

RESSALVA

Alertamos para ausência das Páginas pré-textuais não incluídas pelo(a) autor(a) no arquivo original.

ODA, L.T.E; RIBOLLA, P.E.M. **Evolução do Receptor do Peptídeo Sexual nos anofelinos Neotropicais.** Instituto de Biociências de Botucatu, 2011. TCC

Evolução do Receptor do Peptídeo Sexual nos anofelinos Neotropicais

Letícia T. E. Oda^{1*}

Paulo E. M. Ribolla¹

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, S/N, CEP 18618-970, Botucatu, São Paulo.

* Oda, L.T.E. (letícia.e.o@gmail.com)

Resumo

A evolução da hematofagia em mosquitos é sem dúvida a adaptação mais importante desse grupo de inseto em termos da miséria humana e dos patógenos transmitidos pelos vetores no mundo de hoje. Por outro lado, os mosquitos têm muito a oferecer à ciência básica, por exemplo, como indicadores da biodiversidade Neotropical. O peptídeo sexual é expresso nas glândulas acessórias dos machos e inseminado nas fêmeas durante a cópula. A ligação deste peptídeo com o seu receptor desencadeia uma vasta resposta comportamental nos mosquitos. Nessa Revisão discutiremos como o estudo do gene codificante do Receptor do Peptídeo Sexual pode auxiliar o estudo das espécies de anofelinos e as possíveis mudanças comportamentais após a alimentação sanguínea, que pode ter influência na epidemiologia da malária.

Família Culicidae

Atualmente são reconhecidas aproximadamente 3.500 espécies de Culicidae. [1] No entanto, estima-se que esse montante represente apenas um quarto ou, no máximo, metade de todas as espécies de mosquitos presentes na natureza. [2,3] A maioria das pesquisas sobre Culicidae envolve os grupos de maior importância médica e veterinária ou as espécies que são consideradas pragas urbana. Os mosquitos que: (1) não são atraídos pelo homem e/ou animais domésticos, (2) raramente ocorrem em elevada densidade porque eles se desenvolvem em habitats representados por coleções hídricas pequenas (fitotelmatas), ou (3) estão restritos aos habitats preservados e distantes da população humana, têm recebido menos atenção e por isso são pouco conhecidos. Paralelamente, muitos estudos taxonômicos envolvendo culicídeos foram direcionados para discriminar espécies e não para estabelecer grupos monofiléticos. São poucos os estudos filogenéticos que estimaram as relações evolutivas supra-específicas e entre grupos hierárquicos superiores. [4,5,6]

A família Culicidae consiste de duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae, e está dividida em 11 tribos – Aedeomyiini, Aedini, Culicini, Culisetini, Ficalbiini, Hodgesiini, Mansoniini, Orthopodomyiini, Sabethini, Toxorhynchitini, e Uranotaeniini. [5,7,8] Os especialistas em Culicidae contam com catálogos de mosquitos que incorporam a história taxonômica das espécies. [9,10,11,12,13] De acordo com os dados disponíveis nos catálogos, nota-se que foram descritas aproximadamente 5.100 espécies das quais 3.500 são aceitas como válidas. [1]

Harbach [4] sugeriu que possam existir de três a cinco vezes mais espécies se considerarmos a presença de complexos de espécies crípticas. Nesse sentido, com base nas descobertas de espécies de *Anopheles*, usando combinação de taxonomia morfológica, citotaxonomia, comportamento e seqüências de DNA, acredita-se que existam aproximadamente 2.000 espécies para serem descobertas. Possivelmente, a maioria das ocorrências será registrada na Região Neotropical.

Gênero *Anopheles*

O gênero *Anopheles* tem recebido mais atenção do que qualquer outro grupo de mosquitos em relação aos aspectos de evolução e classificação [14,15,16,17,18,19]. A sistemática de *Anophelinae* atingiu o apogeu dos estudos morfológicos clássicos na década de 1980 e agora está dominada pelo uso de ferramentas moleculares tanto para o estabelecimento das relações evolutivas entre espécies como entre táxons supra-específicos. A maioria dos estudos filogenéticos de *Anopheles* envolve níveis inferiores de classificação, principalmente grupos, subgrupos e complexos de espécies que participam do ciclo de transmissão da malária humana. Dessa maneira, o impacto na classificação interna de

Anophelinae tem sido pequeno. [20] Vale assinalar, que os resultados de estudos moleculares corroboraram o monofiletismo de grupos definidos por caracteres

morfológicos, como é o caso dos subgêneros *Nyssorhynchus* Blanchard e *Kerteszia* Theobald. [17] A identificação das espécies do subgênero *Nyssorhynchus* é dificultada pela presença de polimorfismos e pela sobreposição dos caracteres morfológicos utilizados para a identificação das espécies.

Marrelli [21] empregaram seqüências de bases nitrogenadas do ITS2 do DNA ribossômico para revisar o status taxonômico de *An. oswaldoi*. Dessa maneira, os autores sugeriram que *An. oswaldoi* compreende complexo de pelo menos quatro espécies crípticas, entre elas *An. konderi* Galvão e Damasceno. As duas espécies são morfológicamente semelhantes, mas podem ser separadas pela forma de porção apical do edeago da genitália masculina. Marrelli [22] observaram a existência de múltiplas seqüências de ITS2 que foram geradas e depositadas no GenBank a partir de indivíduos identificados de maneira, provavelmente, incorreta. Infelizmente, não existem espécimes testemunhas da maioria das seqüências depositada no GenBank. Obviamente, se existissem espécimes testemunhas, seria possível reavaliar se as seqüências foram geradas de indivíduos identificados incorretamente ou se são indicativas da existência de complexos de espécies crípticas

A cópula

Durante a cópula, uma grande quantidade de peptídeos e proteínas é inseminada nas fêmeas pelos machos. Dentre estes produtos, um peptídeo, denominado Peptídeo Sexual (PS), após ser inseminado, se liga a ao Receptor do Peptídeo Sexual (SPR) que promove diversas modificações comportamentais. Dentre estas modificações podemos destacar: indução da postura de ovos, aumento da longevidade, recusa da cópula com outros parceiros, aumento do consumo de alimento e mudança da escolha do alimento. [23] Algumas dessas modificações são dependentes apenas da ligação de SP em SPR, uma vez que experimentos com *Drosophilas* mutantes nulas para o receptor SPRnull

mostram que não há a mudança de comportamento após a cópula. [24] Estes experimentos, realizados principalmente em *Drosophila melanogaster* demonstram o papel que estas proteínas (SP e SPR) podem ter no processo de especiação. Modificações, tanto no peptídeo como em seu receptor, podem representar barreiras no processo reprodutivo, gerando novas espécies.

Em mosquitos, apesar das proteínas não estarem totalmente caracterizadas, este processo de mudança comportamental após a cópula também ocorre. [25,26] Especificamente em mosquitos vetores, esta mudança comportamental pode representar significativas mudanças epidemiológicas na transmissão de patógenos. Tomemos como exemplo, a mudança de preferência alimentar que ocorre em *Drosophila melanogaster* após a cópula. [23] O peptídeo encontrado no macho de *Drosophila* (SP, or Acp70A for Accessory gland protein cytological localization 70A) induz aproximadamente doze respostas na fase pós-cópula, juntamente com a proteína do ducto ejaculatório, localizado citologicamente 99B (DUP99B) elucidando o aumento da ovoposição e redução da receptibilidade.[23,28] (Figura 1.)

Paralelamente, esta mudança em um mosquito vetor, representaria um aumento na probabilidade de obtenção de uma dieta protéica, ou seja, de um repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado.

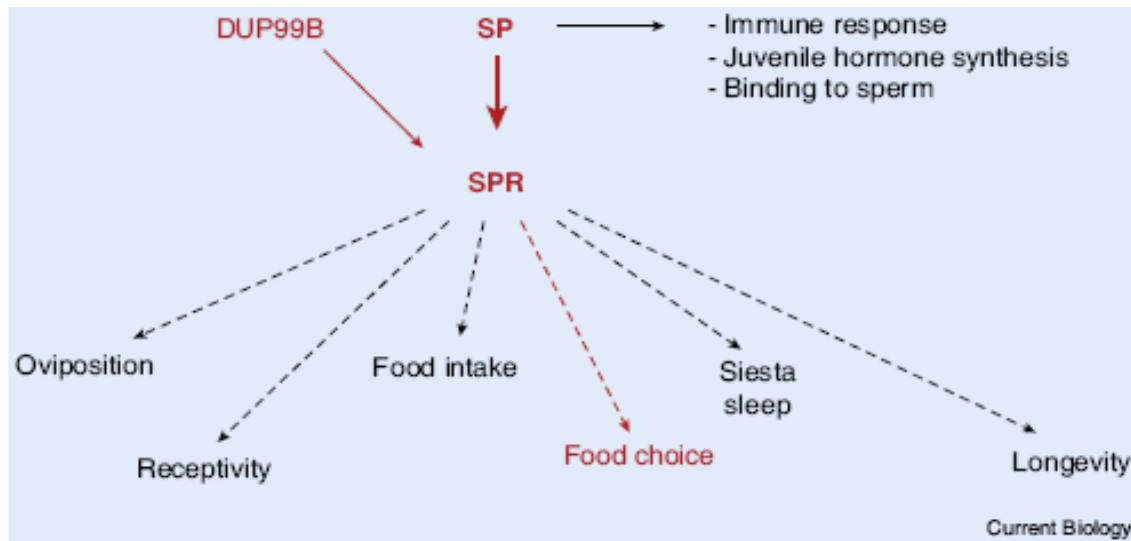


Figura 1. Resposta pós-cópula pelo peptídeo sexual (SP) e DUP99B via receptor do peptídeos sexual (SPR) em *D. melanogaster*. SP induz resposta imune, síntese de hormônios juvenis que se ligam ao esperma [4]. As letras em vermelho o caminho da sinalização da escolha nutricional nas fêmeas de *Drosophila*; as linhas não pontilhadas caracterizam as interações diretas.

Um estudo relacionado com ligantes ancestrais de SPR encontrou o MIP (Myoinhibitory Peptides) como sendo uma segunda família de ligantes conservados para o SPR além do SP. Os MIPs são fortes agonistas de *Drosophila*, *Aedes* de SPR *in vitro*, mas não são capazes de produzir respostas pós-cópula em vivo. [29].

Outros estudos como o da Proteína da Glândula Reprodutora de machos (mRGP) feito com *Aedes aegypti* que identificou várias proteínas derivadas do órgão reprodutor dos machos e que são transferidas para as fêmeas durante a cópula e sua interação nas fêmeas por algum receptor influência assim os comportamentos alterados após a cópula. [25]

Método de discriminar as espécies

Utilizando as ferramentas da biologia molecular atualmente podemos fazer uma análise mais específica para tentar diferenciar espécies umas das outras, ainda mais quando essa é caracterizada como espécie críptica, ou seja, morfologicamente idênticas. Muitos trabalhos utilizam as sequencias de ITS como marcadores moleculares para diferenciar espécies, como o estudo que conseguiu distinguir através de ITS2 as

espécies *Aedes aegypti* de *Aedes albopictus* obtendo diferentes pesos dos amplicons respectivamente. Essa região do ITS2 produziu dois fragmentos distintos com aproximadamente 330pb e 520pb para *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* respectivamente. [29]

Outro estudo também utilizou o marcador ITS2 para diferenciação do gênero *Culex*, o qual possui uma complexa história taxonômica e uma dificuldade de diferenciar as espécies usando apenas os critérios de morfológicos tradicionais. A identificação morfológica desses mosquitos é difícil porque muitas espécies de *Culex* são morfológicamente similares. [30,31] No trabalho foram feitas amplificações da região ITS2 em várias espécies de *Culex*, seguida de clonagem para posterior seqüenciamento e alinhamento para análise. E apesar da heterogeneidade observada pela amplificação da região do ITS2, foi visto que indivíduos da mesma espécie foram agrupados, correlacionados e morfológicamente classificados, mostrando assim que o marcador utilizado é apropriado para diferenciação taxonômica dessa espécie.[32]

Novo marcador

Com todas as informações dadas e pensando no estudo dos anofelinos neotropicais os quais são importantes para a saúde pública, a criação de um marcador originado a partir do receptor do peptídeo sexual iria auxiliar na classificação taxonômica dos mosquitos do gênero *Anopheles*.

Observando a presença desse receptor nas três principais espécies de mosquitos, *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*, um possível alinhamento das sequências desses receptores e a seleção das partes conservadas para o desenho de oligonucleotídeos seria um início do desenvolvimento. Pelas análises das reações de PCR a partir dos oligonucleotídeos e posteriormente sua clonagem e seqüenciamento, a análise das sequências poderia nos fornecer positivos.

A idéia de utilizar o SPR no estudo filogenético de anofelinos vem do fato desse gene poder ter papel importante na especiação, uma vez que ele participa de processos importantes que ocorrem após a cópula. Até o momento, não existem trabalhos utilizando esse marcador.

Referências

- 1 Harbach, R.E., Howard, T.M. (2007) Index of current recognized mosquito species (Díptera: Culicidae). *European Mosquito Bulletin*. 23:1-6
- 2 Belkin, J.N.(1962) The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). Vols I & II. *University of California Press, Berkeley & Los Angeles*.
- 3 Zavortink, T.J.(1990) Classical taxonomy of mosquitoes. A memorial to John N. Belkin. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6:596-99.
- 4 Harbach, R.E. (2007) The culicidae (Díptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny, pp.591-688. In: *Zhang, Z.-Q. & Shear, W.A (Eds), Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. Zootaxa*. 1669:1-766.
- 5 Rerdenbach, K.R., Cook, S., Bertone, M.A., Harbach, R.E.Wiegmann, B.M., Besansky, N.J. (2009) Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Díptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC. Evol. Biol.* 9:298.
- 6 Bourke, B.P., Forster, P.G., Bergo, E.S., Calado, D.C., Sallum, M.A. (2010) Phylogenetic relationships among species of Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera, Culicidae) based on nuclear and mitochondrial gene sequences. *Acta Trop.* 2010 May;114(2):88-96.
- 7 Harbach, R.E., Kitching, I.J.(1998) Phylogeny and classification of the Culicidae (Díptera). *Syst. Entomol.* 23:327-70

- 8 Harbach, R.E. (2007) The culicidae (Díptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny, pp.591-688. In: *Zhang, Z.-Q. & Shear, W.A (Eds), Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. Zootaxa. 1669:1-766*
- 9 Knight, K.L., Stone, A.(1977) A catalog of the mosquitoes of the world (Díptera: Culicidae). *Second edition. Thomas Say Foundation. 6:1-611.*
- 10 Knight, K.L.(1978) Supplement to a catalog of the mosquitoes of the world (Díptera: Culicidae). Thomas Say Foundation, *Entomol. Soc. Am. Vol 6 (Suppl.), 107p.*
- 11 Ward, R.A.(1984) Second supplement to andquot; A catalogo f the mosquitoes of the world (Díptera: Culicidae). *Mosq.Syst. 16:277-270.*
- 12 Ward, R.A. (1992)Third supplement to andquot; “A catalog of the mosquitoes of the world (Díptera: Culicidae)”. *Mosq. Syst. 24:177-230.*
- 13 Guimarães, J.H.(1997)Systematic database of Díptera of the Americas South of the United States (Family Culicidae). São Paulo, *Editores Plêiade/Fapesp. 286pp.*
- 14 Foley, D.H., Bryan, J.H., Yeates, D., Saul, A.(1998) Evolution and systematic of Anopheles: insights from a molecular phylogeny of Australasian mosquitoes. *Mol. Phylogenet Evol. 9:262- 75*
- 15 Krzywinski, J., Wilkerson, R.C., Besansky, N.J. (2001) Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in anophelinae (Díptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. *Mol. Phylogenet. Evol. 18:479-87.*
- 16 Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Wilkerson, R.C. (2000) Phylogeny of Anophelinae (Díptera: Culicidae) based on morphological characters. *Ann. Entomol. Soc. Amer. 93:745-775.*
- 17 Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A., Wilkerson, R.C. (2002)Phylogeny of Anophelinae (Díptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Syst. Entomol. 27:361-82.*

- 18 Collucci, E., Sallum, M.A.M. (2003) Phylogenetic analysis of the subgenus *Kertezia* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological characters. *Insect Syst Evol* 34:361- 72.
- 19 Harbach, R.E., Kitching, I.J.(2005) Reconsideration of anopheline phylogeny (Díptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. *Syst. Biodiversity*. 3:345-74.
- 20 Harbach, R.E. (2004) The classification of genus *Anopheles* (Díptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull. Entomol. Res.* 94:537-53.
- 21 Marrelli, M.T., Malafrente, R.S., Flores-Mendoza, C., Lourenço-de- Oliverira, R., Kloetzel, J.K., Marinotti, O.(1999) Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles aswaldoi* (Díptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 36:679-84.
- 22 Marrelli, M.T., Sallum, M.A., Marinotti, O. (2006) The second internal transcribed space of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy- a critical review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101:817-32.
- 23 Kubli, E. (2010) Sexual Behavior: Dietary Food Switch Induced by Sex. *Current Biology*. Vol. 20, No 11.
- 24 Ribeiro, C., Dickson, B.J.(2010) Sex peptide receptor and neuronal TOR/S6K signalling modulate nutrient balancing in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 20, 1000-1005.
- 25 Sirot, L.K., Poulson, R.L., Mckenna, M.C., Girnary, H., Wolfner, M.F., HarringtonN, L.C. (2008) Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38:176-189.
- 26 Dottorini, T., Nicolaides, L., Ranson, H., Rogers, D.W., Crisant, A., Catteruccia, A. F.(2007) A genome-wide analysis in *Anopheles gambiae* mosquitoes reveals 46 male accessory gland genes, possible modulators of female behavior. *PNA. vol. 104.* no. 41:16215–16220.

27 Kubli, E. (2007) Sexual behaviour: A receptor for sex control in *Drosophila* females. *Curr. Biol.* 18, R210–R212.

28 Kim, Y-J., Bartalska, K., Audsley, N., Yamanaka, N., Yapici, N., Lee, J-Y., Kim, Y-C., Markovic, M., Issac, E., Tanaka, Y., Dickson, B. J. (2010) MIPs are ancestral ligands for the sex peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci* 107(14): 6520–6525.

29 Dhananjeyan, K.J., Paramasivan, R., Tewari, S.C., Rajendran, R., Thenmozhi, V., Victor J. L.S., Venkatsh, A., Tyagi, B.K. (2010) *Tropical Biomedicine* 27(1): 47–53.

30 BRAM, R.A. (1967) Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera, Culicidae). *Proc US Nat Hist Mus* 120: 1-122.

31 Williams, M.R., Savage, H.M. (2009) Identification of *Culex* (*Melanoconion*) species of the United States using female cibarial armature (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 46: 745-752.

32 Vesgueiro, F. T., Silva-Demari, B., Malafronte, S. S., Sallum, M. A. M., Marelli, M. T. (2011) *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(1): 1-8.