetos.⁽⁴⁶⁾

Esses receptores podem estar fixados na membrana celular ou circulando livremente na hemolinfa. Alguns são capazes de realizar atividade catalítica, enquanto que outros receptores realizam outros mecanismos, tais como fagocitose. Entre os principais receptores em insetos que já foram descobertos são: Receptores de peptídeoglicanos e glucanos, Proteínas de Fibrinogênio, Thioester e Lectinas as quais foram encontrados em *Anopheles* spp, *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* e *Manduca sexta*.^(47,48) Outro grande potencial desses receptores é sua capacidade de transcrição por mecanismo de splicing alternativo, permitindo mudanças em sua estrutura para reconhecer diferentes tipos de antígenos.⁽⁴⁹⁾

1.5.1 Sinais de modulação e amplificação

As serino proteases são proteínas que possuem um papel importante no processo de comunicação entre as células. Elas atuam na modulação de sinais nas mais diversas funções fisiológicas: digestão, coagulação, fertilização e resposta imune.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾ Em *Drosophila menalogaster* foram encontrados 204 genes relacionados a serino proteases, em *Anopheles gambiae*; 306.⁽⁵³⁾

A ativação dessas enzimas proteolíticas é realizada por receptores de reconhecimento padrão, e desencadeiam uma série de reações entre as próprias serino proteases, para em seguida, dar início à ativação de uma via de sinalização, que vai cumprir uma função específica celular.⁽⁵⁴⁾

Em sua estrutura, as serino proteases são compostas por uma tríade de aminoácidos que atuam como centro catalítico para realizar suas funções biológicas (Serina, Histidina e Aspartato). Essas proteases são sintetizadas em estado zimógeno (forma inativa) até que sofram processo de clivagem por uma protease específica, para serem capazes de desencadear a cascata de reações proteolíticas de acordo com sua função.⁽⁵³⁾ A ação dessas proteínas é regulada por enzimas inibidoras denominadas serpinas. Elas atuam de maneira específica para manter a homeostase do organismo.⁽⁵⁵⁾

Entre as principais serino proteases estão as proteínas Clip. São nomeadas dessa maneira por serem caracterizadas pela sua estrutura química na forma de clip de papel em seu domínio N-terminal. Sua estrutura é seguida por uma sequência de aminoácidos, e por fim, seu domínio de protease C-terminal, que define qual grupo da família Clip pertence: A, B, C ou D.⁽⁵²⁾

Em um estudo de transcriptoma realizado por Couto et al.⁽⁵⁶⁾ foi observada maior expressão de serino proteases em *An. gambiae* comparado a *An. stephensi*. Dentro desse grupo a maior parte encontrada foi de serino proteases Clip.

Uma das etapas de cascata de reações proteolíticas pôde ser observada por Ross et al.⁽⁵³⁾ onde Clip C é uma serino protease que circula na hemolinfa. Quando entra em contato direto com a superfície de um patógeno, esta molécula sofre alteração conformacional, e reage com Clip B; para em seguida, se ligar com Spätzle, que desencadeia a ativação da via de sinalização Toll. Vols et al.⁽⁵⁷⁾ e Christophides et al.⁽⁵⁸⁾, em estudos independentes, observaram uma maior expressão de Clip B e Clip C em *Anopheles gambiae* infectado por *P. berguei* durante período de invasão nos tecidos das células epiteliais. Possivelmente essas proteínas exercem um papel na modulação da resposta imune em mosquitos *Anopheles* spp.^(97,98)

A ativação das vias de sinalização está estritamente relacionada à ação de PRRs e Serino Proteases. Essas citocinas desencadeiam a ativação de citocinas ligantes a receptores transmembrana vinculados às vias de sinalização, tais como, Spätzle e UPD

(Citocina ligante não pareado), que relacionados às vias Toll e JAK/STAT, respectivamente.^(59,60)

1.5.2 As vias de sinalização

As vias de sinalização imune mais conhecidas são JAK/STAT (Janus Kinase/Transdutores de sinal e ativadores de transcrição), Imd (Imuno deficiência) e Toll. Elas desencadeiam uma cascata de reações intracelulares para que ocorra a translocação de proteínas denominadas Fatores Nucleares (NFκB) para o núcleo da célula. Essas NFκB realizam a transcrição de peptídeos antimicrobianos (AMPs) que atuam diretamente no combate contra o patógeno.^(61,62)

A via Imd é importante na resposta imune contra fungos, bactérias e *Plasmodium* spp. Ela é ativada por Peptidoglicanos (PGN) que estão presentes na superfície do patógeno e se ligam a Proteínas de Reconhecimento de Peptidoglicanos (PGRP-LC). Em seguida, esses receptores recrutam as proteínas intracelulares Imd, dFADD e a caspase Dredd, que em forma conjunta, realizam a clivagem da porção C-terminal Ankirina (ANK) do complexo Relish, para que o fator transcrição nuclear Rel2 seja translocado para o núcleo da célula; e realize a transcrição de peptídeos antimicrobianos.^(63,64) A importância de Rel2 para o controle da infecção é evidente quando este fator de translocação nuclear é suprimido, tornando o hospedeiro mais susceptível à infecção.^(65,66)

Os genes supressores possuem papel determinante na regulação da via Imd, tais como Caspar. Em modelo *Anopheles gambiae* infectado por *Plasmodium falciparum*, Garver et al.^(65,67) observaram que através do silenciamento do gene supressor da via Imd a infecção diminui 7 vezes comparado ao grupo controle.

Outro supressor negativo é Caudal que quando silenciado também responde a uma infecção de forma mais efetiva.⁽⁶⁸⁾ Como consequência, a transcrição de peptídeos antimicrobianos tais como Cecropinas e Defensinas sofreram uma expressão mais elevada após 12 e 24 horas da infecção. Por tanto, este antagonista possui papel importante nesta via.⁽⁶²⁾

A via Toll é conservada ao longo da evolução no reino animal, sendo encontrados 10 receptores em mamíferos e em insetos.⁽⁷¹⁾

Esta via foi inicialmente descrita no desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster*.⁽⁷²⁾ Ao contrário do que acontece em mamíferos, os receptores Toll em insetos não se ligam diretamente com antígenos da superfície de microorganismos. Esta via atua de forma cooperativa com receptores de reconhecimento padrão (PRRs) altamente específicos para desencadear a cascata de reação proteolítica entre as serino proteases. A detecção é desempenhada por proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRP-AS, PGRP-SD) e proteínas de reconhecimento de bactérias Gram Negativas (GNBP1, GNBP3).⁽⁷³⁾ Após ativação desses receptores, serino proteases são ativadas para que ocorra a clivagem da citocina Spätzle^(74,75), que em seguida, se une ao receptor Toll, que induz o recrutamento de três proteínas intracelulares que contêm um Domínio de morte intracelular (MyD88, Tube e Pelle). A ligação entre essas proteínas desencadeia a fosforilação do supressor negativo da via Toll, Cactus. Como consequência, os fatores de transcrição Rel ficam livres para serem translocados do citoplasma para o núcleo da célula, e assim, ocorrer a transcrição de peptídeos antimicrobianos como a defensina, cecropina e gambicina.^(76,77)

Essa via é ativada primordialmente por uma família de proteínas de receptores de peptídeoglicanos (PGRP-SA) e, surpreendentemente, foi descoberto que GNBP3 (Proteínas de união em bactérias gram-negativas) também possuem uma grande contribuição para combater uma infecção contra bactérias gram-positivas.⁽⁷³⁾

Os fatores de transcrição nuclear (NFκB) são um dos principais objetos de estudo para investigar a participação das vias de sinalização. Em *Anopheles gambiae*, inicialmente Rel1 foi nomeado como Gambif1 e denominado como uma proteína homóloga a Dif/Dorsal de *Drosophila melanogaster*.⁽⁷¹⁾

Os supressores destas vias também são amplamente explorados em mosquitos. O silenciamento destes genes torna os hospedeiros capazes de realizarem uma resposta contra o patógeno de maneira mais efetiva.⁽⁶⁹⁾ Em infecção pelo fungo *Beauveria bassiana* em *Anopheles gambiae*, a expressão de Cactus é induzida no segundo dia após infecção e permanece com níveis elevados até o sexto dia após infecção. Rhodes et al. (2018) observaram que o silenciamento de Cactus contribuiu para o aumento da longevidade.⁽⁷⁹⁾

O silenciamento do supressor da via Toll aumenta a transcrição de genes efetores que combatem infecções contra microorganismos. Esses genes efetores estão

relacionados com a transcrição de peptídeos antimicrobianos (AMPs), além de proteínas TEP e LRIM1, conhecidas por terem funções homólogas ao Sistema do Complemento de mamíferos. A via Toll é ativada em *Aedes aegypti* contra o vírus da Dengue, reduzindo em 4 vezes a infecção pelo vírus (DENV – 2) quando ocorre o silenciamento do gene Cactus.⁽⁸⁰⁾ Em *Drosophila melanogaster*, foi demonstrado que a via Toll possui uma atividade maior na resposta contra bactérias gram-positivas. Luna et al. observaram maior expressão para Defensina, Gambicina e Cecropina em *Anopheles stephensi* em resposta contra bactérias.⁽⁸¹⁾

Frolet et al.⁽⁸²⁾ observaram uma indução de TEP e LRIM1 três vezes maior após o silenciamento de Cactus em *Anopheles gambiae* infectado por *Plasmodium berghei*. Embora não encontrarem uma diferença no número de oocistos após supressão de Cactus, Garver et al.⁽⁶⁷⁾ observaram que o silenciamento do gene Cactus não influencia nas taxas de infecção mas diminui significativamente a intensidade da infecção (taxa de oocistos) em *An. gambiae* infectados por *Plasmodium berghei*, em *Anopheles albimanus* infectados por *P. falciparum*, e em *Anopheles stephensi* infectados por *P. falciparum*.

A via Toll também possui participação na resposta imune celular. Larvas de *Drosophila melanogaster* com mutação no gene Cactus mostraram uma população elevada de lamelócitos em processo de encapsulamento mesmo sem que houvesse infecção por um patógeno.⁽⁸³⁾ O silenciamento do gene Cactus em *Anopheles gambiae* infectados por *Plasmodium falciparum*⁽⁸⁴⁾ gerou maior população de oenócitos, células também da resposta imune celular que participam no processo de melanização, por tanto a via Toll possui um papel importante além do desenvolvimento embrionário em insetos.

1.5.3 iRNA interferente

Outro importante componente na defesa imune é o mecanismo de RNA de interferência (iRNA). Essa defesa atua no combate contra vírus por meio de proteínas que são capazes de clivar o RNA de dupla fita, e assim, impedir a proliferação e patogênica no hospedeiro.⁽⁸⁵⁾ Esse mecanismo foi descoberto em 1990 por Napoli e Jorgensen observando como a supressão de genes causa mudança no fenótipo da coloração em petúncias.⁽⁸⁶⁾

Esse mecanismo é ativado com a ação de uma enzima chamada Dicer RNase que cliva qualquer RNA de dupla fita de natureza exógena, tornando-os em moléculas menores, que são denominadas de pequenos fragmentos de RNA (siRNA) de aproximadamente 20 a 25 nucleotídeos. O RNA de dupla é então capturado por um complexo de proteínas chamada RISC-AGO (Complexo de silenciamento induzido por RNA - Argonauta). O complexo RISC realiza a desnaturação da dupla fita tornando-a fita simples, mas ainda presa a esta proteína. Agora em forma de fita simples, o RNA é capaz de se ligar com o RNA mensageiro (mRNA) que sairá do núcleo da célula. Após ligação, o complexo AGO realiza clivagem do RNA mensageiro ligado ao RNA interferente, assim, impedindo que o gene seja expresso.⁽³⁵⁾

A compreensão deste mecanismo e aperfeiçoamento da técnica do iRNA permitiu a realização de muitos estudos para desvendar a função dos genes e desenvolvimento de alternativas terapêuticas.⁽⁸⁷⁾ Desde então, vários modelos têm sido explorados para entender como é desencadeada a resposta imune em insetos vetores de doenças.^(65,88,89) A tecnologia do iRNA em conjunto com estudos de transcriptômica tornaram possível descobrir quais genes participam na modulação da resposta imune em *Anopheles* spp. para combater a infecção por patógenos.^(46,90,91)

A maior parte dos estudos disponíveis sobre iRNA em mosquitos utilizam genes de *Anopheles gambiae*. Outras espécies como *An. dirus* e *An. stephensi* e *An. aquasalis* tem sido pouco estudadas. Devido às estratégias de controle da malária não serem suficientes para eliminar a doença, estudos baseados em mecanismos imunes em insetos podem ser uma alternativa para encontrar moléculas que possam ser utilizadas para o bloqueio da transmissão. Investigações sobre moléculas que participam na resposta imune podem fornecer informações importantes para pesquisas futuras sobre o desenvolvimento de estratégias alternativas para o controle da doença.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Estudar o efeito dos genes da via Toll na resposta imune de *Anopheles aquasalis* infectados por *Plasmodium vivax*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de genes da via de sinalização Toll em *Anopheles aquasalis* infectados com *Plasmodium vivax*
- Avaliar o efeito do silenciamento do gene Cactus na resposta imune de em *Anopheles aquasalis* contra *Plasmodium vivax*

3 Metodologia

3.1 Coleta de sangue e aspectos éticos

Para os experimentos foi utilizado sangue de pacientes infectados com *P. vivax*, diagnosticados pelo método de gоста espessa na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. No estudo foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, que apresentavam uma parasitemia de duas cruces e no mínimo 4 gametócitos.

Após o diagnóstico os pacientes recebiam explicação sobre os objetivos e metodologias do projeto, e os que aceitavam participar como voluntários assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

De cada paciente foram retirados 3 mL de sangue em tubo vacutainer heparinizado.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 39706514.2.0000.0005).

3.2 Colonização de mosquitos

Para os experimentos foram utilizadas fêmeas de *An. aquasalis*, colonizadas em condições de laboratório, provenientes do insetário do Laboratório em Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia (EDTA). Essa cepa de *An. aquasalis* é originária da fazenda Paracambi, no Rio de Janeiro, Brasil, colonizada desde 1993 no laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

No EDTA os mosquitos adultos foram mantidos a 27°C e 70-80% de umidade relativa e supridos com solução açucarada à 10% *ad libitum*, as larvas foram alimentadas com ração de peixe e mantidas em bandejas, as fases adultas foram criadas em gaiolas (Figura 6A-B), seguindo o protocolo modificado de Da Silva et al.⁽⁹²⁾

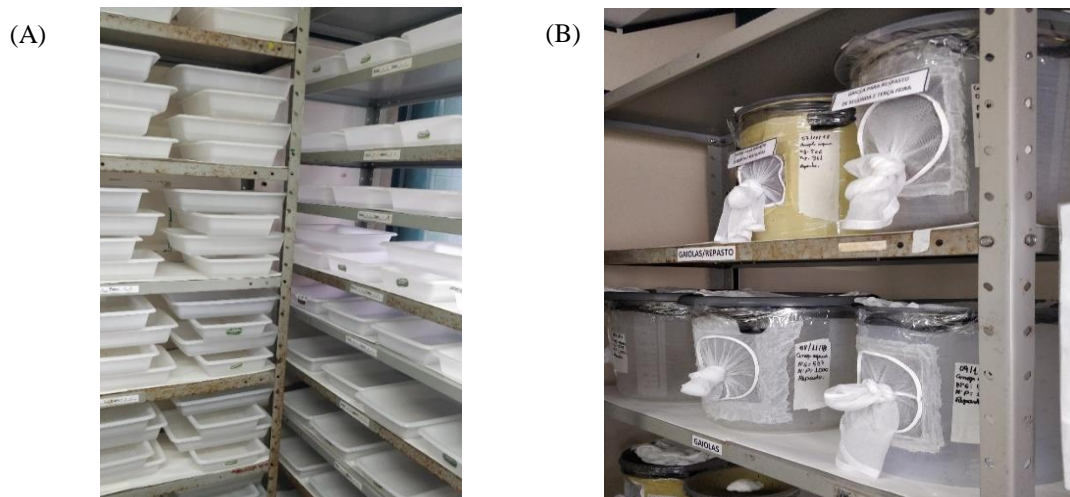


Figura 6. Insetário do laboratório EDTA. A- Manutenção de larvas em bandejas. B- Colonização de mosquitos na fase adulta em gaiolas.

3.3 Infecção experimental

A infecção experimental foi realizada através de membranas artificiais de Parafilm®. Alimentadores de vidro foram revestidos com essa membrana e conectados, através de mangueiras, a uma bomba de água em um banho Maria, aquecido a 37°C, permitindo que a água circulasse nas mangueiras e mantivesse o sangue dos alimentadores aquecido (Figura 7).



Figura 7. Sistema de alimentação artificial por membrana usado para a infecção experimental dos mosquitos.

Para os experimentos foram utilizadas fêmeas de 3 a 5 dias de idade, privadas de açúcar 24 horas antes da infecção experimental. As fêmeas foram divididas em três grupos que receberam três tratamentos diferentes: alimentação com açúcar (SF),

alimentação com sangue não infectado (SNI), alimentação com sangue infectado com *P. vivax* (SI).

As fêmeas completamente ingurgitadas foram transferidas para gaiolas e mantidas a 27°C e a 70-80% de umidade relativa, alimentadas com solução açucarada 10% *ad libitum*.

Após 1, 2, 3, 4 dias da infecção/alimentação por membrana, grupos de 5 mosquitos de cada tratamento foram conservados do Reagente Trizol, macerados e armazenados a -80°C para posterior extração de RNA.

3.4 Contagem de oocistos

Após cinco dias da infecção, o intestino médio de 30 mosquitos do grupo alimentado com sangue infetado com *P. vivax* foram dissecados e corados com mercúrio cromo 2% para contagem dos oocistos.

3.5 Extração e purificação de RNA

A Extração do RNA foi realizada pelo método do Reagente Trizol seguindo o protocolo do fabricante. Brevemente, o RNA foi isolado com clorofórmio, precipitado com álcool isopropílico e lavado com etanol 75%. Posteriormente, o RNA total extraído foi purificado utilizando o kit RQ1 RNase-free DNase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada com a ajuda de um BioDrop.

3.6 Síntese de cDNA

Para realizar a síntese de cDNA foi utilizado o kit SuperScriptIII Reverse Transcriptase e Oligo (dT)20 50uM, usando 5µg de RNA, seguindo as instruções do fabricante. Para melhorar a purificação do RNA foi utilizada a enzima RNase Out.

3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a integridade do cDNA, utilizando um iniciador do gene constitutivo de *An. aquasalis* (RP49). Para verificar se as amostras estavam infectadas foi realizada uma PCR com iniciadores específicos para a detecção de *P. vivax* (Pv18s). E para avaliar a ativação da via Toll foi utilizado o primer do gene Cactus (Tabela 1)

Tabela 1. Primers usados para amplificação de DNA por PCR convencional.

Gene	Sequência
RP49 Fw	5'-AGG GAC AGT ACC TGA TGC CCA ACA T-3'
RP49 Rv	5'-CGC ACG TTG TGG ACG AGG AAC TTC T-3'
Pv18s Fw	5'-ACA TGG CTA TGA CGG GTA ACG-3'
Pv18s Rv	5'-TGC CTT CCT TAG ATG TGG TAG CTA-3'
Cactus Fw	5'- ACC GGA TTG TGA CAT CAT GG-3'
Cactus Rv	5'- TTT TGA TGG CAG GCA AG-3'

Para a PCR foi utilizado o kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. As condições da PCR foram: 10 minutos a 95°C / 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C / 1 ciclo α a 16°C. O DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed.

3.8 PCR em tempo real (qPCR)

Foi realizada qPCR em tempo real, utilizando para as reações a sonda de fluorescência SyberGreen (Power SybrGreen PCR Master Mix, Applied Biosystems) no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems). Os ciclos usados na qPCR foram: 2 minutos a 50°C / 10 minutos a 95°C / 35 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 63°C. Para a normalização dos genes foi utilizado o gene constitutivo RP49.

A análise da expressão dos genes foi feita pelo método do Delta Delta CT ($\Delta\Delta CT$) de acordo com Livak e Schmittgen.⁽⁹³⁾

3.9 RNA de interferência

Foi sintetizado RNA de dupla fita (dsRNA) do gene Cactus, utilizando como template fragmentos de Cactus amplificados por PCR utilizando o kit Gotaq G3 cujos ciclos de amplificação foram: 1x 4 minutos a 94°C / 35x de 94°C por 30 segundos - 55° por 45 segundos - 72°C por 2 minutos / 1x 72°C por 10 minutos / 4°C α . O amplicon de 300 pb foi purificado utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System seguindo as instruções do fabricante

Para síntese do dsCactus foi utilizado o kit RNAi MEGAScript T7 (Ambion)®, seguindo as instruções do fabricante. Para o controle foi utilizado dsB3M, a partir de um gene endógeno de camundongo.

Fêmeas de 2 a 3 dias de idade, anestesiadas com frio, receberam injeção intratorácica de 69 nL de dsCactus (grupo silenciado) e dsB3M (grupo controle), usando nanoinjetor (Nanoject, Drummond) e capilares de vidro. As fêmeas injetadas foram mantidas a 27°C e 70-80% de umidade relativa, alimentadas com solução açucarada 10% *ad libitum*. Após 24 horas do silenciamento, as fêmeas foram alimentadas com sangue infectado com *P. vivax*. Para avaliar o efeito do silenciamento com dsCactus sobre a expressão de genes de imunidade, após 12h, 24h, 36h, 48h e 3d da infecção um pool de 5 mosquitos de cada tratamento foi conservado em Reagente Trizol, macerado e armazenado a -80°C para posterior extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR.

Tabela 2. Primers usados para amplificação de DNA por qPCR

Gene	Sequência
RP49 Fw	5'-AGG GAC AGT ACC TGA TGC CCA ACA T-3'
RP49 Rv	5'-CGC ACG TTG TGG ACG AGG AAC TTC T-3'
Cecropina Fw	5'TGA ACT TCA CGA AAC TCT TCA TTGT-3'
Cecropina Rv	5'- AAC ACA TTC CGA CCC AGC TTT TCAA-3'
Cactus Fw	5'- ACC GGA TTG TGA CAT CAT GG-3'
Cactus Rv	5'- TTT TGA TGG CAG GCA AG-3'

Diariamente, durante cinco dias posteriores à microinjeção, um *pool* de 5 mosquitos fêmeas de cada tratamento foi conservado no Reagente Trizol, macerado e armazenado a -80° para posterior extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR, para avaliar a eficiência do silenciamento do gene Cactus.

Para avaliar o efeito do silenciamento do gene Cactus sobre a infecção dos mosquitos, cinco dias após a infecção, o intestino médio de 30 fêmeas tratadas com dsCactus e não silenciadas foi dissecado, corado com mercúrio cromo 2% e os oocistos foram contados.

3.10 Análise dos dados

Foi calculada a taxa de infecção dividindo o número de mosquitos infectados (os que possuem pelo menos um ou mais oocistos) pelo número de mosquitos dissecados, multiplicado por 100. Para comparar a quantidade de oocistos entre o grupo silenciado e o controle foi utilizado o teste Mann-Whitney.

4 Resultados

4.1 Expressão de Cactus em *Anopheles aquasalis* infectados por *Plasmodium vivax*

Para avaliar a expressão do gene Cactus, foram realizadas três infecções experimentais com sangue de pacientes com parasitemia de duas cruzes de *P. vivax* e gametocitemia que variou entre 1 e 19 gametócitos/300 campos (Tabela 1). A taxa de infecção nos mosquitos variou entre 50 e 100% e a média de oocistos em 27,8 e 130,74% (Tabela 1).

Tabela 3. Número de gametócitos, taxa de infecção e média de oocistos desenvolvidos em *Anopheles aquasalis* infectados por *Plasmodium vivax*.

Infecção Experimental	Gametocitemia	Taxa de infecção	Média de oocistos
1	19	100%	130,74
2	1	50%	86,44
3	8	95,83%	27,8

Por PCR convencional, utilizando como iniciador o gene RP49 para verificar a qualidade das amostras, foi obtido um amplicon de 100 pb (Figura 8a). O amplicon obtido após PCR usando o gene Pv18s foi de 100 pb (Figura.8b).

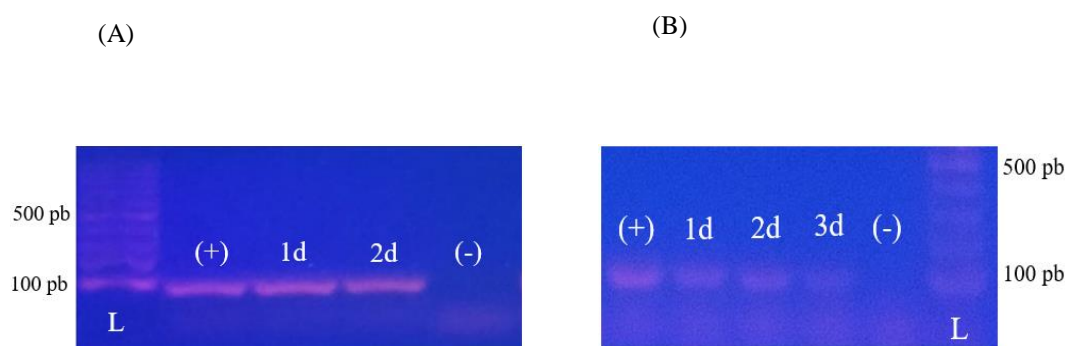


Figura 8. Amplificação de DNA de mosquitos infectados e não infectados usando primer A- da Proteína ribossomal 49 (RP49) e B- Proteína ribossomal de *P. vivax*. L = marcador de corrida, pb = pares de base, (+) controle positivo, (-) controle negativo, d = dias após infecção.

A expressão relativa do gene Cactus foi avaliada através de qPCR entre os grupos infectado e não infectado. A expressão de Cactus foi significativamente maior no grupo infectado no segundo dia após a infecção ($p = 0,0004$) (Fig. 9), com um aumento de 7,97 vezes. Nos dias 3 e 4 após a infecção os níveis de expressão de Cactus são semelhantes aos do controle.

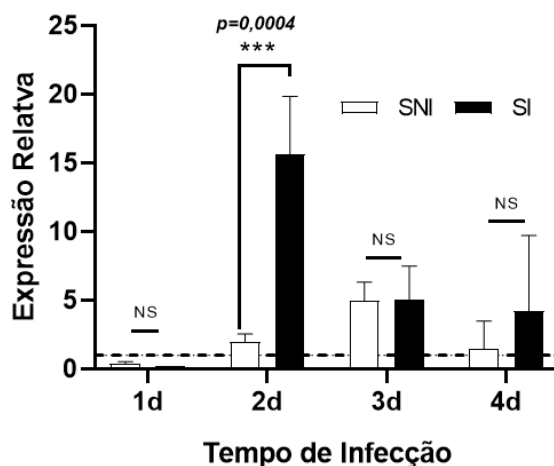


Figura 9. Expressão do gene Cactus em *An. aquasalis* infectados com *P. vivax* (SI) e não infectados (SNI), em diferentes tempos após a infecção. SNI – Sangue não infectado, SI – Sangue Infectado com *P. vivax*, d – dias após infecção, linha pontilhada – nível basal de expressão do gene em *An. aquasalis* alimentados com açúcar, NS = diferença não significativa. *** $p < 0.001$.

4.2 Silenciamento do gene Cactus

Para o silenciamento do gene Cactus um grupo de mosquitos foi microinjetado no tórax com dsCactus, e o grupo controle foi injetado com dsB3M. A expressão de Cactus diminuiu durante os dois (2) primeiros dias após o silenciamento (Figura 10). Esse resultado indica que para avaliar a função de Cactus no desenvolvimento da infecção por *P. vivax* em *An. aquasalis* é necessário infectar os mosquitos 1 dia após a o silenciamento de Cactus.

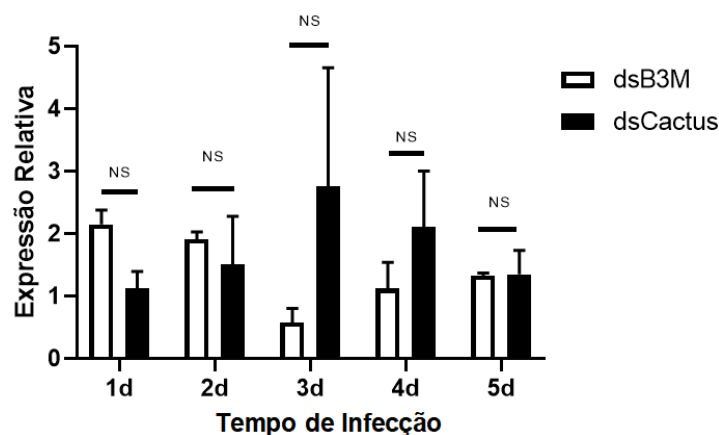


Figura10. A: Expressão de Cactus em *An. aquasalis* injetados intratoracicamente com RNA dupla fita dos genes B3M (dsB3M) e Cactus (dsCactus). d = dias após microinjeção, NS = diferença não significativa.

4.3 Efeito do silenciamento de Cactus na infecção em mosquitos *An. aquasalis* infectados por *P. vivax*

Para avaliar o efeito do silenciamento sobre a infecção em *Anopheles aquasalis*, foi determinada a taxa de infecção e média de oocistos em mosquitos microinjetados intratoraxicamente com dsB3M como controle e dsCactus. Cada grupo microinjetado foi alimentado com sangue infectado com *P. vivax* um dia após o silenciamento de Cactus. No grupo dsB3M (controle) a taxa de infecção foi 55% (11/20) e a média de oocistos foi de 3,9; no grupo dsCactus a taxa de infecção foi 65.79% (25/38) e a média de oocistos foi de 5 (Tabela 2).

Tabela 4. Número de gametócitos, taxa de infecção e média de oocistos desenvolvidos em *Anopheles aquasalis* infectados por *Plasmodium vivax* e microinjetados com os genes dsB3M e dsCactus.

Tratamento	Gametocitemia	N	% Taxa de infecção	Média de oocistos
dsB3M	9	20	55	3,9
dsCactus	9	38	65,79	5

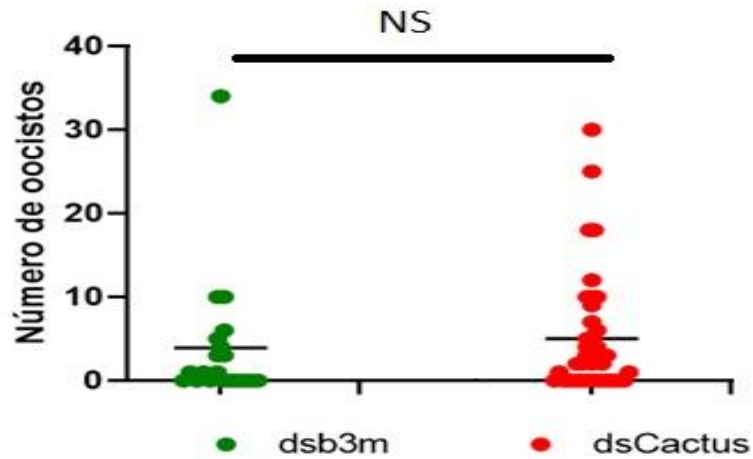


Figura 11. Número de oocistos de *P. vivax* em intestino médio de mosquitos com silenciamento do gene Cactus (dsCactus). dsB3M = controle, NS = diferença não significativa.

4.4 Expressão de genes após silenciamento de dsCactus

A expressão relativa do gene Cecropina foi avaliada em mosquitos infectados e com silenciamento do gene Cactus. Os níveis de Cecropina são muito baixos nas primeiras 24 horas após a infecção, aumentando após as 36 horas tanto no grupo infectado quanto no grupo não infectado, entretanto, a diferença entre os dois grupos não foi significativa (Figura 12A). No grupo tratado com dsCactus a expressão de Cecropina foi maior após 48 horas da infecção, embora não foi significativamente maior que o grupo controle (Figura 12B).

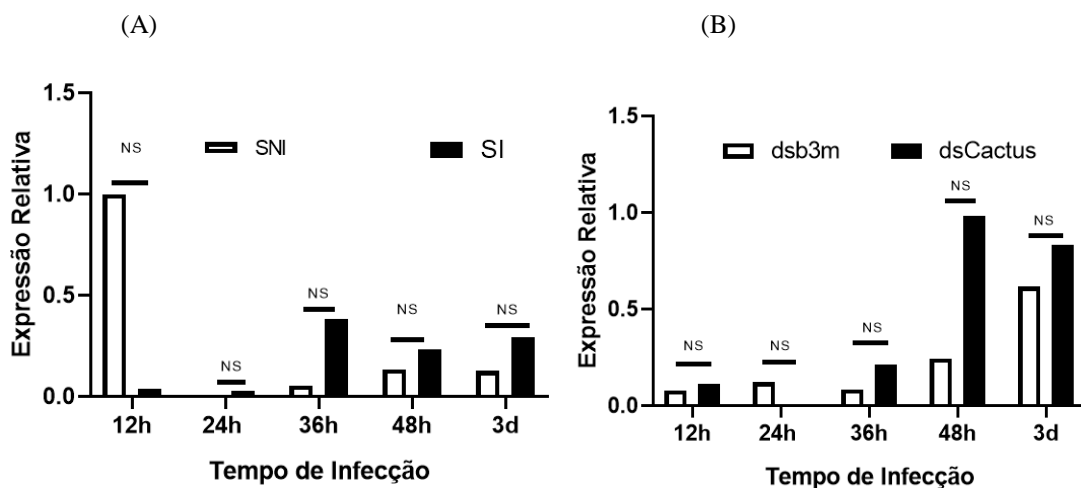


Figura 12: Expressão de Cecropina em *An. aquasalis*. A- Mosquitos alimentados com sangue infectado (SI) e não infectado (SNI). B- Mosquitos injetados

intratoracicamente com RNA dupla fita dos genes B3M (dsB3M) e Cactus (dsCactus) e alimentados com sangue infectado. h = horas, d = dias após infecção, NS = diferença não significativa.

O gene Clip não foi expressado nos grupos controle (SNI) e grupo infectado nas primeiras 24 horas após a alimentação. Sua expressão é observada após 36 horas da alimentação sanguínea, nos dois grupos, porém, não houve diferença significativa entre eles. O aumento de expressão entre 36 e 48 horas foi 2 vezes maior no grupo infectado, entretanto a diferença não foi significativa. Três dias após a alimentação há diminuição nos níveis de expressão de Clip, ficando muito semelhantes entre os dois tratamentos (Fig. 13A). Mesmo não significativa, nas amostras de 48 horas a expressão no grupo infectado foi 2,6 vezes maior que no grupo não infectado (Figura 13A). No grupo tratado com dsRNA o gene Clip foi expressado a partir de 24 horas após a alimentação. A expressão maior de Clip foi no grupo dsB3M a partir de 36 horas após a infecção, com um aumento da expressão 3,7 vezes maior em 3 dias, entretanto não houve diferença significativa entre os dois tratamentos em nenhum dos tempos analisados (Figura 13 B).

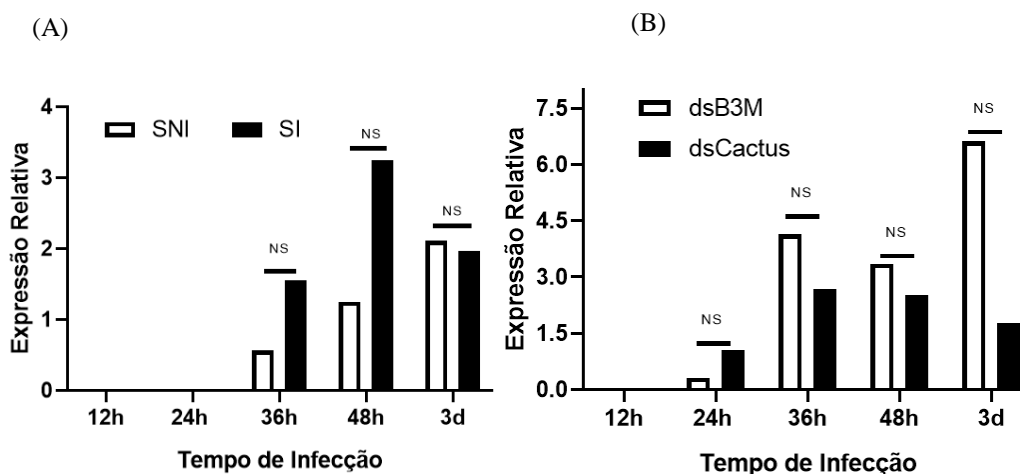


Fig. 13: Expressão de Clip em *An. aquasalis*. A- Mosquitos alimentados com sangue infectado (SI) e não infectado (SNI). B- Mosquitos injetados intratoracicamente com RNA dupla fita dos genes B3M (dsB3M) e Cactus (dsCactus) e alimentados com sangue infectado. h = horas, d = dias após infecção, NS = diferença não significativa.

5 Discussão

A via Toll é uma via altamente conservada no reino animal, mesmo apesar de que diferentemente dos vertebrados, esta via desempenha função dupla tanto no desenvolvimento embrionário quanto na defesa imunológica.⁽⁹⁴⁾ Durante uma infecção, a via Toll é ativada pela ligação entre PAMPs de microorganismos invasores e PRRs (PGRPs ou GNBPs) do próprio organismo, desencadeando uma cascata de serino proteases que cliva a proteína Spatzle.⁽⁴²⁾

Neste trabalho avaliamos a expressão relativa do gene *Cactus*, supressor da via Toll, em *Anopheles aquasalis* infectado por *Plasmodium vivax*.^(95,96) O gene *Cactus* aumentou seus níveis de expressão no segundo dia após a infecção, quando o oocineto está invadindo as células do epitélio intestinal, indicando que a via Toll pode estar atuando no controle do oocineto no nosso modelo. Provavelmente no primeiro dia da infecção, outras vias imunes sejam ativadas na resposta de *An. aquasalis* contra *P. vivax*. Bahia et al.^(89,97) demonstraram que a via JAK/STAT e o fator de transcrição GATA foram ativados em *An. aquasalis* após 24 e 36 horas da infecção com *P. vivax*, e o silenciamento dos genes STAT e GATA causou um aumento na taxa de infecção e no número de oocistos por intestino.

Cactus também tem se mostrado ativado na resposta de *Anopheles gambiae* à infecção pelo fungo *Beauveria bassiana*, na fase inicial do desafio.⁽⁷⁸⁾

Frolet et al.⁽⁸²⁾ não encontraram um efeito no silenciamento de *Cactus* em *Anopheles gambiae* infectado por *Plasmodium berghei*, mas Garver et al.⁽⁶⁹⁾ compararam o efeito do silenciamento de *Cactus* em *Anopheles gambiae* infectado por *Plasmodium berghei* e *Plasmodium falciparum*. Eles observaram que na infecção contra o parasita murino *Plasmodium berghei* a infecção foi menor, a hipótese para essa diferença é o fato de que *Anopheles gambiae* não é um vetor natural de *P. berghei*, e por isso o número de oocisto tenha sido menor comparado a uma infecção que acontece na natureza, como ocorre com *P. falciparum*.

Não foi observada diferença significativa na taxa de infecção e no número médio de oocistos entre o grupo silenciado e o controle, apesar de observarmos em nossos resultados, uma tendência de aumento no grupo silenciado com ds*Cactus*. Uma das explicações pode ser que a porcentagem de silenciamento foi relativamente baixa, 50%. Seria esperado que o grupo silenciado apresentasse uma taxa de infecção e média de

oocistos inferiores aos grupos alimentados com sangue infectado e microinjetado com dsB3M, uma vez que silenciamento do gene supressor da via causa aumento na expressão dos genes efetores e, por tanto, maior controle da infecção.

A função de um gene antagonista no organismo visa alcançar o equilíbrio da homeostase. Portanto, mesmo que peptídeos antimicrobianos atuem diretamente na morte do parasito, ao mesmo tempo, esses AMPs podem causar apoptose das células adjacentes. Assim como ocorre com ROS e NOS, que são moléculas altamente reativas e podem causar lesão nas células do próprio organismo.⁽⁹⁸⁾

Os insetos possuem múltiplas enzimas serino proteases com domínio Clip, cada uma com funções em diferentes processos fisiológicos (digestão, defesa e desenvolvimento) em diferentes tecidos.⁽⁹⁹⁾ Na resposta imune, essas serino proteases estão envolvidas no combate a bactérias, na ativação de Profenoloxidasas (PPO) ou moléculas semelhantes a citocinas,⁽⁹⁵⁾ na regulação de processos de encapsulação melanotica de parasitos e síntese de AMPs.⁽¹⁰⁰⁾

Em nosso experimento, a expressão de Clip foi induzida entre 36 e 48 horas após infecção com *P. vivax*. Possivelmente, esse gene participa no controle do parasito durante a invasão do epitélio intestinal e formação do oocisto. Nos mosquitos com silenciamento do gene Cactus, a indução de Clip começou mais cedo, a partir de 24 horas, mas seus níveis de expressão foram inferiores aos do grupo controle. Entretanto, os níveis de expressão de Clip nos grupos silenciado com dsCactus e alimentado com sangue infectado (SI) foram semelhantes. Esses resultados poderiam estar indicando que a ativação do Clip, no nosso modelo, não é dependente de Cactus.

Vols et al.⁽⁵⁷⁾ observaram um aumento na expressão de CLIPB14 nas células do intestino de *Anopheles gambiae* infectado por *Plasmodium berghei* a partir de 27 horas, com um pico de expressão em 30 horas, e mesmo que em níveis menores, por CLIPB15 com uma ativação entre 24 e 27 horas. Essas serino proteases investigadas por Vols são secretadas por hemócitos e são ativadas por receptores de reconhecimento padrão. Christophides de colaboradores.⁽⁵⁸⁾

Da mesma forma que Clip, Cecropina não é expressada nas primeiras 24 horas após infecção, e é induzida entre 36 horas e 3 dias após a infecção, porém, em níveis muito baixos. Quando ocorre o silenciamento de Cactus, os níveis de expressão de Cecropina aumentam 2 vezes entre 48 horas e 3 dias após infecção (Figura.13), não

sendo expressada nas primeiras 24 horas após infecção. De acordo com Bahia et al.(90), a baixa expressão de Cecropina nas primeiras 24 horas após infecção de *An. aquasalis* com *P. vivax*, pode ser uma estratégia para evitar o aumento de bactérias comensais induzidas pelos nutrientes do sangue devido à regulação negativa da produção de espécies reativas (ROS) em resposta à toxicidade do grupo heme.⁽⁹⁸⁾

A indução de Cecropina e Clip nos mesmos tempos após infecção por *P. vivax* pode estar sugerindo que o primeiro gene é induzido quando o segundo é ativado. No período entre 36 horas e 3 dias após infecção o parasito está atravessando as células do tecido do epitélio intestinal e quase alcançando a lamina basal. Provavelmente, a indução de Cecropina e Clip seja importante para a detecção do parasito no tecido.⁽⁹⁰⁾ A não indução de Cecropina e Clip nas primeiras 24 horas após a infecção poderia estar indicando que nesse período outras vias estejam ativadas para controlar a infecção. A via JAK/STAT é ativada de forma transitória durante o início da infecção por *An. aquasalis* infectado por *P. vivax*, diminuindo sua indução após 36 horas da infecção.⁽⁹⁷⁾

Nossos dados sugerem que: a) a via Toll é ativada em *Anopheles aquasalis* infectados por *Plasmodium vivax*, b) os genes Clip e Cecropina são ativados por essa via, c) o gene Cactus modula a expressão do gene Cecropina mas não Clip; entretanto o papel da via no desenvolvimento/controle da infecção no mosquito não ficou muito claro. É necessário realizar experimentos adicionais, silenciamento de Cactus (gene repressor), outros genes efetores e fatores de transcrição para entender o funcionamento da via no modelo *Anopheles aquasalis/Plasmodium vivax*.

6 Conclusões

- A via Toll é induzida na fase inicial da infecção de *Anopheles aquasalis* com *Plasmodium vivax*.

- O gene Cactus foi induzido em *An. aquasalis* infectado por *Plasmodium vivax* entre 3 a 4 dias após a infecção, provavelmente relacionado com os períodos em que ocorre a invasão do parasito nos tecidos do epitélio, indicando que essa via imune pode participar na regulação do oocineto e do oocisto.

- Houve uma tendência de aumento na taxa de infecção e na taxa de oocistos em *Anopheles aquasalis* após o silenciamento de Cactus, embora não fosse significativa.

- O peptídeo antimicrobiano Cecropina teve pico de indução após silenciamento do gene Cactus.

- Clip é ativado na resposta imune em *Anopheles aquasalis* após infecção por *Plasmodium vivax* durante a fase inicial da infecção e não parece estar modulado pelo gene Cactus.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO C. World malaria report 2018. 2018;210.
2. World Health Organization. World Malaria Report 2015. [Internet]. World Health Organization; 2016 [citado 14 de outubro de 2018]. Disponível em: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4778804>
3. Portal Saúde - Malária [Internet]. [citado 2 de março de 2019]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria#epidemiologia>
4. OPAS. Report on the Situation of Malaria in the Americas – 2017. 2017;10.
5. MSV. Situação epidemiológica da malária na região Amazônica, período de 2016 a 2018. [Internet]. Tableau Software. 2018 [citado 13 de dezembro de 2018]. Disponível em: https://public.tableau.com/views/MiniSivep1518_2018_12_04/casos_notificados_2018_regio_Amaznica?%3Aembed=y&%3AshowVizHome=no&%3Adisplay_count=y&%3Adisplay_static_image=y&%3AbootstrapWhenNotified=true
6. MSV. Situação epidemiológica da malária na região Extra-Amazônica, período de 2017 e 2018. [Internet]. Tableau Software. 2018 [citado 13 de dezembro de 2018]. Disponível em: https://public.tableau.com/views/Boletim_regiaoExtra-Amazonica_2018_20_09_2018/SrieHistorica?%3Aembed=y&%3AshowVizHome=no&%3Adisplay_count=y&%3Adisplay_static_image=y&%3AbootstrapWhenNotified=true
7. Alvarenga DAM, Culleton R, de Pina-Costa A, Rodrigues DF, Bianco C, Silva S, et al. An assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Sci Rep*. 2018;8(1).
8. Ramasamy R. Zoonotic Malaria – Global Overview and Research and Policy Needs. *Front Public Health*. 2014;2.
9. Singh B, Daneshvar C. Human Infections and Detection of Plasmodium knowlesi. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(2):165–84.
10. Alvarenga DAM, Culleton R, de Pina-Costa A, Rodrigues DF, Bianco C, Silva S, et al. An assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Sci Rep*. 2018;8(1)
11. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health*. 2017;5(10):e1038–46.
12. Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. *The Lancet*. 2018;391(10130):1608–21.
13. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *The Lancet*. 2014;383(9918):723–35.
14. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9(1):115.

15. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016;167(3):610–24.
16. Siqueira AM, Mesones-Lapouble O, Marchesini P, Sampaio V de S, Brasil P, Tauil PL, et al. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(6 Suppl):87–96.
17. Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J*. 2012;11(1):12.
18. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda MV, et al. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(10):1611–4.
19. Daher A, Silva JCAL, Stevens A, Marchesini P, Fontes CJ, Ter Kuile FO, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* malaria recurrence in Brazil. *Malar J*. 2019;18(1):18.
20. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(4):579–92.
21. Yman V, Wandell G, Mutemi DD, Miglar A, Asghar M, Hammar U, et al. Persistent transmission of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* species in an area of declining *Plasmodium falciparum* transmission in eastern Tanzania. Marks F, organizador. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(5):e0007414.
22. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium ovale*: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(3):570.
23. Chapman RF. *The insects: structure and function*. 4th ed. Cambridge, UK ; New York, NY: Cambridge University Press; 1998. 770 p.
24. Consoli RAGB, Oliveira RL de. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ; 1994. 225 p.
25. Harbach. *Mosquito Taxonomic Inventory* [Internet]. 2018 [citado 17 de dezembro de 2018]. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>
26. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*. 2012;5(1):69.
27. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors*. 2010;3(1):72.
28. Rios-Velásquez CM, Martins-Campos KM, Simões RC, Izzo T, dos Santos EV, Pessoa FA, et al. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. *Malar J*. 2013;12(1):460.
29. Marcondes CB. *Arthropod Borne Diseases* [Internet]. 2017

30. Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63(1):195–221.
31. Pimenta PF, Touray M, Miller L. The Journey of Malaria Sporozoites in the Mosquito Salivary Gland. *J Eukaryot Microbiol.* 1994;41(6):608–24.
32. Baton LA, Ranford-Cartwright LC. Spreading the seeds of million-murdering death. *Trends Parasitol.* 2005;21(12):573–80.
33. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primer.* 2017;3:17050.
34. Siva-Jothy MT, Moret Y, Rolff J. Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. In: *Advances in Insect Physiology.* Elsevier; 2005. p. 1–48.
35. Bartholomay LC, Michel K. Mosquito Immunobiology: The Intersection of Vector Health and Vector Competence. *Annu Rev Entomol.* 2018;63(1):145–67.
36. Wilson RJ. P. J. Gullan and P. S. Cranston: The insects: an outline of entomology (4th edition): Wiley-Blackwell, Oxford, 2010, Hardback. *Insect Conserv.* 2010;14(6):745–6.
37. Baia-da-Silva DC, Alvarez LCS, Lizcano OV, Costa FTM, Lopes SCP, Orfanó AS, et al. The role of the peritrophic matrix and red blood cell concentration in *Plasmodium vivax* infection of *Anopheles aquasalis*. *Parasit Vectors.* 2018;11(1).
38. Browne N, Heelan M, Kavanagh K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence.* 2013;4(7):597–603.
39. King JG, Hillyer JF. Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *BMC Biol.* 2013;11(1):55.
40. Uwe, Muller, Vogel P, Alber G, Schaub GA. The Innate Immune System of Mammals and Insects. In: Egesten A, Schmidt A, Herwald H, organizadores. *Contributions to Microbiology.* 2008. p. 21–44
41. Christensen BM, Li J, Chen C-C, Nappi AJ. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Parasitol.* 2005;21(4):192–9.
42. Lemaitre B, Hoffmann J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.* 2007;25(1):697–743.
43. Hillyer JF. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol.* 2016;58:102–18.
44. Schmid-Hempel P. Evolutionary Ecology of Insect Immune Defenses. *Annu Rev Entomol.* 2005;50(1):529–51.
45. Barillas-Mury C, Wizel B, Soo Han Y. Mosquito immune responses and malaria transmission: Lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000;30(6):429–42.
46. Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev.* 2004;198(1):127–48.

47. Pal S, Wu L. Pattern recognition receptors in the fly: Lessons we can learn from the *Drosophila melanogaster* immune system. *Fly (Austin)*. 2009;3(2):121–9.
48. Hillyer JF. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol*. 2016;58:102–18.
49. Werner T, Liu G, Kang D, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13772–7.
50. Patel S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2017;45(6):579–91.
51. Gorman MJ, Paskewitz SM. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001;31(3):257–62.
52. Kanost MR, Jiang H, Yu X-Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev*. 2004;198(1):97–105.
53. Ross J, Jiang H, Kanost MR, Wang Y. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene*. 2003;304:117–31.
54. Jang I-H, Nam H-J, Lee W-J. CLIP-domain serine proteases in *Drosophila* innate immunity. *BMB Rep*. 2008;41(2):102–7.
55. Kanost MR, Jiang H. Clip-domain serine proteases as immune factors in insect hemolymph. *Curr Opin Insect Sci*. 2015;11:47–55.
56. Couto J, Ferrolho J, Domingos A. *Anopheles gambiae* and *A. stephensi* Immune Response during *Plasmodium berghei* Infection Uncovered by Sialotranscriptomic Analysis. 2^o ed 2016;58.
57. Volz J, Osta MA, Kafatos FC, Müller H-M. The Roles of Two Clip Domain Serine Proteases in Innate Immune Responses of the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem*. 2005;280(48):40161–8.
58. Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. Immunity-Related Genes and Gene Families in *Anopheles gambiae*. *Science*. 2002;298(5591):159–65.
59. Yassine H, Osta MA. *Anopheles gambiae* innate immunity. *Cell Microbiol*. 2010;12(1):1–9.
60. Michel K, Kafatos FC. Mosquito immunity against *Plasmodium*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005;35(7):677–89.
61. Lemaitre B, Hoffmann J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 2007;25(1):697–743.
62. Cirimotich CM, Dong Y, Garver LS, Sim S, Dimopoulos G. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Dev Comp Immunol*. 2010;34(4):387–95.
63. Kleino A, Silverman N. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Dev Comp Immunol*. 2014;42(1):25–35.

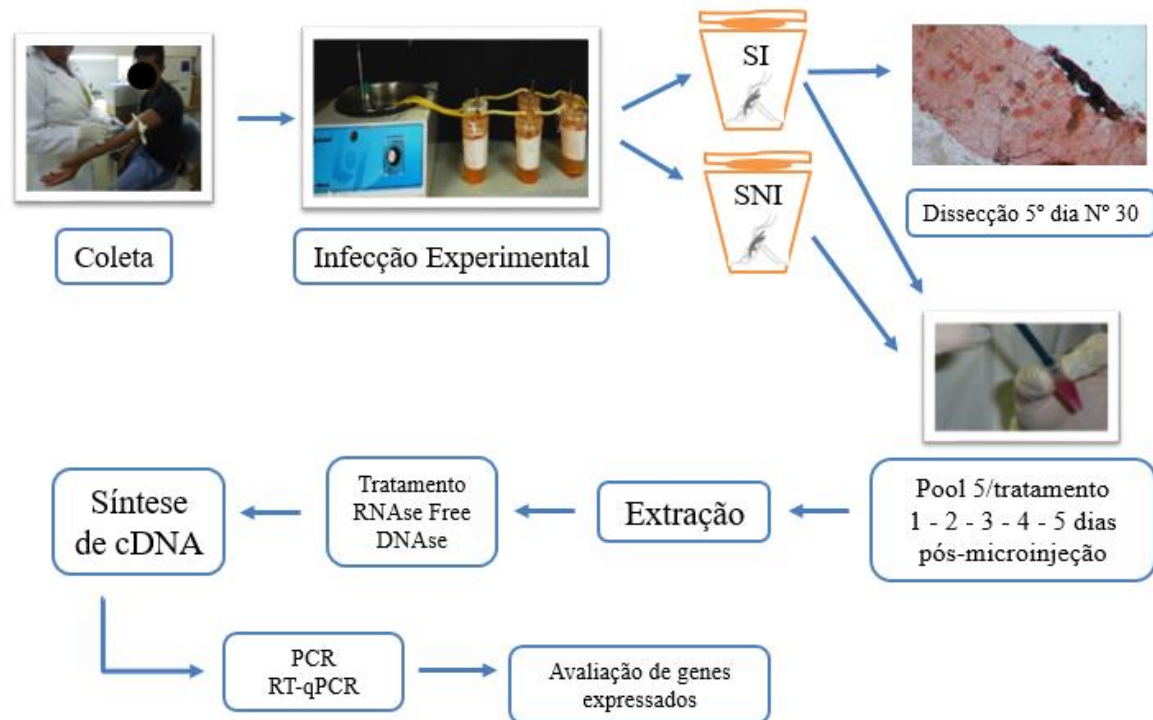
64. Zakovic S, Levashina EA. NF- κ B-Like Signaling Pathway REL2 in Immune Defenses of the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:258.
65. Garver LS, Bahia AC, Das S, Souza-Neto JA, Shiao J, Dong Y, et al. Anopheles Imd Pathway Factors and Effectors in Infection Intensity-Dependent Anti-Plasmodium Action. Schneider DS, organizador. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002737.
66. Khan MB, Liew JWK, Leong CS, Lau Y-L. Role of NF- κ B factor Rel2 during *Plasmodium falciparum* and bacterial infection in *Anopheles dirus*. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):525.
67. Garver LS, Dong Y, Dimopoulos G. Caspar Controls Resistance to *Plasmodium falciparum* in Diverse Anopheline Species. Ribeiro JMC, organizador. *PLoS Pathog*. 2009;5(3):e1000335.
68. Clayton AM, Cirimotich CM, Dong Y, Dimopoulos G. Caudal is a negative regulator of the Anopheles IMD Pathway that controls resistance to *Plasmodium falciparum* infection. *Dev Comp Immunol*. 2013;39(4):323–32.
69. Garver LS, Dong Y, Dimopoulos G. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. *PLoS Pathog*. 2009;5(3).
70. Clayton AM, Cirimotich CM, Dong Y, Dimopoulos G. Caudal is a negative regulator of the Anopheles IMD Pathway that controls resistance to *Plasmodium falciparum* infection. *Dev Comp Immunol*. 2013;39(4):323–32.
71. Imler J-L. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *J Leukoc Biol*. 2003;75(1):18–26.
72. Halfon MS, Keshishian H. The Toll pathway is required in the epidermis for muscle development in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol*. 1998;199(1):164–74.
73. Gobert V, Gottar M, Matskevich AA, Rutschmann S, Royet J, Belvin M, et al. Dual Activation of the *Drosophila* Toll Pathway by Two Pattern Recognition Receptors. *Science*. 2003;302(5653):2126–30.
74. Alpar L, Bergantiños C, Johnston LA. Spatially Restricted Regulation of Spätzle/Toll Signaling during Cell Competition. *Dev Cell*. 2018;46(6):706-719.e5.
75. Jang I-H, Chosa N, Kim S-H, Nam H-J, Lemaitre B, Ochiai M, et al. A Spätzle-Processing Enzyme Required for Toll Signaling Activation in *Drosophila* Innate Immunity. *Dev Cell*. 2006;10(1):45–55.
76. Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol*. 2001;11(7):304–11.
77. Valanne S, Wang J-H, Ramet M. The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *J Immunol*. 2011;186(2):649–656.
78. Barillas-Muryl C, Charlesworth A, Gross I, Richman A, Hoffmann JA, Kafatos FC. Immune factor Gambifi, a new rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. 1996.15:(17):4961-4701.

79. Rhodes VL, Thomas MB, Michel K. The interplay between dose and immune system activation determines fungal infection outcome in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Dev Comp Immunol*. 2018;85:125–33.
80. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(7).
81. Luna C, Hoa NT, Lin H, Zhang L, Nguyen HLA, Kanzok SM, et al. Expression of immune responsive genes in cell lines from two different Anopheline species. *Insect Mol Biol*. 2006;15(6):721–9.
82. Frolet C, Thoma M, Blandin S, Hoffmann JA, Levashina EA. Boosting NF- κ B-Dependent Basal Immunity of *Anopheles gambiae* Aborts Development of *Plasmodium berghei*. *Immunity*. 2006;25(4):677–85.
83. Qiu P, Pan PC, Govind S. A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Dev Camb Engl*. 1998;125(10):1909–20.
84. Ramirez JL, Garver LS, Brayner FA, Alves LC, Rodrigues J, Molina-Cruz A, et al. The Role of Hemocytes in *Anopheles gambiae* Antiplasmodial Immunity. *J Innate Immun*. 2014;6(2):119–28.
85. Blair CD, Olson KE. Mosquito immune responses to arbovirus infections. *Curr Opin Insect Sci*. 2014;3:22–9.
86. Sen GL, Blau HM. A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J*. 2006;20(9):1293–9.
87. Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J*. 2016;4(7).
88. Ekengren S, Hultmark D. A Family of Turandot-Related Genes in the Humoral Stress Response of *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(4):998–1003.
89. Bahia AC, Kubota MS, Souza-Neto JA, Koerich LB, Barletta AB, Araújo HRC, et al. An *Anopheles aquasalis* GATA factor *Serpent* is required for immunity against *Plasmodium* and bacteria. *Dinglasan RR, organizador. PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(9):e0006785.
90. Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Pinheiro WD, Tadei WP, Secundino NFC, et al. *Anopheles aquasalis* Infected by *Plasmodium vivax* Displays Unique Gene Expression Profiles when Compared to Other Malaria Vectors and Plasmodia. *Rodrigues MM, organizador. PLoS ONE*. 2010;5(3):e9795.
91. Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. *Anopheles gambiae* Immune Responses to Human and Rodent *Plasmodium* Parasite Species. *PLoS Pathog*. 2006;2(6):e52.
92. Da Silva ANM, Dos Santos CCB, Lacerda RNL, Santa Rosa EP, De Souza RTL, Galiza D, et al. Laboratory Colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belém, Pará, Brazil. *J Med Entomol*. 2006;43(1):107–9.
93. Livak and Schmittgen 2001 Analysis of Relative Gene Expression qPCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method Schmittgen.pdf.

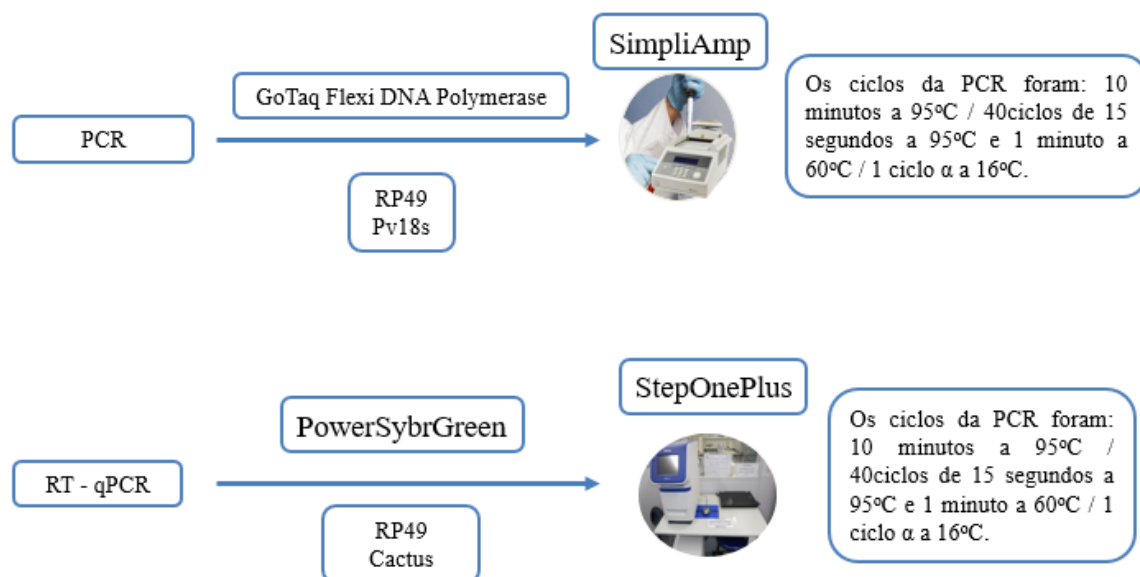
94. Imler J-L, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* julho de 2001;11(7):304–11.
95. Barillas-Mury C, Wikel B, Soo Han Y. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000;30(6):429–42.
96. Cirimotich CM, Dong Y, Garver LS, Sim S, Dimopoulos G. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Dev Comp Immunol.* 2010;34(4):387–95.
97. Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Araújo HRC, Guedes BAM, Orfanó AS, et al. The JAK-STAT Pathway Controls *Plasmodium vivax* Load in Early Stages of *Anopheles aquasalis* Infection. Olson KE, organizador. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(11):e1317.
98. Bahia AC, Oliveira JHM, Kubota MS, Araújo HRC, Lima JBP, Ríos-Velásquez CM, et al. The Role of Reactive Oxygen Species in *Anopheles aquasalis* Response to *Plasmodium vivax* Infection. Moreira LA, organizador. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e57014.
99. Cao X, Gulati M, Jiang H. Serine protease-related proteins in the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2017;88:48–62.
100. Gorman MJ, Paskewitz SM. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001;31(3):257–62.

8 Anexo

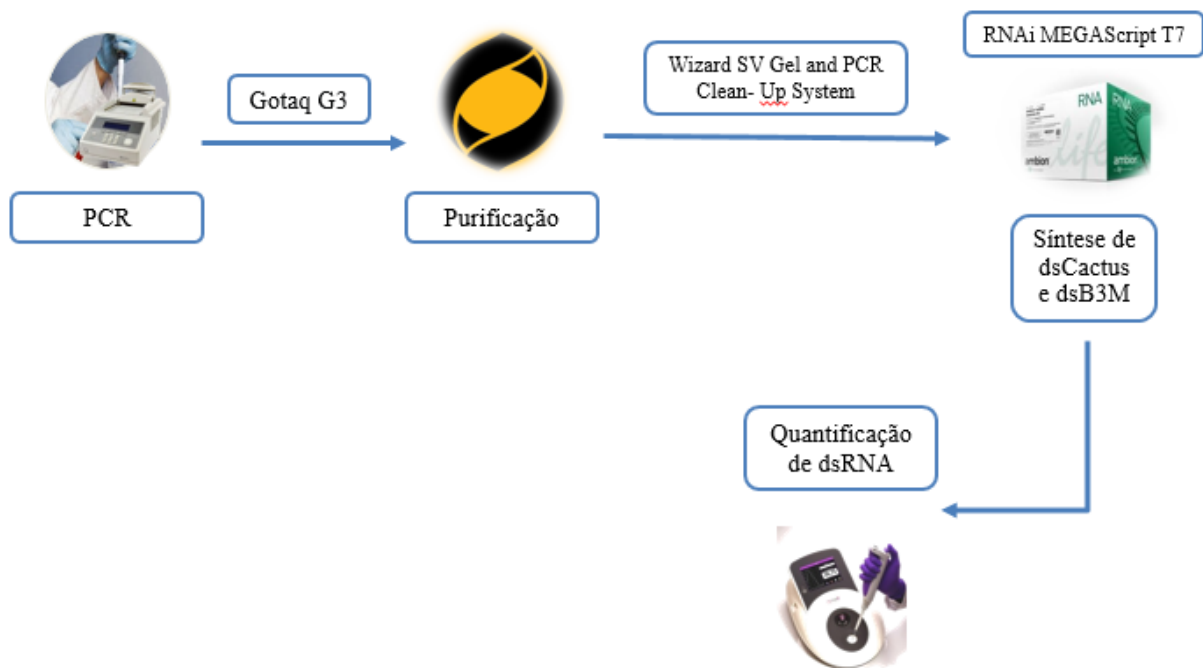
8.1 Infecção Experimental



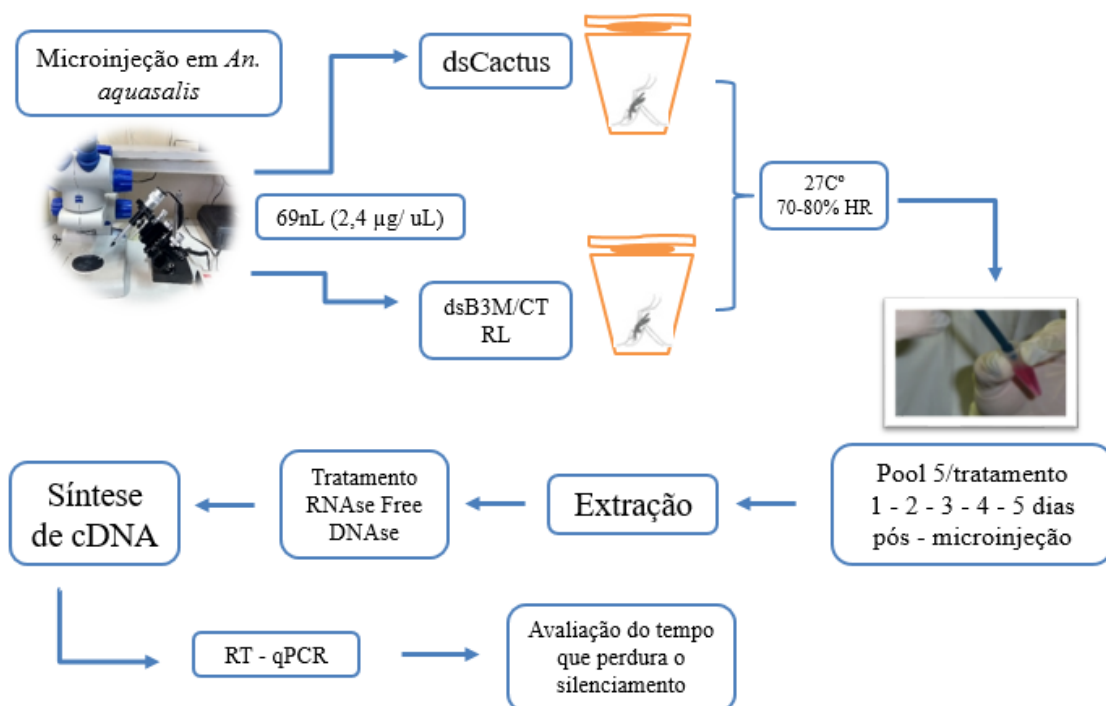
8.2 Avaliação da expressão de genes



8.3 Síntese de cDNA



8.4 Silenciamento com dsCactus



8.5 Avaliação do efeito do silenciamento de Cactus na infecção em *Anopheles aquasalis* infecção por *P. vivax*

