

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA  
COMPLEMENTO E ANÁLISE DA MICROBIOTA DE  
*ANOPHELES DARLINGI* EM RESPOSTA À INFECÇÃO COM  
*PLASMODIUM VIVAX***

**Kamila Voges**

**BOTUCATU – SP  
2019**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA  
COMPLEMENTO E ANÁLISE DA MICROBIOTA DE  
*ANOPHELES DARLINGI* EM RESPOSTA À INFECÇÃO COM  
*PLASMODIUM VIVAX***

**Candidata: Kamila Voges**

**Orientador: Profº Dr. Jayme Augusto de Souza-Neto**

**Coorientadores: Dr. George Christophides e Dra. Bianca C. Carlos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para obtenção do título de mestra no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Voges, Kamila.

Caracterização funcional do sistema complemento e análise da microbiota de *Anopheles darlingi* em resposta à infecção com *Plasmodium vivax* / Kamila Voges. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Jayme Augusto de Souza-Neto

Coorientador: George K Christophides

Coorientador: Bianca Cechetto Carlos

Capes: 20202008

1. Mosquitos. 2. Microbiota. 3. *Plasmodium vivax*. 4. Sistema imunológico.

Palavras-chave: *Anopheles darlingi*; Microbiota; *Plasmodium vivax*; Sistema complemento.

## **AGRADECIMENTOS**

Sem sombra de dúvidas, o sentimento que predomina neste momento é o de gratidão! Gostaria de agradecer imensamente a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradeço primeiramente ao Professor Jayme Augusto de Souza Neto da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP de Botucatu, pela orientação, ensinamentos e oportunidade de fazer parte deste grupo, o que possibilitou grande crescimento pessoal e acadêmico.

Agradeço aos membros do Laboratório de Genômica Funcional e Microbiologia de Vetores (Vectomics) por toda ajuda, ensinamentos, amizade, risadas e companheirismo. Em especial ao Bruno, Bianca e Pedro!

Agradeço também a amiga Marcela Possato, e aos amigos que fiz durante o mestrado. Pelo apoio e que fizeram meus dias mais felizes em Botucatu, que possamos levar essa amizade para vida!!

Gostaria de agradecer a minha família em especial a minha mãe, que me ensinou a sempre lutar pelos meus objetivos.

Muito obrigada Prof<sup>o</sup> George K. Christophides, da Imperial College London, pelas discussões e observações feitas.

Agradeço também ao pessoal do laboratório de entomologia do professor Jansen Medeiros, a Maísa Silva Araújo e ao CEPEM.

Ao Seminário Laveran e Deane.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) onde este trabalho foi desenvolvido.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, meu sincero agradecimento a todos que fizeram parte direta ou indiretamente deste trabalho, sou muitíssimo grata a todos vocês!

## Resumo

A malária é uma doença ocasionada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem por meio da picada de mosquitos do gênero *Anopheles*. No Brasil a maior parte dos casos da doença concentra-se na região Amazônica, onde grande parte das infecções é causada por *Plasmodium vivax*, e o *A. darlingi* é o principal vetor. Estudos recentes indicam que a microbiota e que o sistema imune dos mosquitos do gênero *Anopheles*, em particular, componentes do sistema complemento, possuem uma importante função na determinação da competência vetorial, podendo modular o desenvolvimento do parasita no mosquito. Apesar da importância epidemiológica de *A. darlingi*, pouco se sabe a cerca da composição de sua microbiota intestinal, e sobre as interações moleculares deste vetor com *P. vivax*. Neste cenário, temos como principais objetivos: 1) Avaliar o papel de *LRIMI* (*Leucine-rich repeat protein 1*), um dos genes do complemento, na interface *A. darlingi*-*P. vivax*, e 2) Averiguar determinados aspectos da interação entre microbiota- *A. darlingi*- *P. vivax*. Quanto às análises de *LRIMI*, as topologias das árvores filogenéticas mostram maior relação filogenética entre *A. darlingi* e *A. albimanus*, apresentando-os como táxons irmãos. Para a realização dos ensaios funcionais, sintetizamos RNA dupla-fita com base na sequência codificadora de *LRIMI* de *A. darlingi* e microinjetamos no tórax de fêmeas desta espécie, as quais foram posteriormente submetidas a uma infecção por *P. vivax*. Quanto aos ensaios funcionais, nossos resultados apresentaram níveis de oocistos e prevalência similares entre o grupo teste e controle, não havendo diferenças estatisticamente significativas em todas as réplicas analisadas. Deste modo, com os dados obtidos até o momento, é necessário considerar a hipótese de que *LRIMI* não desempenhe um papel na defesa anti *P. vivax* em *A. darlingi*. Neste trabalho, nós também analisamos a composição da microbiota intestinal de mosquitos *A. darlingi* infectados com *P. vivax*, por meio de sequenciamento em larga escala da região hipervariável V4 do gene 16S rRNA. As classes bacterianas mais abundantes observadas em nossas amostras foram: Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, e Flavobacteria. Quanto ao nível taxonômico de família, Enterobacteriaceae foi observada em maior abundância nos mosquitos apresentando baixa infecção com *P. vivax*, sugerindo que esta família possa antagonizar o parasita. Ao passo que, Flavobacteriaceae foi obtida em maior proporção nos mosquitos que apresentaram alta infecção com *P. vivax*. Isso sugere que esta família, de alguma maneira, possa favorecer o parasita, e aumentar sua carga nos mosquitos. Diante disso, uma vez que na literatura trabalhos sobre a resposta imune de anophelinos brasileiros (especialmente *A. darlingi*) são escassos, dados sobre LRIM1, tais quais análises funcionais e filogenia, proveem informações que podem impulsionar outros estudos a respeito desta proteína, bem como de outros genes do sistema imune. Ademais, nossos resultados corroboram estudos anteriores em anophelinos, indicando que as bactérias associadas ao intestino de *A. darlingi* podem desempenhar papel importante na infecção e resposta imune ao parasito.

## Abstract

Malaria is a disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and transmitted to humans through the bite of mosquitoes of the genus *Anopheles*. In Brazil, most cases of the disease are concentrated in the Amazon region, where most of the infections are caused by *Plasmodium vivax*, and *A. darlingi* is the main vector. Recent studies indicate that the microbiota and the immune system of *Anopheles* mosquitoes, in particular components of the complement system, play an important role in the determination of vector competence and can modulate the development of the parasite in the mosquito. Despite the epidemiological importance of *A. darlingi*, little is known about the composition of its intestinal microbiota, and about the molecular interactions of this vector with *P. vivax*. In this scenario, we have as main objectives: 1) To evaluate the role of *LRIM1* (Leucine-rich repeat protein 1), one of the complement genes, in the interface *A. darlingi*-*P. vivax*, And 2) To ascertain some aspects of the interaction between microbiota- *A. darlingi*- *P. vivax*. As for the *LRIM1* analyzes, the topologies of the phylogenetic trees show a higher phylogenetic relationship between *A. darlingi* and *A. albimanus*, presenting them as sister taxa. To perform the functional assays, we synthesized double-stranded RNA based on the coding sequence of *A. darlingi* *LRIM1* and microinjections in the thorax of females of this species, which were subsequently subjected to a *P. vivax* infection. Regarding the functional tests, our results showed similar levels of oocysts and prevalence between the test and control groups, and there were no statistically significant differences in all the replicates analyzed. Thus, with the data obtained so far, it is necessary to consider the hypothesis that *LRIM1* does not play a role in the defense against *P. vivax* in *A. darlingi*. In this work, we also analyzed the intestinal microbiota composition of *A. darlingi* mosquitoes infected with *P. vivax* by means of large-scale sequencing of the V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene. The most abundant bacterial classes observed in our samples were: Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, and Flavobacteria. As for the taxonomic family level, Enterobacteriaceae was observed in greater abundance in the mosquitoes presenting low infection with *P. vivax*, suggesting that this family can antagonize the parasite. Whereas, Flavobacteriaceae was obtained in greater proportion in mosquitoes that showed high infection with *P. vivax*. This suggests that this family may somehow favor the parasite, and increase its burden on mosquitoes. Therefore, since the literature on the immune response of Brazilian anophelins (especially *A. darlingi*) is scarce, data on *LRIM1*, such as functional analyzes and phylogeny, provide information that may boost other studies on this protein, as well as of other genes of the immune system. In addition, our results corroborate previous studies on anophelinos, indicating that bacteria associated with the *A. darlingi* gut may play an important role in infection and immune response to the parasite.

## SUMÁRIO

### Caracterização funcional do sistema complemento e análise da microbiota de *Anopheles darlingi* em resposta à infecção com *plasmodium vivax*

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Malária	14
1.2 Mosquitos vetores de malária	14
1.3 <i>A. (Nyssorhynchus) darlingi</i>	15
1.4 <i>Plasmodium vivax</i>	15
1.5 Interação vetor- parasita	16
1.6 Sistema imune	17
1.6.1 Via JAK-STAT	17
1.6.2 Via Imd	18
1.6.3 Via Toll	18
1.6.4 Sistema complemento	19
1.7 Microbiota intestinal	21

### PARTE I- Caracterização funcional do sistema complemento de *Anopheles darlingi* e seu papel na resposta *anti-Plasmodium vivax*

<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
4.1 Identificação do gene LRIM1 de <i>A. darlingi</i> e busca por ortólogos	24
4.2 Desenho dos Iniciadores	24
4.3 Isolamento de RNA	25
4.4 Síntese de cDNA	26
4.5 Produção do fragmento de PCR molde e síntese do RNA dupla fita	26
4.6 Coleta de mosquitos	26
4.7 Indução a oviposição e identificação	27
4.8 Manutenções das larvas	27
4.9 Silenciamento de LRIM1 de <i>A. darlingi</i> através de RNAi	27
4.10 Obtenção de sangue contendo gametócitos de <i>Plasmodium vivax</i> e infecção de <i>Anopheles darlingi</i>	28
4.11 Avaliação do efeito do silenciamento de <i>LRIM1</i> sobre o desenvolvimento de <i>P. vivax</i> em <i>A. darlingi</i> :	29
4.12 Validação do Silenciamento de <i>LRIM1</i>	29
4.14 Declaração de ética	29

<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
5.1 Amplificação de fragmento do gene <i>LRIMI</i> .....	30
5.2 Busca por ortólogos de <i>LRIMI</i> .....	30
5.3 Alinhamento das sequências.....	31
5.4 Análise filogenética das sequências codificadoras de <i>LRIMI</i> em mosquitos vetores.....	36
5.5 Análise funcional de <i>LRIMI</i> .....	39
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>46</b>

**PARTE II- Investigação da diversidade bacteriana intestinal de *Anopheles darlingi* em resposta a *Plasmodium vivax***

<b>8. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>47</b>
<b>9. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
<b>10. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
10.1 Reação em Cadeia da Polimerase .....	49
10.2 Quantificações por KAPA.....	49
10.3 Sequenciamento .....	49
10.4 Análises dos dados .....	50
10.5 Avaliação da carga bacteriana .....	50
<b>11. RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
11.1 Diversidade Alpha e Beta.....	50
11.2 Análise da composição taxonômica bacteriana .....	59
<b>12. DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>13. CONCLUSÕES</b> .....	<b>71</b>
<b>14. MATERIAL SUPLEMENTAR</b> .....	<b>72</b>
<b>15. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema da via do complemento de <i>A. gambiae</i> .....	21
<b>Figura 2:</b> Eletroforese do RNA dupla fita do gene <i>LRIMI</i> e do controle <i>LacZ</i> .....	30
<b>Figura 3:</b> Alinhamento das sequências traduzidas do gene <i>LRIMI</i> de <i>A. darlingi</i> e seus ortólogos.....	35
<b>Figura 4:</b> Árvore de Neighbor-Joining do gene <i>LRIMI</i> das sequências de nucleotídeos.....	37
<b>Figura 5:</b> Árvore de Neighbor-Joining do gene <i>LRIMI</i> das sequências de proteínas.....	38
<b>Figura 6:</b> Expressão relativa de <i>LRIMI</i> dois dias após a microinjeção de dsRNA com seus respectivos desvios padrões.....	39
<b>Figura 7:</b> Intensidade das infecções, dada pela quantidade de oocistos por intestino de todas as réplicas.....	40
<b>Figura 8:</b> Intensidade das infecções por intestino em cada réplica individual.....	41
<b>Figura 9:</b> Principais etapas do desenho experimental para o sequenciamento de fragmentos do gene 16S rRNA.....	48
<b>Figura 10:</b> Gráfico resultante da análise de diversidade <i>alpha</i> .....	52
<b>Figura 11:</b> Gráfico de diversidade alpha estimado através do índice de Simpson para alta e baixa infecção por <i>P. vivax</i> . ....	53
<b>Figura 12:</b> Gráfico de diversidade alpha estimado através do índice de Shannon para alta e baixa infecção por <i>P. vivax</i> .....	54
<b>Figura 13:</b> Carga bacteriana avaliada através de expressão gênica relativa.....	55
<b>Figura 14:</b> Análise de <i>Beta</i> diversidade por condições experimentais.....	56
<b>Figura 15:</b> Análise de <i>Beta</i> diversidade por intensidade de infecção.....	56
<b>Figura 16:</b> Análise de <i>Beta</i> diversidade por pontos do tempo, dividindo as amostras em grupo controle e experimental.....	57
<b>Figura 17:</b> Análise de <i>Beta</i> diversidade por pontos do tempo, separando as amostras por intensidade de infecção.....	58
<b>Figura 18:</b> Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de ordem para cada amostra, separadas pela condição experimental.....	60

<b>Figura 19:</b> Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de ordem para cada amostra, separadas por nível de infecção por <i>Plasmodium</i> .....	61
<b>Figura 20:</b> Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Filo.....	62
<b>Figura 21:</b> Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Classe.....	63
<b>Figura 22:</b> Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem.....	64
<b>Figura 23:</b> Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Família.....	65
<b>Figura 24:</b> Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de gênero.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequências dos iniciadores.....	25
<b>Tabela 2:</b> Valores de identidade dos ortólogos.....	31
<b>Tabela 1S:</b> Número de oocistos por intestino.....	72
<b>Tabela 2S:</b> Informações sobre as análises de infecção.....	74

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AMP-** Peptídeo antimicrobiano (*antimicrobial peptide*)
- APL1-** *Anopheles Plasmodium*-responsive *Leucine-rich repeat protein 1*
- cDNA-** Ácido desoxirribonucleico complementar (*complementary DNA*)
- CTL-** *C-type lectins*
- dFADD-** *Drosophila Fas Associated protein with Death Domain*
- DNA-** Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- Dome-** *Unpaired ligand Upd to the transmembrane receptor Domeless*
- DREDD-** *Death-related ced-3/Nedd2-like protein*
- dsRNA-** RNA dupla fita (*double strand RNA*)
- Imd-** Deficiência imunológica (*Immune Deficiency*)
- JAK/ STAT-** *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway*
- LRIM1-** *Leucine-rich immune protein*
- MyD88-** *Myeloid differentiation factor 88*
- PAMP -** Padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)
- PCoA-** Análise de coordenadas principais
- PCR-** Reação em cadeia pela polimerase (*polimerase chain reaction*)
- PGRP-LC-** *Drosophila peptidoglycan recognition protein LC*
- PRRs-** Receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors*)
- RNA -** Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
- RNAi-** RNA de interferência
- RNase-** Ribonuclease
- ROS-** Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

**rRNA-** RNA ribosomal

**TEP1-***Thioester-containing protein*

# Caracterização funcional do sistema complemento e análise da microbiota de *Anopheles darlingi* em resposta à infecção com *plasmodium vivax*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Malária

A malária é uma doença parasitária ocasionada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Dentre as espécies deste gênero, no Brasil são encontradas três correlacionadas a infecções em humanos: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*, das quais, as infecções por *P. vivax* são as predominantes. A transmissão deste parasita ocorre por meio da picada de diferentes espécies de mosquitos fêmeas pertencentes ao gênero *Anopheles* (MS, 2015).

Atualmente no Brasil, a doença é considerada endêmica na região da Amazônia legal, local em que ocorre a maior parte dos casos no país, contabilizando 145 mil casos até setembro de 2018, esta região abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. (MS,2008; MS, 2015; MS 2018).

A malária ainda é um grave problema de saúde pública, atualmente é endêmica em 76 países e todos os anos ocorrem globalmente milhões de casos. De acordo com dados da organização mundial de saúde (WHO) cerca de metade da população mundial está sob risco de contraí-la, e apenas no ano de 2017 ocorreram 219 milhões de casos e 435 000 óbitos registrados em decorrência da doença (WHO, 2018).

### 1.2 Mosquitos vetores de malária

Os mosquitos do gênero *Anopheles* pertencem à família Culicidae e subfamília Anophelinae (Krzywinski e Besansky, 2003). Este gênero possui em torno de 400 espécies descritas, das quais aproximadamente 70 são potencialmente infectantes para humanos (Pimenta et al., 2015; Sinka et al., 2012). Este gênero compreende seis subgêneros, dos quais *Anopheles* é encontrado em diversas partes do mundo; *Cellia* tem distribuição pelo Velho Mundo e os demais subgêneros são Neotropicais: *Lophopodomyia*, *Kerteszia*, *Nyssorhynchus* e *Stethomyia* (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Krzywinski e Besansky, 2003; Karimian et al., 2014). Dentre estes subgêneros, *Nyssorhynchus* é um dos principais responsáveis pela manutenção da malária no país (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Este subgênero é responsável pela maioria dos casos registrados na Região Amazônica (Rosa-Freitas et al., 1998), em que *Anopheles darlingi* é o principal vetor.

### 1.3 A. (*Nyssorhynchus*) *darlingi*

*A. darlingi* é encontrado na América do Sul e Central até o sul do México, ao norte da Argentina e no Leste da cadeia dos Andes até a costa do Oceano Atlântico (Hiwat e Bretas, 2011). Este mosquito é um dos mais importantes transmissores da malária humana nas Américas, sendo considerado um dos anophelinos com hábitos mais antropofílicos e endofílicos, com horário de picada ao amanhecer e ao anoitecer (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Zimmerman, 1992). Suas formas imaturas são encontradas nos mais variados locais, desde represas, lagoas e com menor frequência em depressões de terrenos e em valas (Rachou, 1958).

### 1.4 *Plasmodium vivax*

Os protozoários que ocasionam a malária pertencem ao filo Apicomplexa e gênero *Plasmodium*, este gênero é composto por mais de 100 espécies, que podem infectar diversos animais (Escalante e Ayala, 1995; CDC, 2016). Todavia, apenas cinco espécies deste gênero são infectantes para humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale*, e *P. knowlesi* (WHO, 2015). Dentre estas, *P. vivax* é a mais difundida, sendo encontrada em regiões tropicais e temperadas, principalmente na Ásia, América Latina e em algumas partes da África (CDC, 2016).

Este é o principal parasita nas Américas, o qual ocasiona em torno de 64% dos casos de malária nesta região, 30% das infecções no Sudeste Asiático e 40% no Mediterrâneo Oriental (WHO, 2015 e WHO, 2017). Só no ano de 2017, *P. vivax* causou globalmente em torno de 7. 510.000 dos casos de malária e contribui com grande morbidade (WHO, 2018).

Uma característica peculiar da biologia de *P. vivax* é a invasão de reticulócitos, o que combinado à formação de hipnozoítos por esta espécie promovem sua maior persistência, dificultando o controle da doença (Armistead e Adams, 2018).

Além disso, a falta de culturas contínuas de *P. vivax* em laboratório e a concepção de malária-*vivax* como malária mais branda, dificultam a pesquisa em laboratório e fazem com que esta não seja tão priorizada (Rajeev et al., 2017). Deste modo, apesar de acometer milhões de pessoas *P. vivax* permanece negligenciado, obtendo não mais de 5% da fração do financiamento destinado a pesquisa e desenvolvimento de malária (Path, 2013).

Em contrapartida, para redução do número de casos da doença deve-se deixar de negligenciar o impacto de *P. vivax*. Apesar de sua biologia característica ser um desafio à sua

eliminação, vencer a doença exige mais pesquisas de base e conhecimento sobre sua epidemiologia e biologia de modo geral (Gething et al., 2012).

### **1.5 Interação vetor- parasita**

Para que haja a transmissão da malária é necessário que o parasita conclua seu ciclo de vida, parte dele no hospedeiro invertebrado: mosquitos do gênero *Anopheles*. Este ciclo inicia-se assim que uma fêmea do mosquito ingere sangue contendo gametócitos de *Plasmodium*. Estes se desenvolvem no intestino médio do vetor, onde ocorrerá a fecundação dos gametas dando origem aos zigotos. Que por sua vez, tornam-se formas móveis, os chamados oocinetos e atravessam o epitélio do intestino médio. Assim que o oocineto chega ao lado basal do epitélio do intestino médio ele se transforma em oocisto e passa por ciclos de esporogonia para dar origem a inúmeros esporozoítos. Em seguida, estas formas atingem a hemocele e posteriormente as glândulas salivares do mosquito. Desta forma, o vetor portando as formas infectantes do parasita, quando for se alimentar novamente, é capaz de transmiti-las para humanos (Clayton et al., 2014; Levashina, 2004) .

Contudo, até que conclua seu ciclo de vida no vetor e seja transmitido para um vertebrado, o parasita depara-se com diversas barreiras no interior do mosquito, sendo a principal delas o epitélio do intestino médio, onde ele enfrentará o sistema imune do hospedeiro. Nesta etapa do ciclo, observa-se uma das reduções mais significativas no número de parasitos, devido à ação do sistema imune do mosquito frente à infecção (Blandin e Levashina, 2004, Cirimotich 2010). Portanto, o sistema imune possui importante relação com a capacidade vetorial.

Até recentemente, muito pouco se sabia sobre a identidade dos processos imunes. Novas análises funcionais de genes e o sequenciamento completo do genoma de *A. gambiae* forneceram perspectivas para melhor investigação destes processos (Levashina, 2004). No entanto, a maior parte dos trabalhos se restringem a *A. gambiae*. Portanto, estudos sobre a resposta imune dos vetores brasileiros e sua relação com os parasitas, especialmente com *P. vivax* são insuficientes, o que implica em desconhecimento desta relação parasito-vetor (Barbosa-de-Oliveira, 2009). Sendo assim, estudos para averiguar melhor essas relações são extremamente necessários, pois como relata Clayton (2014), os eventos celulares e moleculares relacionados à infecção de uma determinada espécie de mosquito com diferentes *Plasmodium* spp. podem ser semelhantes. Todavia, também apresentam muitas divergências, mostrando que existe grande complexidade nas interações parasita-vetor.



## 1.6 Sistema imune

Os insetos não possuem imunidade adaptativa, porém, possuem um eficiente sistema de imunidade inata capaz de lidar com uma vasta gama de organismos invasores, incluindo parasitas (Christophides et al., 2002).

O sistema de imunidade inata dos mosquitos conta com duas ferramentas principais: (i) as reações humorais e (ii) as respostas mediadas por células, que podem modular patógenos com o auxílio de diferentes estratégias. A reação imune humoral pode ocorrer através de ação de peptídeos antimicrobianos (AMPs) e ativação de outras moléculas efetoras; já as respostas celulares podem ser por meio de melanização ou fagocitose, por exemplo. Tanto as respostas humorais bem como as celulares, são produzidas em decorrência de reconhecimento do patógeno, através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que identificam determinados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Esse reconhecimento fará com que haja a ativação das vias de transdução de sinais (Christophides et al., 2004; Lemaitre e Hoffmann, 2007; Michel e Kafatos, 2005).

A ativação das vias de transdução de sinal, tais como Toll, Imd e JAK/ STAT (que serão melhor descritas adiante), fazem com que ocorra a produção de moléculas efetoras antimicrobianas (AMPs) e de genes efetores de imunidade (Hoffmann e Reichhart, 2002, Lemaitre e Hoffmann, 2007). As quatro principais classes de AMPs encontradas em anofelinos são: Defensinas, cecropinas, atacinas e gambicinas. Estas são encontradas nas respostas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e *Plasmodium* (Cociancich et al., 1993; Vizioli et al., 2001a; Vizioli et al., 2001b). A produção dos AMPs ocorre principalmente no corpo gorduroso, órgão importante da imunidade dos mosquitos. Estes peptídeos são então secretados para a hemolinfa, e se difundem pelo corpo (Christophides et al., 2004).

### 1.6.1 Via JAK-STAT

A via JAK-STAT está relacionada a respostas frente a estresse e danos teciduais (Broderick et al., 2009). Além disso, esta via também tem papel importante na defesa contra vírus, como o da dengue, em *Aedes aegypti* (Souza-Neto et al., 2009).

Esta via também já foi identificada em *Drosophila*, na qual é ativada pela interação de citocinas com o receptor Dome, induzindo sua fosforilação e isso resulta na ativação de STAT que é então dimerizada e translocada para o núcleo, acionando a transcrição de diversos genes efetores (Christophides et al. 2004).

Em *A. gambiae* também foram encontrados fatores de transcrição STAT, os quais regulam a expressão de moléculas efetoras. Como exemplo, STAT regula a ativação transcricional de óxido nítrico sintase (NOS), podendo induzir a produção de óxido nítrico, que em anophelinos demonstrou importância na defesa anti-*Plasmodium* (Gupta et al., 2009).

### 1.6.2 Via Imd

A via Imd é uma das vias mais importante nas respostas contra bactérias Gram-negativas e fungos, e controla a expressão de diversos peptídeos antimicrobianos (Leulier et al., 2000). Além disso, esta via também possui potente ação anti *P. falciparum* em anophelinos. Isso foi observado por Garver et al. (2012), que silenciaram a expressão de *caspar* (um regulador negativo da via de Imd) e assim obtiveram um fenótipo mais resistente a malária em *A. gambiae*.

A ativação desta via se dá através do receptor PGRP-LC (proteína reconhecadora de peptideoglicano de cadeia longa). Após a ativação PGRP-LC recruta a proteína Imd, que então interage com dFADD este se liga a Dredd, isso faz com que Rel2 seja translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, propicia a transcrição de inúmeros genes entre eles, peptídeos antimicrobianos que atuam contra bactérias gram-negativas (Lemaitre e Hoffmann, 2007; Hoffmann, 2003; Sim et al., 2014).

### 1.6.3 Via Toll

A via Toll é responsável principalmente pelo reconhecimento de PAMPs de fungos e bactérias Gram-positivas. (Michel et al., 2001). Ademais, resultados de ensaios funcionais de genes associados a via Toll descritos por Xi et al. (2008) indicam que esta via tem papel importante na resistência ao vírus da dengue. Sugerem ainda, que a microbiota endógena do mosquito desempenha função na modulação da infecção do vírus da dengue, possivelmente através da estimulação basal da via Toll. Além disso, a indução da via de Toll por meio do silenciamento do regulador, *Cactus*, diminui drasticamente a infecção por *P. berghei* no intestino médio de *Anopheles gambiae* (Frolet et al., 2006).

Para ativação da via, o receptor Toll é ativado pela ligação à proteína Spaetzle clivada (Weber et al., 2003), resultando no recrutamento de três proteínas: MyD88, Tube e Pelle. O que desencadeia a fosforilação e degradação de *Cactus* (regulador negativo dos fatores de transcrição), que se liga a Rel1. Essa degradação de *Cactus* faz com que Rel1 seja translocado

para o núcleo para ativar a transcrição diferentes genes, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Lemaitre e Hoffmann, 2007; Sim et al., 2014).

#### 1.6.4 Sistema complemento

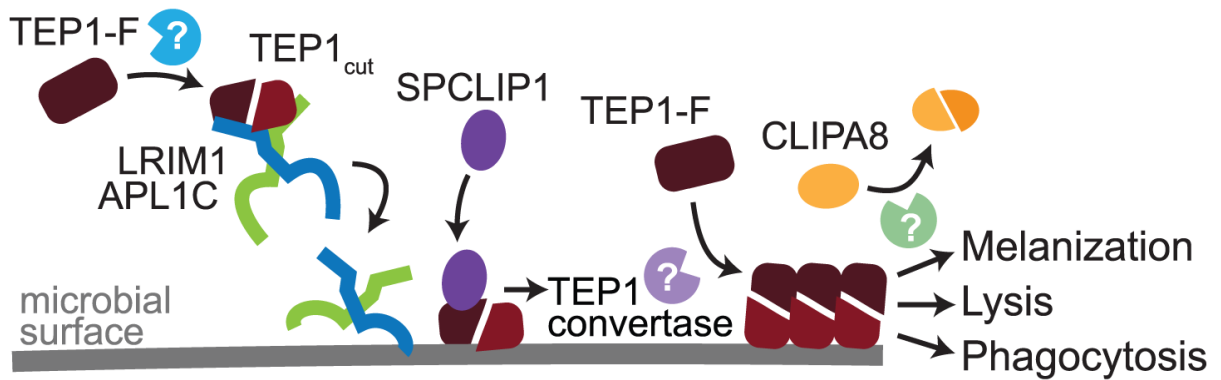
O sistema complemento foi descoberto na década de 1890 por Jules Bortdet e inicialmente era conhecido apenas em vertebrados. Nestes organismos, parte importante da defesa do hospedeiro é efetuada por moléculas como C3 e C5, estruturalmente semelhantes (Murphy, 2014). A princípio, estas moléculas eram conhecidas apenas em vertebrados. Hoje sabe-se da existência de componentes homólogos a estes também em invertebrados como por exemplo, em mosquitos do gênero *Anopheles*. Sabe-se ainda, que estes componentes do sistema complemento em algumas espécies de anophelinos, tem papel chave na defesa anti-*Plasmodium*. Um exemplo destes componentes é TEP1, que é homóloga à proteína C3 do complemento de vertebrados e pode ser produzida por hemócitos (Levashina et al., 2001; Pompon e Levashina, 2015). No sistema complemento de *A. gambiae* já foram descritos 15 genes *TEP*, que é uma das proteínas mais importantes do sistema complemento e pertence à família de proteínas contendo tioéster (Christophides et al., 2002). Após ativação proteolítica, este motivo tioéster é utilizado para ligação ao alvo promovendo sua opsonização, podendo levar à fagocitose (Christophides et al., 2002). Além de exercer um importante papel na defesa de anophelinos contra *Plasmodium*, TEP1 pode ainda opsonizar e promover fagocitose de bactérias gram-negativas e gram-positivas (Levashina et al., 2001).

Na hemolinfa de anophelinos podem ser encontradas duas formas de TEP1, uma de tamanho completo, inativa, e a forma clivada que está ativa. Fraiture et al. (2009) e Povelones et al. (2009) concomitantemente demonstraram que para que haja ligação de TEP1 ao parasita é necessária a participação de duas outras proteínas: LRIM1 e APL1C (duas proteínas com repetições ricas em leucina- LRRs) que formam um heterodímero. Das três proteínas, LRIM1 foi a primeira a ser descoberta, por Osta et al. em 2004. A estrutura de *LRIM1* contém basicamente três partes distintas: um domínio “*coiled-coil*” (bobina em espiral) C-terminal, que transporta TEP; uma região central rica em cisteínas, local em que ocorre a formação dos complexos, e repetições ricas em leucinas (*LRR-leucine-rich repeat*) na região N-terminal, com papel no reconhecimento de patógenos (Povelones et al., 2011). A posição relativa de apenas poucos aminoácidos chaves define a integridade estrutural desses domínios com LRR e “bobina-enrolada”, permitindo variações consideráveis de sequência o que pode dificultar análises filogenéticas e a determinação de relações de ortologia (Waterhouse et al., 2010).

Ademais, sequências de repetições ricas em leucina (LRRs), podem ter papel imune e ser encontradas em inúmeros outros organismos. Em *Drosophila*, por exemplo, o domínio LRR de Toll reconhece *spetzle* levando à sinalização intracelular e subsequente produção de efetores imunes. LRRs são encontradas até mesmo em plantas, no qual são codificadas pelos chamados genes R e podem fornecer maior resistência a patógenos (Rolff e Reynolds, 2009). Em anophelinos, proteínas contendo repetições ricas em leucina como LRIM1, também demonstraram ter papel chave na imunidade contra patógenos, quando esta foi silenciada com a utilização de RNAi por Osta et al. em 2004, em que obtiveram um aumento expressivo no número de oocistos de *P. berghei* no vetor.

Em *A. gambiae* a interação entre as proteínas do complemento se dá resumidamente do seguinte modo: na hemolinfa a forma completa de TEP1 (*TEP1-F*) é clivada por uma proteína ainda desconhecida. Esta forma clivada (*TEP1-Cut*) interage com o dímero LRIM1 / APL1C, estabilizando TEP1. O reconhecimento de superfícies microbianas após a formação deste complexo, leva à deposição de LRIM1 / APL1C e TEP1-Cut, e posterior recrutamento de SPCLIP1. Em seguida, outra proteína também desconhecida é então recrutada, a qual processa a forma completa de TEP1 gerando TEP1 convertase. A produção de TEP1 convertase está envolvida em processos como: fagocitose, lise e melanização (Baxter et al., 2010; Fraiture et al., 2009, Clayton, 2014; Povelones et al., 2009; Povelones et al., 2013).

O complexo LRIM1/APL1C além de estabilizar a forma processada de TEP1 regula a formação de uma TEP1 convertase que catalisa a ativação de outras moléculas de TEP1 próximas ao patógeno (Fraiture et al., 2009). (Esses processos podem ser visualizados na figura 1). Além disso, o sistema complemento de mosquitos também pode estar relacionado a outras proteínas, como as lectinas do tipo C (CTLs). Este fato pode ser observado em um estudo funcional com duas lectinas do tipo C: CTL4 e CTLMA2, cujo silenciamento provocou a melanização de oocistos de *P. berghei* (Osta et al., 2004).



**Figura 1: Esquema da via do complemento de *A. gambiae*.** Na hemolinfa em estado inativo, TEP1-F é processada por uma protease desconhecida para gerar TEP1cut, que interage com o complexo LRIM1 / APL1C. O reconhecimento de superfícies microbianas leva à deposição de LRIM1 / APL1C e TEP1cut e posterior recrutamento de SPCLIP1. Outra protease ainda desconhecida é então recrutada gerando a TEP1 convertase madura, que processa a TEP1-F. O processamento de TEP1-F e aquele realizado pela TEP1 convertase são distintos, uma vez que apenas o último requer SPCLIP1. A formação da convertase de TEP1 é necessária para fagocitose, lise e melanização. Fonte: Povelones et al., 2013.

Um dos primeiros indícios da importância do complemento na melanização em mosquitos do gênero anopheles foi através do silenciamento TEP1, que cessou completamente a melanização de oocinetos de *P. berghei* em uma cepa resistente de *A. gambiae* (Blandin et al., 2004). Ainda, outro trabalho utilizando silenciamento e ensaios quantitativos de fagocitose demonstrou, in vivo, que TEP1 silenciada em *A. gambiae* adultos resulta em um maior número de bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Isto sugere que TEP1 tem papel importante para fagocitose (Moita et al., 2005).

Apesar de reconhecida a importância dos genes do complemento contra patógenos em mosquitos, ainda não há muitas informações de como estes são regulados. Acredita-se que em *Drosophila* a expressão de *TEP1* seja regulada por meio das vias Toll e JAK / STAT, mas os mecanismos ainda são mal compreendidos (Lagueux et al., 2000).

### 1.7 Microbiota intestinal

Grande parte dos seres vivos é colonizada por uma miríade de microrganismos que compreendem a microbiota endógena. Tais como as bactérias que colonizam o trato digestivo, estas bactérias residentes podem fornecer benefícios ao hospedeiro, levando a uma relação mutualista (Hooper and Gordon, 2001).

Bem como a maior parte dos seres vivos, muitas espécies de insetos também são colonizadas por diversos microrganismos (Dillon e Dillon, 2004), ocorrendo associações

simbióticas entre a microbiota e insetos. Essa relação pode auxiliar o hospedeiro no desempenho de processos fisiológicos, tais como: digestão, nutrição, reprodução, na manutenção da homeostase do sistema imune do hospedeiro, aumentando sua tolerância a alterações ambientais e ainda, contribuindo na proteção contra patógenos (Gaio et al., 2011; Hurst e Hutchence 2010; Weiss e Aksoy, 2001).

Trabalhos recentes sugerem que a microbiota de mosquitos vetores, possui importante função capaz de determinar a capacidade vetorial. A microbiota pode modular as respostas imunes destes organismos e assim, influenciar a transmissão de patógenos aos humanos.

A microbiota endógena pode modular a competência vetorial por dois modos principais: de forma direta e indireta. A formação de compostos antiparasitários no decorrer do ciclo normal de desenvolvimento das bactérias pode ser um fator que influencie diretamente a infectividade do patógeno. A presença de *Enterobacter* sp. no intestino de *Anopheles gambiae*, por exemplo, inibe o desenvolvimento de *Plasmodium falciparum*. Como verificado por Cirimotich (2011), esta bactéria é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio que auxiliam na eliminação de *Plasmodium* no intestino do mosquito, tornando-o assim, refratário ao parasita.

Já o mecanismo indireto pode ser devido à ativação de respostas imunes do vetor, que em situações normais, são mantidas em níveis basais para o controle da proliferação das bactérias entéricas (Ramirez et al., 2012).

Ainda, como já mencionado, durante alguns estágios do ciclo de vida do *Plasmodium* há significativas reduções da população parasitária no intestino médio do mosquito. Uma das reduções mais importantes ocorre quando o oocineto atravessa o epitélio do intestino, em decorrência da ação sistema imune do hospedeiro (Sinden e Billingsley, 2001). Contudo, além da ação do sistema imune outros fatores essenciais podem estar envolvidos nestas reduções parasitárias, como a microbiota endógena do mosquito (Dong et al., 2009).

Habtebold et al. (2017) testaram espécies vetoras e não vetoras de anophelinos e propuseram um modelo no qual uma maior tolerância à microbiota do intestino médio resulta em menor tolerância à infecção por *Plasmodium*. Onde as espécies não vetoras teriam um aumento da resistência imunológica na hemocele em virtude da ativação de efetores do sistema complemento pela microbiota.

Além disso, Xi et al. (2008) observaram que a remoção da microbiota do intestino de *Aedes aegypti*, com a utilização de antibióticos, resultou em níveis mais altos de infecção por dengue. Ainda, Dong et al. (2009) também avaliaram a influência da microbiota do mosquito

frente ao parasita da malária. Como resultado, os mosquitos isentos de microbiota apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *Plasmodium*, em contraposição aos co-alimentados com bactérias e gametócitos de *P. falciparum*, que resultaram em níveis de infecção inferiores. Além disso, ensaios de infecção sugeriram que o efeito anti-*Plasmodium* mediado por bactérias é devido às respostas imunes dos mosquitos, através da ativação da imunidade basal. Boissière et al. (2012), também demonstraram que em anophelinos maior quantidade de Enterobacteriaceae no intestino do mosquito pode modular o desenvolvimento de patógenos.

Desta forma, sugere-se que a microbiota exerce função protetora contra vírus e protozoários, interferindo deste modo na competência vetorial do mosquito e, portanto, na propagação de doenças. Todavia, os mais diversos aspectos da microbiota intestinal de *A. darlingi* ainda são desconhecidos, sobretudo durante a interação deste vetor com *P. vivax*. Consequentemente, melhor compreensão da interação vetor, microbiota e patógenos pode prover novas estratégias para controle de transmissão da doença.

## **PARTE I- Caracterização funcional do sistema complemento de *Anopheles darlingi* e seu papel na resposta anti-*Plasmodium vivax***

### **2. JUSTIFICATIVA**

Apesar de estudos recentes terem fornecido maior compreensão sobre as relações parasita-vetor, sobretudo, em modelos como *A. gambiae* e *P. berhei*. Ainda existem poucos trabalhos com os vetores das Américas. Diante disso, apesar da importância epidemiológica de *A. darlingi*, pouco se sabe sobre as interações moleculares deste vetor com *P. vivax*. Neste cenário, este trabalho teve como um dos principais objetivos identificar e avaliar o papel de um dos genes do sistema complemento atuantes na interface vetor-parasito: *LRIM1*.

### **3. OBJETIVOS**

Este trabalho teve como principal objetivo a análise funcional do sistema complemento de *A. darlingi* e avaliação do seu papel na defesa anti-*P. vivax*. Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Identificação do gene *LRIM1* de *A. darlingi* e seus respectivos ortólogos.
- 2) Avaliação do efeito do silenciamento do gene de *LRIM1* sobre *Plasmodium vivax*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Identificação de gene *LRIMI* de *A. darlingi* e busca por ortólogos:

Estas etapas foram executadas com o auxílio de ferramentas de bioinformática, da seguinte maneira: Foi utilizada a sequência do gene *LRIMI* identificada por RNA-seq em nosso laboratório pela pesquisadora associada Dra. Bianca Cechetto Carlos, em parceria com o *VectorBase* e Professor Dr. George Christophides, da Imperial College London. A sequência de nucleotídeos e de proteínas foram utilizadas para realizar uma busca com a ferramenta *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*) na plataforma *VectorBase* contra o banco de dados das sequências de anophelinos e encontrar as sequências de nucleotídeos e polipeptídeos semelhantes em outros mosquitos. Os ortólogos foram determinados após o *Blast* e busca direta por ortólogos no *VectorBase* (Giraldo-Calderón et al., 2015). Para confirmação da utilização da sequência correta de *LRIM*, foram realizados alinhamentos e inferências filogenéticas de acordo com Souza-Neto et al., 2009. Os alinhamentos globais foram executados no *Clustal x 2*. Para construção das árvores filogenéticas foi utilizado o programa *Geneious 10.2.3*, empregando-se o método de *Neighbor-Joining* com o modelo Tamura-Nei com 1000 replicações de *bootstrap*.

### 4.2 Desenho dos Iniciadores:

Para a síntese de RNA dupla fita (dsRNA) se faz necessário gerar um fragmento de PCR molde contendo o adaptador T7 em ambas extremidades. Desta forma, foram delineados iniciadores específicos para a amplificação de um fragmento da região codificadora de *LRIMI* para utilização na produção do RNA dupla fita. Além desses, foram sintetizados iniciadores para a análise da expressão de *LRIMI* e do gene ribossomal constitutivo Rp49 por RT-qPCR. Todos os iniciadores foram delineados com o Programa *Primer 3* (Tabela 1) e tiveram sua eficiência determinada por RT-qPCR.



**Tabela 1: Sequências dos iniciadores.**

		Sequência (5'→3')		Eficiência
DsRNA	<i>LRIM1</i>	TAATACGACTCACTATAGGCGGCACGGTCGATTTGAATG	F	--
DsRNA	<i>LRIM1</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGCCAGGGTAGCTTGTTGT	R	--
qRT-PCR	<i>LRIM1</i>	TGCAGCACCTGAATCTCTCTT	F	2,14
qRT-PCR	<i>LRIM1</i>	GGTGCAGATCGGTGATGTAGT	R	2,14
qRT-PCR	<i>Rp49</i>	ACAGTACCTGATGCCGAACA	F	1,99
qRT-PCR	<i>Rp49</i>	TTCTGCATCATCAGCACCTC	R	1,99

Sequências dos iniciadores que foram empregados para produção do RNA de dupla fita (dsRNA), em destaque a sequência do promotor T7 e iniciadores que foram utilizados nas reações de PCR em tempo real e seus respectivos valores de eficiência. F: Forward, R: Reverse.

### 4.3 Isolamento de RNA

O isolamento de RNA dos intestinos de *A. darlingi*, foi extraído em estudos prévios realizados pela pesquisadora associada Bianca Cechetto Carlos. Para tal, os intestinos foram transferidos para tubos com volume de 200 µl de Trizol. A esse volume foram adicionadas *beads* de vidro (GB05-RNA 0,5 mm de diâmetro) e após 4 minutos no *Bullet Blender* com velocidade 7, as amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 40 µl de clorofórmio, os tubos foram agitados com vortex por 30 segundos. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, realizou-se uma centrifugação de 13200 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (superior) foi transferida a um novo tubo, adicionando-se a este 100 µl de isopropanol gelado. Após homogeneizar cada tubo por 15 segundos e incubar a temperatura ambiente por mais 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 200 µl de etanol 75%. Em seguida as amostras foram agitadas com a utilização de vortex por 15 segundos, as mesmas foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, deixando-se os tubos secarem a temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em 20 µl de água RNase free e quantificadas com *Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen)*. Assim, ao final do processo foi obtido em cada tubo o RNA de pools de intestinos de 30-45 mosquitos.

#### 4.4 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, foi utilizado 1µg de RNA tratado com o *kit RQ RNase-Free DNase (Promega)* para a eliminação de eventuais vestígios de DNA genômico. Para tal, as amostras foram incubadas com DNase por 2 horas a 37°C, posteriormente adicionando-se EDTA para a inibição da enzima. Em seguida, o RNA foi utilizado para a síntese de cDNA de acordo com as instruções do *kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher)*. As condições do termociclador foram: 25 °C por 5 minutos; 42°C por 90 minutos; e 70 °C por 5 minutos.

#### 4.5 Produção do fragmento de PCR molde e síntese do RNA dupla fita

O dsRNA utilizado no silenciamento foi sintetizado a partir de um produto de PCR amplificado utilizando-se iniciadores específicos para o gene *LRIMI*. As condições do termociclador para a geração do molde de DNA foram de: 95 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 7 minutos. A transcrição in vitro do dsRNA foi realizada com o *kit HiScribe™ T High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs)* conforme recomendações do fabricante. Utilizando-se em cada reação 2 µL de água ultrapura, 10 µL de *NTP buffer mix*, 16 µL do produto de PCR amplificado e 2µL de T7 RNA polimerase. Posteriormente, a precipitação do dsRNA foi realizada adicionando 2,7 µL de acetato de sódio 3M e 67,5µL de etanol absoluto, seguido de uma centrifugação a 12.000 RPMs por 15 minutos. O dsRNA foi lavado com 500µL de etanol 70% e uma nova centrifugação com os mesmos parâmetros da anterior foi realizada. O dsRNA foi ressuscitado em 20 µL de água ultrapura. Finalmente, as concentrações de todas as amostras foram determinadas no aparelho *NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (Uniscience)* e ajustadas para 3,0 µg/µL.

#### 4.6 Coleta de mosquitos

Parte dos experimentos foram executados com mosquitos provenientes da colônia do laboratório de entomologia médica da Fiocruz/RO (Paciente ou réplica 1, 2 e 3) e as réplicas 4 e 5 (Paciente 4 e 5) são mosquitos da geração 1 (F1) produzida a partir de mosquitos *A. darlingi* coletados no campo. As capturas dos mosquitos adultos foram realizadas nos arredores de Porto Velho/RO nos finais de tarde e início da noite em peridomicílio, através de atração humana protegida (por membros do grupo VECTOMICS e do laboratório de entomologia médica da Fiocruz/RO). Após a coleta, os mosquitos foram imediatamente

alimentados com sangue em alimentadores artificiais e posteriormente mantidos com solução de sacarose 10%, permanecendo acondicionados em gaiolas e transportados para o laboratório.

#### **4.7 Indução a oviposição e identificação**

Em média 48 horas após a coleta foi realizada a indução de oviposição, sendo as fêmeas anestesiadas com acetato de etila e colocadas sobre uma placa de petri que continha um papel filtro, onde as fêmeas tiveram uma de suas asas cortadas utilizando-se duas agulhas de 21G. Nesta ocasião todos os mosquitos foram identificados em nível de espécie, através de microscópio estereoscópico, com auxílio de chave dicotômica de identificação (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Em seguida, as fêmeas foram alocadas em uma placa de petri com papel toalha umedecido (em torno de 10 fêmeas por placa), e estas armazenadas dentro de um isopor. De modo geral, algumas horas após a indução, as fêmeas já começavam a oviposição. Após oviposição, o papel contendo os ovos foi colocado em um recipiente contendo água destilada.

#### **4.8 Manutenções das larvas**

As larvas que eclodiram dos ovos (F1) foram criadas em laboratório até o estágio adulto. Para tanto, estas foram mantidas em recipientes contendo água destilada e foram alimentadas com ração de peixe (*TetraMin Tropical Flekes-Spectrum Brands, Inc*). Assim que atingiram o estado adulto, os mosquitos foram mantidos em condições controladas de temperatura a 27°C, fotoperíodo de 12 horas e alimentados com mel a 10%.

#### **4.9 Silenciamento de LRIM1 de *A. darlingi* através de RNAi:**

A avaliação do papel do sistema complemento em *A. darlingi* foi realizada da seguinte forma: Um dos genes do complemento, especificamente *LRIM1*, foi silenciado em *A. darlingi* por meio de utilização de RNA de interferência (RNAi). Para tal, 69 nl da solução de dsRNA específico para *LRIM1* (*dsLRIM1*) foram introduzidos no tórax dos mosquitos (com idade de 2 a 3 dias após emergência) com o auxílio do injetor *Nanoject II* (*Drummond Scientific*), bloco resfriador *Echoterm chilling/heating plate* (*Torrey Pines Scientific*) e um microscópio estereoscópico *Stemi DV4 Spot* (*Carl Zeiss*). Um grupo controle também foi injetado intratoracicamente com a mesma quantidade de dsRNA específico para um gene não relacionado ao genoma do mosquito (*dsLacZ*, de bactérias). Ambos os grupos foram

posteriormente alimentados com o sangue de pacientes contendo gametócitos infecciosos de *P. vivax* para se avaliar o efeito do silenciamento de *LRIMI* sobre o desenvolvimento do parasita no mosquito. Um subgrupo de mosquitos das réplicas 4 e 5 foi também separado para a validação do silenciamento de *LRIMI* por RT-qPCR.

#### **4.10 Obtenção de sangue contendo gametócitos de *Plasmodium vivax* e infecção de *Anopheles darlingi***

A infecção experimental de *Anopheles darlingi* com *P. vivax* foi realizada de dois a três dias após a injeção dos mosquitos com dsRNAs. Para tal, foram selecionadas amostras de sangue de pacientes infectados com *P. vivax* com formas sexuadas do parasita (gametócitos), circulante em maiores de 18 anos (excluindo-se gestantes, índios e indivíduos mentalmente incapacitados), que procuraram diagnóstico e atendimento no Centro de Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM). O sangue foi obtido por punção venosa realizado por técnico devidamente qualificado após conhecimento do estudo (objetivos, importância e metodologia) e anuência, por escrito (Termos de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE) dos participantes. De cada paciente que aceitou participar da pesquisa foram coletados 10ml de sangue, armazenados em tubos *Vacutainer* contendo heparina.

A quantificação dos gametócitos no sangue dos pacientes foi realizada com base na contagem de leucócitos, assumindo-se que cada microlitro de sangue possui cerca de 6000 leucócitos, de acordo o protocolo do Ministério da Saúde. O cálculo, portanto, foi realizado através da seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ Gametócitos}/\mu\text{l} = \frac{\text{N}^\circ \text{ parasitas}}{\text{leucócitos} \times 6000}$$

No período máximo de 20 minutos após a coleta, aproximadamente 1 ml do sangue contendo gametócitos de *P. vivax* foi distribuído em um sistema de alimentação artificial pré-aquecido a 37°C para alimentação dos mosquitos *A. darlingi*, que já estavam em doze horas em privação de alimento (solução de sacarose). Dois grupos de mosquitos receberam sangue de paciente sem inativação prévia do soro, e três grupos de mosquitos receberam sangue que foi centrifugado por 15 min. a 2000 xg em que foi retirado o soro do paciente e substituído por soro não imunizado. O tempo de alimentação foi de aproximadamente 40 minutos. Posteriormente, as fêmeas que se alimentaram foram separadas das não ingurgitadas e

transferidas para gaiolas menores. Os mesmos procedimentos foram realizados para o grupo experimental e controle.

#### **4.11 Avaliação do efeito do silenciamento de *LRIMI* sobre o desenvolvimento de *P. vivax* em *A. darlingi***

Após sete dias da infecção, os intestinos dos mosquitos foram dissecados sob lupa estereoscópica em tampão fosfato salino (PBS). Esse material foi utilizado para verificar prevalência (porcentagem de mosquitos com pelo menos um oocisto no intestino) e intensidade da infecção (número de oocistos por intestino). Para essa análise, os intestinos dissecados foram corados com solução de mercurocromo 0,1% e os oocistos contados com auxílio de microscopia de luz.

O efeito do silenciamento de *LRIMI* sobre o desenvolvimento de *P. vivax* em *A. darlingi* foi determinado através da comparação das medianas do número de oocistos entre os grupos teste (*dsLRIMI*) e controle (*dsLacZ*). A significância desses experimentos foi determinada através do teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

#### **4.12 Validação do Silenciamento de *LRIMI***

A Validação do Silenciamento do gene *LRIMI* foi realizada por meio de PCR quantitativo em tempo real. Para isso o RNA total foi extraído com *TRIZOL (Invitrogen)*. Estas amostras foram tratadas com *kit RQ RNase-Free DNase (Promega)* e o RNA foi empregado na síntese de cDNA. Posteriormente, foram realizadas reações de PCR, com a utilização do aparelho *StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, empregando-se o *SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. Foram utilizados iniciadores sintetizados com o Programa *Primer 3*. A diferença relativa na expressão gênica entre mosquitos infectados e controles foi calculada com método  $\Delta\Delta CT$  (Livak & Schmittgen, 2001), utilizando o gene ribossomal constitutivos RP49 como normalizador. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *GraphPad Prism 7*, aplicando-se o teste T-Student para análise estatística.

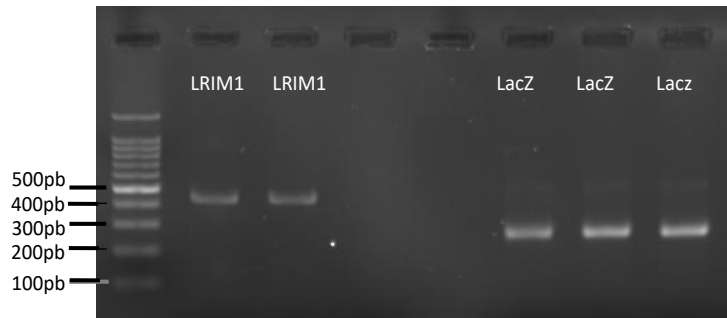
#### **4.13 Declaração de ética**

Todos os procedimentos envolvendo humanos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu, sob protocolo número 2.526.160.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Amplificação de fragmento do gene *LRIM1*

Para produção do RNA dupla fita primeiramente foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR). Os fragmentos resultantes de PCR e o RNA dupla fita sintetizados para os genes *LRIM1* e *LacZ* possuem o tamanho esperado, em torno de 400 e 300 pares de base, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2 : Eletroforese do RNA dupla fita do gene *LRIM1* e do controle *LacZ*.** Eletroforese (em gel de agarose em uma concentração de 1,5%) do RNA dupla fita do gene *LRIM1* e *LacZ*, com utilização de marcador de peso molecular (100 pares de base).

### 5.2 Busca por ortólogos de *LRIM1*

A sequência de *LRIM1* foi identificada no transcriptoma realizado em nosso laboratório e anotada em parceria com a equipe do *VectorBase*.

Os possíveis ortólogos deste gene foram identificados por meio de uma busca no banco de dados do *VectorBase*, inserindo-se a identidade da sequência (ADAC100440). Desta forma, o banco de dados fornece uma lista com os prováveis ortólogos e os respectivos valores de “*Query% ID*” e “*Target% ID*”. Ambos valores se referem à identidade das sequências. Simplificadamente, “*Query% ID*” expressa a porcentagem de nucleotídeos da sequência de *A. darlingi* correspondente ao ortólogo, e “*Target% ID*” expressa a porcentagem da sequência do ortólogo correspondente em *A. darlingi*.

Nesta lista foram obtidas sequências de *LRIM1* de outras espécies de anophelinos, incluindo espécies crípticas do complexo de *A. gambiae*, e mosquitos de outros gêneros como *Aedes* e *Culex*. De modo geral, os valores de identidade são relativamente baixos, não ultrapassando 40% na comparação com todas as espécies de mosquitos, com exceção de *A. albimanus* (Tabela 2).

**Tabela 2: Valores de identidade dos ortólogos**

<b>Espécie</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Target %id</b>	<b>Query %id</b>
<i>Aedes aegypti</i>	AAEL012086	19.08 %	18.77 %
<i>Aedes albopictus</i>	AALF016505	18.53 %	18.38 %
<i>Anopheles albimanus</i>	AALB005865	79.64 %	78.85 %
<i>Anopheles arabiensis</i>	AARA000858	33.20 %	33.40 %
<i>Anopheles coluzzii</i>	ACOM039873	33.86 %	33.60 %
<i>Anopheles dirus</i>	ADIR008083	33.60 %	33.79 %
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP006348	33.79 %	33.99 %
<i>Anopheles maculatus</i>	AMAM021547	34.48 %	31.62 %
<i>Anopheles melas</i>	AMEC020045	32.94 %	33.40 %
<i>Anopheles merus</i>	AMEM010702	33.79 %	33.99 %
<i>Anopheles quadriannulatus</i>	AQUA000911	33.86 %	33.99 %
<i>Anopheles sinensis</i>	ASIS017797	33.43 %	22.33 %
<i>Anopheles stephensi</i>	ASTE000814	33.46 %	34.19 %
<i>Culex quinquefasciatus</i>	CPIJ004924	21.39 %	21.34 %

“Query% ID” expressa a porcentagem de nucleotídeos da sequência de *A. darlingi* correspondente ao ortólogo, e “Target% ID” expressa a porcentagem da sequência do ortólogo correspondente em *A. darlingi*. ID: Identificação do gene.

### 5.3 Alinhamento das sequências

As sequências de nucleotídeos e de proteínas de LRIM1 de *A. darlingi* foram alinhadas com suas sequências ortólogas para a geração de inferências filogenéticas e para a confirmação dos ortólogos.

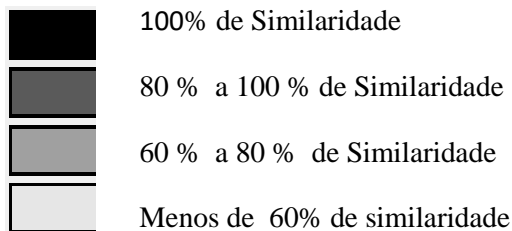
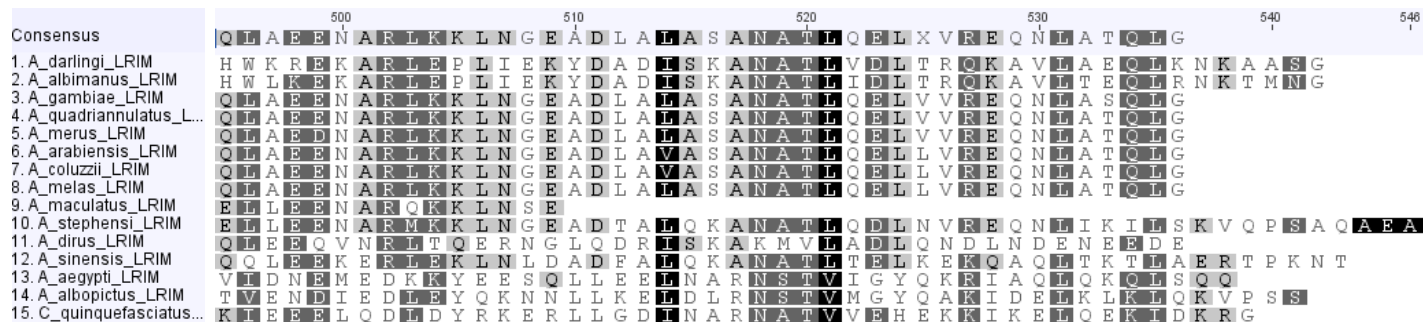
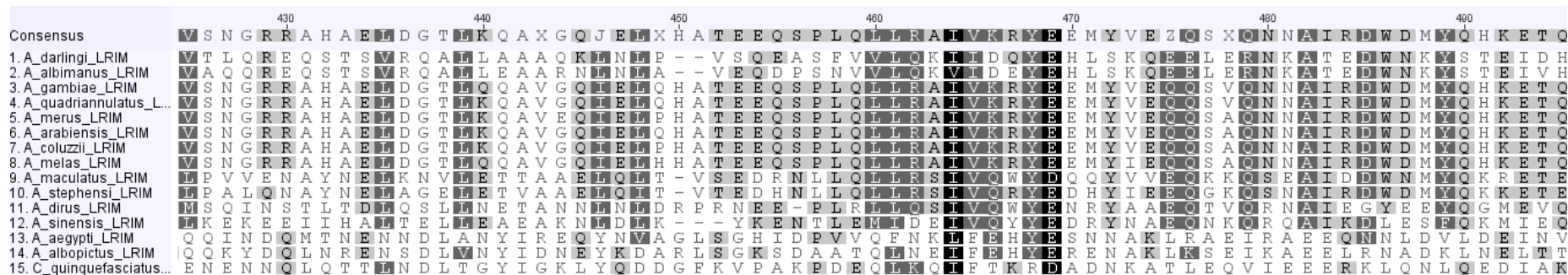
O alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *LRIM1* selecionadas neste trabalho, de modo geral não demonstrou alta conservação entre todas as diferentes espécies estudadas. Contudo, as sequências de nucleotídeos e proteínas das espécies ortólogas não pertencentes ao gênero *Anopheles* apresentaram maior semelhança entre si. Além disso, o alinhamento de proteínas (figura 3) evidencia maior similaridade entre as sequências traduzidas de *A. albimanus* e *A. darlingi* em comparação com as sequências das outras

espécies. Ainda, é possível destacar que *A. darlingi* e *A. albimanus* apresentaram maior semelhança entre suas sequências, o que é confirmado nas árvores filogenéticas (figuras 4 e 5). Ademais, é possível constatar no alinhamento bem como nas filogenias maior similaridade entre as sequências dos anophelinos pertencentes ao complexo *Gambiae*.









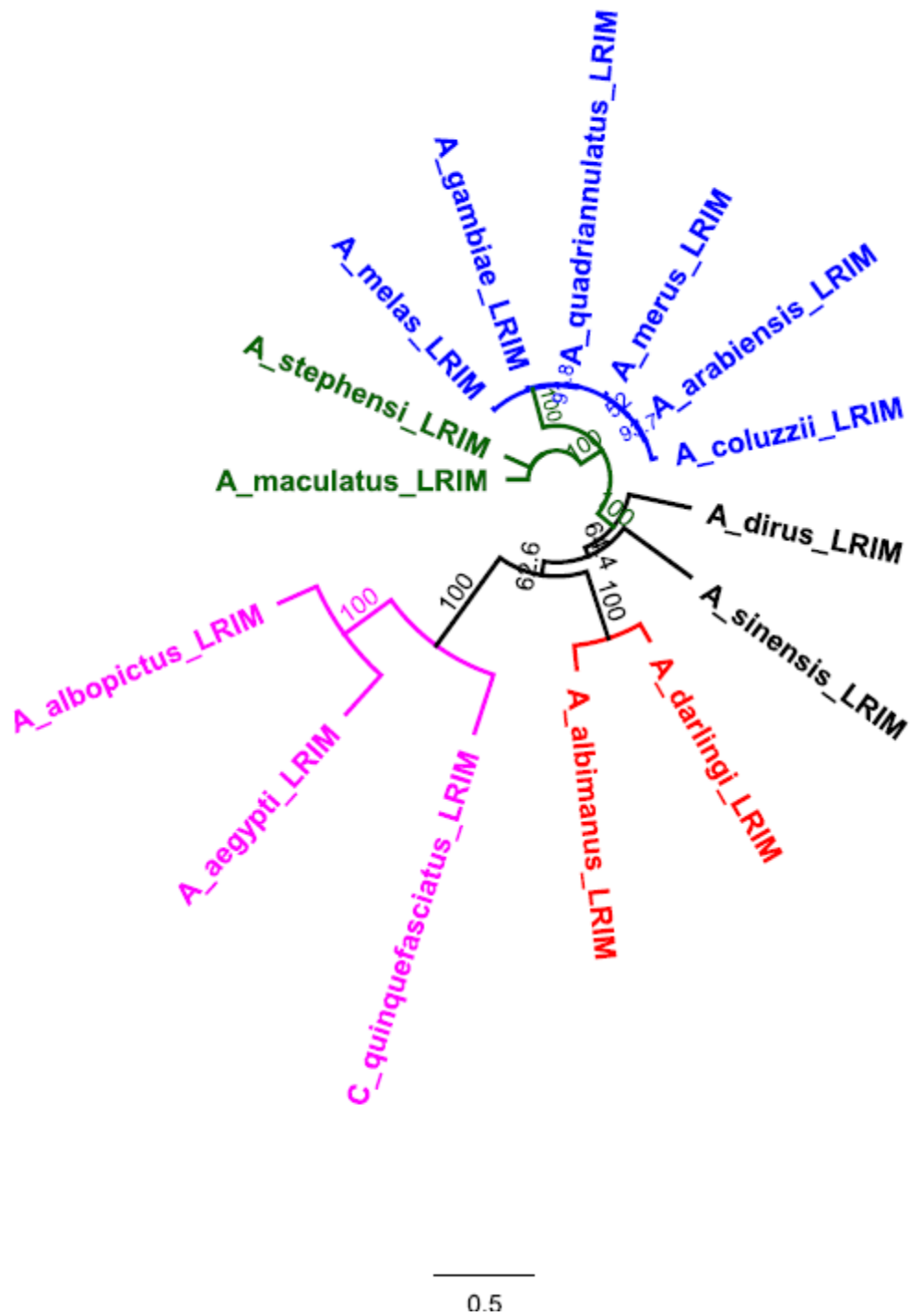
**Figura 3: Alinhamento das sequências traduzidas do gene *LRIMI* de *A. darlingi* e seus ortólogos.** 1: *A. darlingi*, 2: *A. albimanus*, 3: *A. gambiae*, 4: *A. quadriannulatus*, 5: *A. merus*, 6: *A. arabiensis*, 7: *A. coluzzi*, 8: *A. melas*, 9: *A. maculatus*, 10: *A. stephensi*, 11: *A. dirus*, 12: *A. sinensis*, 13: *A. aegypti*, 14: *A. albopictus*, 15: *C. quinquefasciatus*. As cores indicam similaridade entre as sequências: Preto indica 100% de similaridade, e a cor mais clara menos de 60%.

#### 5.4 Análise filogenética das sequências codificadoras de *LRIM1* em mosquitos vetores

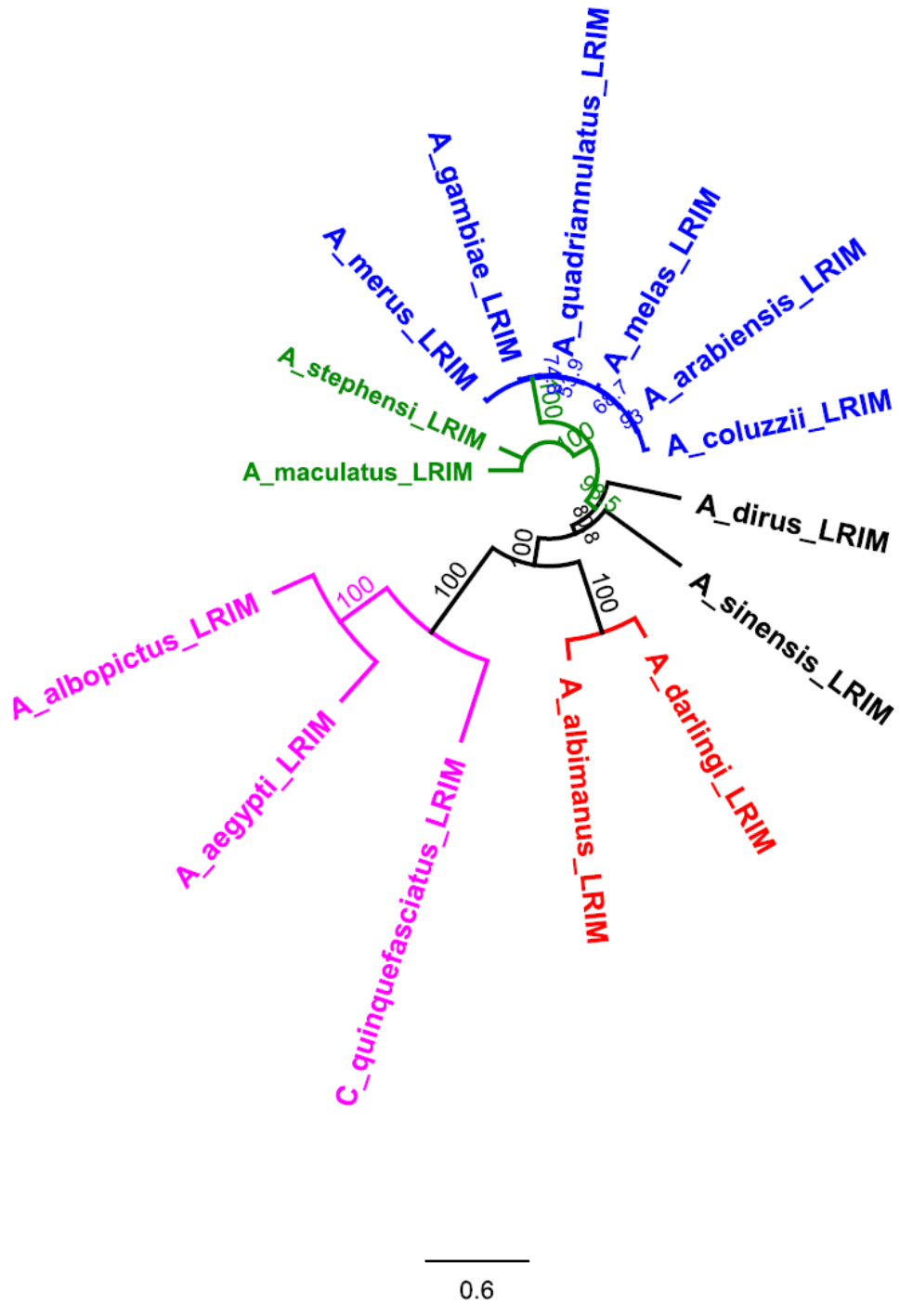
As árvores filogenéticas foram estimadas utilizando-se o método de *Neighbor-Joining* com o modelo de Tamura-Ney e 1000 repetições de *bootstrap*.

A árvore com as sequências traduzidas e a de nucleotídeos (da sequência codificadora) apresentaram grande similaridade. Em ambas as topologias, todas as relações filogenéticas obtiveram altos valores de *bootstrap*.

Além disso, as topologias das árvores descritas neste trabalho sugerem a presença de grupos de sequências distintas (Figuras 4 e 5): 1) um grupo que representa os anophelinos africanos pertencentes ao complexo *Gambiae* (indicados em azul); 2) outro grupo que engloba vetores principalmente asiáticos (em preto); 3) um grupo contendo duas espécies predominantemente encontradas na região da Índia (em verde); 4) outro grupo com as espécies não pertencentes ao gênero *Anopheles* (em rosa); e 5) um grupo contendo os anophelinos com distribuição principalmente nas Américas (em vermelho). Estes dados confirmam a relação mais próxima entre *LRIM1* de *A. darlingi* e *A. albimanus*, bem como de *A. aegypti*, *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus*, encontradas a partir do alinhamento das sequências peptídicas preditas para esses genes. Além disso, as sequências do complexo *Gambiae* se agrupam claramente em um *cluster* diferente.



**Figura 4:** Árvore de Neighbor-Joining do gene *LRIM1* das sequências de nucleotídeos. Árvore de Neighbor-Joining utilizando o gene *LRIM1* de todas as sequências de nucleotídeos utilizadas, obtida com o método de distância Tamura-Nei. Números sobre os nós representam os valores de bootstrap percentuais com base em 1.000 repetições. Os anophelinos africanos pertencentes ao complexo Gambiae estão indicados em azul; vetores asiáticos em preto, espécies predominantemente encontradas na região da Índia estão destacadas em verde, as espécies não pertencentes ao gênero *anopheles* em rosa, e os anophelinos com distribuição principalmente nas Américas em vermelho.

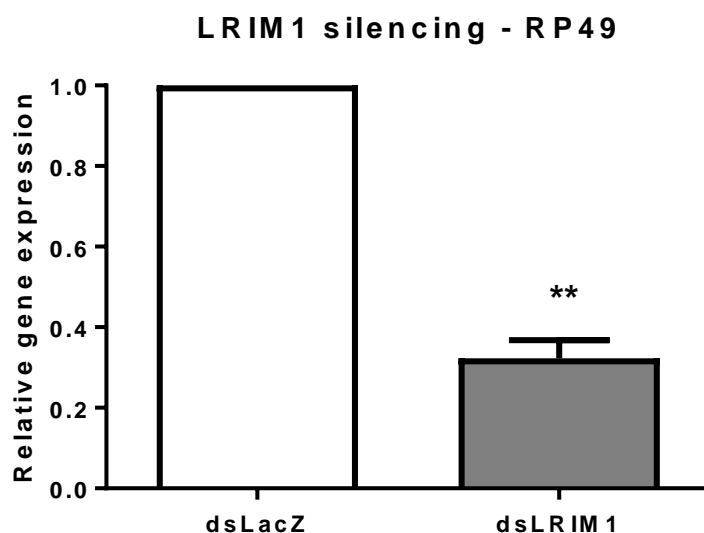


**Figura 5:** Árvore de Neighbor-Joining do gene *LRIM1* das sequências de proteínas. Árvore de Neighbor-Joining utilizando o gene *LRIM1* de todas as sequências de proteínas utilizadas, obtida com o método de distância Tamura-Nei. Números sobre os nós representam os valores de bootstrap percentuais com base em 1.000 repetições. Os anophelinos africanos pertencentes ao complexo Gambiae estão indicados em azul; vetores asiáticos em preto, espécies predominantemente encontradas na região da Índia estão destacadas em verde, as espécies não pertencentes ao gênero *anopheles* em rosa, e os anophelinos com distribuição principalmente nas Américas em vermelho.

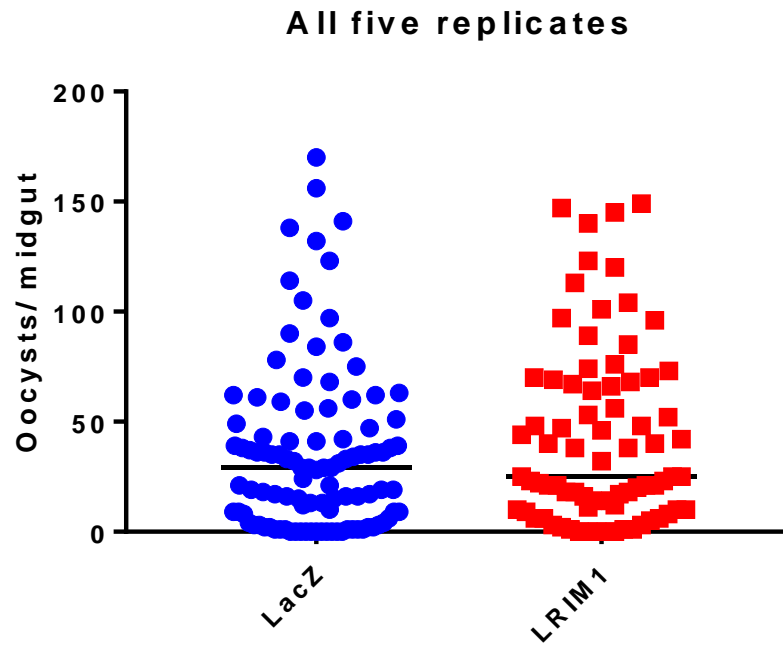
### 5.5 Análise funcional de *LRIM1*

Os mosquitos microinjetados com dsRNA para o gene *LRIM1* tiveram redução significativa em seu nível de expressão relativa. Demonstrando assim, que o silenciamento do gene *LRIM1* foi efetivo, como pode ser observado na figura 6.

Todavia, nossos resultados de análise funcional mostram níveis semelhantes de oocistos e prevalência (Tabela 1S e 2S) entre os grupos teste e controle, e não houve diferenças estatisticamente significativas entre eles tanto combinando-se as réplicas (figura 7), bem como analisando-se as cinco réplicas de modo individual (figura 8).

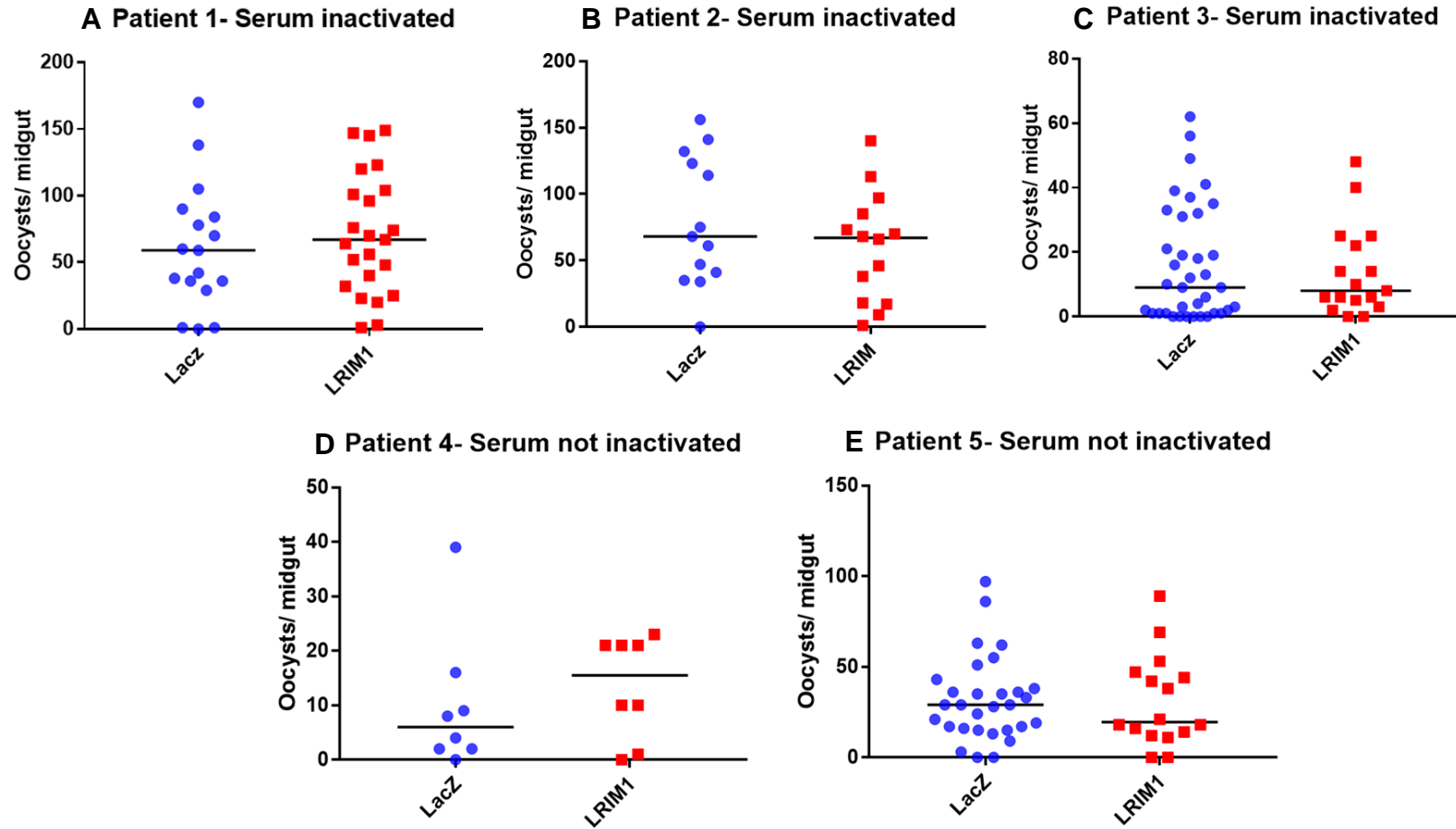


**Figura 6:** Expressão relativa de *LRIM1* dois dias após a microinjeção de dsRNA com seus respectivos desvios padrões. A validação estatística foi utilizando o teste T, cujo: \*\* =  $p < 0,01$ . A expressão dos genes foi normalizada em função da expressão do *housekeeping* RP49.



**Figura 7. Intensidade das infecções, dada pela quantidade de oocistos por intestino de todas as réplicas.** O eixo das ordenadas representa o número de oocistos por intestino médio, e o eixo das abscissas representa o tipo de tratamento com *dsRNA* (*dsLacZ* ou *dsLRIM1*).





**Figura 8. Intensidade das infecções por intestino em cada réplica individual.** A-C réplicas em que a infecção foi realizada com o soro inativo, D-E réplicas em que a infecção foi realizada com o soro não inativo. O eixo das ordenadas representa o número de oocistos por intestino médio, e o eixo das abscissas representa o tipo de tratamento com *dsRNA* (*dsLacZ* ou *dsLRIM1*).

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram realizadas análises filogenéticas e de bioinformática para confirmar a utilização da LRIM correta.

Primeiramente foi realizada uma busca por ortólogos de *LRIM1* de *A.darlingi* no *VectorBase*, em que foram obtidas sequências de outras espécies de anophelinos e outros mosquitos vetores, como: *Aedes* e *Culex*. A maior parte dos valores de identidade obtidos para esses ortólogos não foram superiores a 40%. Todavia, *A. albimanus* demonstrou alta identidade (quase 80%) em relação a *A. darlingi*. Os alinhamento das sequências confirmam esse resultado, uma vez que nos permitem observar grande similaridade entre as sequências *A. darlingi* e *A. albimanus*. Ademais, pode-se notar no alinhamento das sequências traduzidas grande similaridade entre as sequências dos anophelinos do complexo Gambiae. Além disso, as sequências de nucleotídeos dos culicíneos também obtiveram maior semelhança entre si. A topologia das árvores filogenéticas (tanto a filogenia de nucleotídeos bem como a de proteínas) confirmam esses resultados.

As árvores filogenéticas de sequências de proteínas e nucleotídeos obtidas neste estudo são muito similares e sugerem a existência de alguns grupos distintos, aparentemente mais intimamente relacionados de acordo com localização geográfica e ao subgênero pertencente. Destes, é possível destacar o agrupamento de *A. darlingi* e *A. albimanus*, sugerindo que estes sejam táxons irmãos (estes são predominantemente encontrados nas Américas, e ambos pertencem ao subgênero *Nyssorhynchus*). Nossas análises revelam ainda outros grupos formados por: anophelinos africanos (pertencentes ao complexo Gambiae e ao subgênero *Cellia*); vetores asiáticos e vetores da Índia; e ainda um grupo formado por culicíneos (com os subgêneros *Culex* e *Stegomyia*).

Outros estudos também relatam essa relação entre biogeografia e a evolução dos anophelinos. A distribuição neotropical de quatro dos seis subgêneros de *Anopheles*, por exemplo, seria um indício de que os Anophelinae teriam origem no Novo Mundo (Krzywinski, et al., 2001; Harbach, 1998 ; Krzywinski e Besansky, 2003 ). É provável que estes tenham surgido na América do Sul e que os subgêneros *Anopheles* + *Cellia* sejam monofiléticos e *Nyssorhynchus* + *Kerteszia* sejam táxons irmãos (Krzywinski et al., 2001; Krzywinski e Besansky, 2003). A primeira irradiação do subgênero *Anopheles* pode ter acontecido em torno de 95 milhões de anos, antes da perda da ligação existente entre a América do Sul e o continente africano, e como *Cellia* não é encontrado no Novo Mundo, acredita-se que a irradiação deste subgênero tenha sido desencadeada após o Eoceno posterior

(Krzywinski e Besansky, 2003).

Ainda, utilizando como critério características estruturais compartilhadas de LRIM, Povelones et al. (2009) realizaram análises de bioinformática e filogenéticas que revelaram quatro sub-famílias distintas de LRIM. Além disso, estes autores sugerem que *LRIMI* e *APLIC* são membros de uma família com ortólogos em diferentes gêneros de mosquitos vetores como: *Aedes* e *Culex*, corroborando assim nossos resultados de identidade e filogenia de *LRIMI*.

Os dados de Povelones et al. (2009) corroboram nossos resultados, sugerindo que assim como ocorre com *A. gambiae*, *LRIMI* de *A. darlingi* também possua ortólogos em outras espécies é até mesmo, em gêneros distintos. Todavia, como relatado na literatura essa proteína apresenta considerável variação em sua sequência, o que pode dificultar a identificação de equivalentes funcionais em outros organismos. Por este motivo, neste estudo foram realizadas análises de bioinformática, alinhamentos e inferências filogenéticas para confirmar a utilização da sequência de *LRIM* correta.

Quanto às análises do efeito de *LRIMI* sobre o desenvolvimento de *P. vivax* em *A. darlingi*, nossos resultados apresentaram níveis de oocistos e prevalência similares entre o grupo teste e controle (tabela 2S), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre eles nas cinco réplicas analisadas. Desta forma diante dos resultados obtidos, é necessário considerar a hipótese de que *LRIMI* não desempenhe um papel na defesa anti *P.vivax* em *A. darlingi*.

Assim, é importante ressaltar que os estudos envolvendo o papel de *LRIMI* em mosquitos, disponíveis até o momento, são em grande maioria baseados na interação de espécies únicas de *Anopheles-Plasmodium*, não considerando as diferentes espécies de mosquitos e parasitas (Simões et al., 2017).

Estes estudos que descreveram inicialmente o papel de *LRIMI* como um eficiente mediador na morte de *Plasmodium*, foram executados em um contexto de infecção ocasionada apenas por um parasita de roedores: *P. berghei*. Em contrapartida, *LRIMI* apresenta pouco sucesso na infecção com o parasita humano *P. falciparum* em *A. gambiae* (Garver et al., 2012).

Um estudo realizado por Cohuet et al. (2006), também não detectou alterações com o silenciamento de *LRIMI* sob infecção com o parasita humano, *P. falciparum*. Estes autores silenciaram *LRIMI* e duas lectinas do tipo C (*CTLA* e *CTLMA2*), relacionadas à via do complemento. Os autores ainda destacam que em contraposição a resultados obtidos

previamente com o parasita de roedores, em seu trabalho o silenciamento destes mesmos genes não teve efeito sobre o desenvolvimento do parasita humano.

Ainda, Simões et al. (2017) sugerem que CTL4 e CTLMA2 desempenham papéis opostos na infecção em *A. albimanus* e *A. gambiae*, nos quais seriam antagonista e agonista de parasitas nestas espécies vetoras, respectivamente. Diante disso, os autores sugerem que é possível que cofatores associados a estas proteínas divirjam entre estas espécies. E ainda, que outros componentes da resposta imune, distintos nas duas espécies, possam determinar o papel dessas lectinas do tipo C na imunidade.

Ademais, é possível que assim como em outros genes envolvidos na via do complemento, o papel de LRIM1 também seja distinto entre as diferentes espécies de anofelinos frente aos diversos parasitas. Pois, Simões et al (2017) descrevem LRIM1 de *A. albimanus* como modulador chave na infecção por *P. berghei* bem como, por *P. falciparum*. Propondo que isso explique a fraca competência vetorial deste vetor.

Em contrapartida em nosso estudo, apesar de a sequência de LRIM1 de *A. darlingi* apresentar quase 80% de identidade com a de *A. albimanus*, não observamos este papel modulador em *A. darlingi*.

Deste modo, é necessário considerar a hipótese de que assim como é provável que ocorra para as lectinas do tipo C, em *A. darlingi* e em *A. albimanus*, é possível que outros componentes da via do complemento e da complexa resposta imune, que diferenciaram as duas espécies de mosquitos, possam influenciar na atuação imune de LRIM1.

Ainda, Garver et al. (2012) ao silenciarem LRIM1, APL1 e seus parálogos observaram que estes eram necessários em níveis distintos de infecção: apenas no nível de baixa, média ou de alta infecção, mas nenhum foi necessário em todos os níveis. LRIM1, por exemplo, contribuiu para a resposta anti-*P. falciparum*, exclusivamente em níveis médios de intensidade de infecção. Estes autores sugerem então, que a resposta de LRIM1 seja dependente de intensidade da infecção, e que seus resultados refletem a redundância ou papéis compartilhados entre esta família gênica (Garver et al 2012).

Todavia, obtivemos números de oocistos de *P. vivax* equivalentes (tabela 2S) aos encontrados por Garver et al (2012) para *P. falciparum* em *A. gambiae* (de 2-122 oocistos, com mediana de 21,5- no qual consideraram média infecção) e por Simões et al. (2017) em *A. albimanus* (de 0-177, com mediana de 24, 65-em que consideraram alta infecção). No entanto, neste trabalho LRIM1 não demonstrou efeito no desenvolvimento de oocistos de *P. vivax*.

Ademais, neste trabalho não observamos resposta dependente da intensidade de infecção para *LRIMI*. Como ainda não há cultura de *P. vivax* em laboratório, não foi possível pré-determinar a intensidade da infecção em cada réplica. Ainda assim, obtivemos níveis distintos de infecção entre as réplicas alimentadas com sangue de pacientes diferentes. Por exemplo, no nível de infecção mais baixo obtido no grupo experimental foi observado de 0 a 23 oocistos (com mediana de 15,5), já no maior número de oocistos encontrado obtivemos uma variação de 1 a 149 oocistos (com mediana de 67) (tabela 2S). Todavia em todas as cinco réplicas, independente do nível de infecção, não foram observadas diferenças estatísticas na carga de oocistos entre grupo controle experimental.

Desta forma, como destacado Garver et al. (2012) o fato de *LRIM1* ter sido relacionado à resposta anti-*Plasmodium* de TEP1 / APL1 (Povelones et al., 2009; Fraiture et al., 2009) sugeriria que este executasse papel na atividade anti-*Plasmodium*, mas é possível que ele não seja necessário ou ainda, que seu papel seja redundante.

Cabe destacar ainda, que nosso resultado pode estar associado a outro fator: no transcriptoma realizado em nosso laboratório foi detectado baixa expressão de *LRIMI* quando os mosquitos apresentavam alta infecção por *P.vivax*. De modo geral em quase todas as réplicas, as infecções obtidas neste trabalho foram altas, então é possível que a expressão deste gene estivesse baixa tanto no controle bem como no grupo experimental, e que por este motivo, o silenciamento não tenha ocasionado diferença no número de oocistos.

Estudos como o presente trabalho, que envolvem aspectos da relação parasito-vetor são de exímia importância, pois podem contribuir significativamente para a elaboração de novas estratégias de controle da malária através da geração de mosquitos geneticamente modificados. O Brasil aderiu à campanha de erradicação da malária em 1965, quando foi criada uma série de medidas para erradicação da doença, a maior parte tem como principal objetivo interromper sua transmissão através da eliminação dos vetores (Ferreira e Castro 2016; Tauil et al., 1985; Silva e Paiva, 2015). Nos dias atuais, o controle de vetores, assim como sua manipulação genética, são consideradas estratégias muito relevantes para reduzir a transmissão de doenças transmitidas por mosquitos (Karunamoorthi, 2011).

Sendo assim, estudos sobre a resposta imune de anophelinos podem ser relevantes para elaboração de novas medidas de controle, visto que se sabe que em algumas espécies estes genes podem possuir importantes funções, capazes de influenciar diretamente a capacidade vetorial destes mosquitos (Waterhouse et al., 2007). Ainda, uma vez que na literatura trabalhos sobre a resposta imune de anophelinos brasileiros (especialmente *A.*

*darlingi*) são escassos, dados sobre *LRIMI*, tais quais análises funcionais, conservação e filogenia, proveem informações que podem impulsionar outros estudos a respeito desta proteína, bem como de outros genes do sistema imune.

## 7. CONCLUSÕES

- A sequência de *LRIMI* de *A. darlingi* possuiu maior semelhança e está mais proximamente relacionada à de *A. albimanus*.
- Este gene possui ortólogos em outras espécies e até mesmo em outros gêneros.
- Neste estudo, o silenciamento de *LRIMI* não influenciou o desenvolvimento de *P. vivax* em *A. darlingi*.

## **PARTE II- Investigação da diversidade bacteriana intestinal de *Anopheles darlingi* em resposta a *Plasmodium vivax***

### **8. JUSTIFICATIVA**

Estudos prévios indicam estreita relação entre ativação imune, sistema complemento e microbiota em anophelinos. Como o trabalho de Habtewold et al. (2017), em que sugeriram que maior tolerância à microbiota do intestino médio resulta em maior resistência à infecção por *Plasmodium*, em virtude da ativação de efetores do sistema complemento pela microbiota. Sabendo-se dessa relação microbioma-sistema complemento, resolvemos investigar também a composição da microbiota de *A. darlingi* em resposta a *P.vivax*.

Ademais, os estudos envolvendo a microbiota de *A. darlingi* na literatura são extremamente escassos. Todavia, compreender melhor a relação entre mosquitos vetores e seus simbioss é de suma importância, uma vez que isto pode contribuir na elaboração de ferramentas para auxiliar no desenvolvimento de novas técnicas no controle de transmissão da malária, como a paratransgênese.

### **9. OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivo geral investigar a influência da microbiota intestinal do mosquito *A. darlingi* na infecção por *P. vivax*. Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Investigar aspectos da interação entre microbiota- *A.darlingi*- *P.vivax*
- 2) Avaliar se a microbiota intestinal de *A. darlingi* é alterada após alimentação sanguínea contendo *P. vivax*;

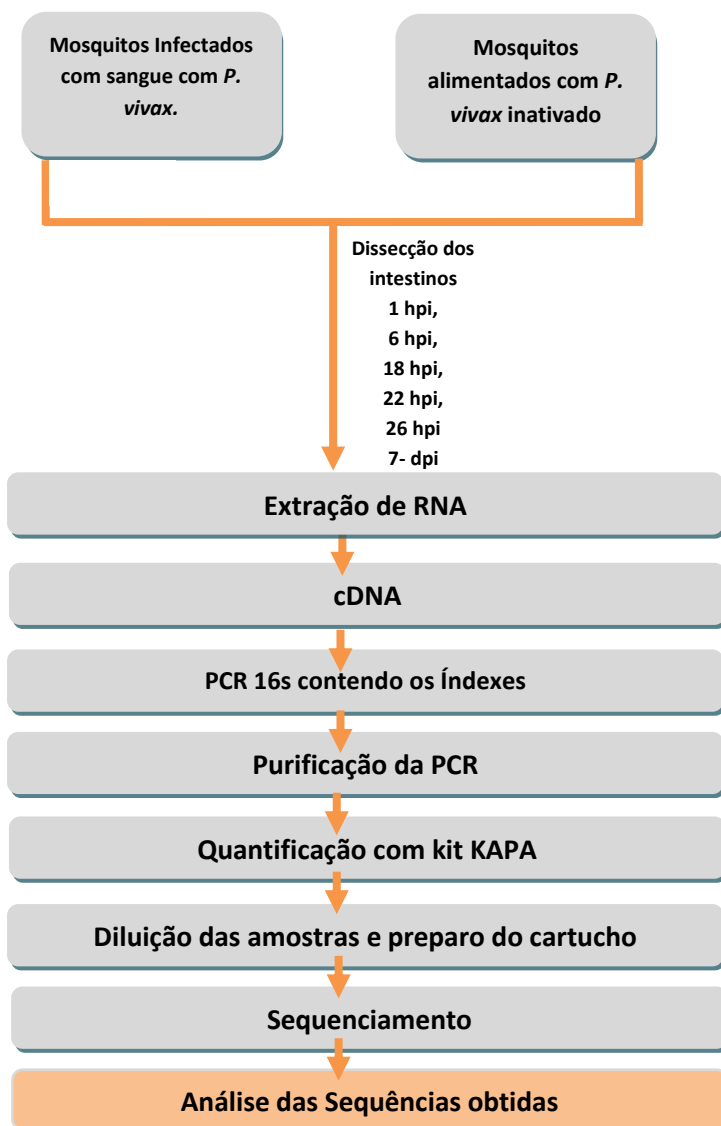
### **10. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste trabalho foram utilizadas amostras de RNA extraídos de intestinos de mosquitos *Anopheles darlingi* infectados com *Plasmodium vivax* provenientes de uma colônia laboratorial de Iquitos (Peru) (como mostra desenho experimental, na figura 9), obtido pela pesquisadora associada de nosso laboratório, Dra. Bianca Cechetto Carlos (conforme item 4.3). Foram dissecados em torno de 30 a 45 intestinos por ponto: 1 hora após infecção (hpi), 6 hpi, 18 hpi, 22 hpi, 26 hpi e 7 dias após a infecção (dpi). Estes mesmos pontos de dissecação foram realizados para o grupo controle (que passou por uma etapa adicional de inativação dos parasitas através da incubação do sangue a 42-43°C por 12 minutos sob constante agitação).

Como réplicas biológicas, foram utilizadas amostras de sangue de seis pacientes infectados com *P. vivax*, de modo que o soro de cada um deles foi substituído por soro não imune em ambos os grupos, controle e experimental. Considerando o número de pacientes (6) vezes o número de pontos de dissecação (6) de cada grupo (2), trabalhamos com um total de 72 amostras.

Com base nas contagens de oocistos, as réplicas biológicas foram classificadas como de "alta" ou "baixa" infecção, considerando-se "alta" as infecções que geraram uma média maior ou igual a 20 oocistos/ intestino e "baixa" quando menor que 20 oocistos/intestino. As réplicas biológicas que apresentaram baixa infecção foram os mosquitos alimentados com sangue do paciente 1 (P1), paciente 3 (P3) e paciente 4 (P4), já as réplicas biológicas de alta infecção foram aquelas oriundas da infecção com o sangue dos pacientes 2, 5 e 6 (P2, P5 e P6 respectivamente).

O RNA extraído destas amostras foi utilizado neste trabalho para produção de cDNA (conforme item 4.4) e confecção das bibliotecas de amplicons 16S rRNA bacteriano para a investigação da diversidade microbiana intestinal de *A. darlingi*.



**Figura 9. Principais etapas do desenho experimental para o sequenciamento de fragmentos do gene 16S rRNA.** Etapas da construção do microbioma de mosquitos alimentados com sangue de seis pacientes contendo *P. vivax* ativo e inativado, dissecados em 6 diferentes pontos do tempo (1h, 6h, 18h, 22h, 26h e 7 dias após a infecção).



## 10.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) foi empregada para amplificar o gene 16S rRNA, utilizando-se pares de primers que compreendem a região hipervariável V4 (Caporaso et al., 2012). Os *primers forward* e *reverse* utilizados neste trabalho foram desenhados contendo: a sequência do adaptador, (sequências complementares às sequências da *flow cell*- Illumina), sequência específica, para se anelar às regiões conservadas do gene 16S rRNA, e uma sequência estabilizadora, entre o adaptador e a sequência específica.

Ainda, para cada amostra diferente, foram utilizados *primers* reversos contendo indexadores distintos, o que permitiu o sequenciamento simultâneo (multiplex) de todas as bibliotecas preparadas.

As reações de PCR foram realizadas em triplicata e também foram utilizados controles negativos. As condições do termociclador foram de: 94 °C por 3 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; e 42 °C por 10 minutos.

O cDNA amplificado nestas reações foi purificado com a utilização de *beads* magnéticas (*Agencourt AMPure XP - Beckman Coulter, Inc.*), conforme recomendação do fabricante.

## 10.2 Quantificações das bibliotecas por KAPA

As quantificações com o *KAPA Library Quantification Kit Illumina®* foram realizadas de modo individual para cada amostra. A quantificação foi feita no equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. A técnica emprega *primers* que se anelam aos adaptadores Illumina das amostras de cDNA e a quantificação é realizada tomando como base 6 padrões com concentrações conhecidas. Após a quantificação, a concentração de cada amostra foi ajustada para 2nM. Posteriormente, todas as bibliotecas foram agrupadas e requantificadas para confirmação da concentração de 2nM.

## 10.3 Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas simultaneamente no aparelho *MiSeq Personal Sequencer (Illumina)* com o *kit MiSeq Reagent (Illumina)*. Para isso, estas foram acondicionadas em uma *flowcell* com capacidade de 15 milhões de *reads*/amostra. E então as análises das sequências obtidas foram realizadas utilizando o programa *CLC bio workbench 10*.

## 10.4 Análises dos dados

Primeiramente foi gerada uma tabela de metadados incluindo as diferentes condições experimentais. A posteriori, os *reads* foram importados do sequenciador em formato *fastq*. Então foi executado o pareamento dos *reads*, seguido da correção do comprimento das sequências, uma filtragem das amostras (para que todas tivessem o valor mínimo de 100 *reads* e porcentagem mínima de distância da mediana de 50%). A *clusterização* das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foi realizada utilizando o banco de dados SILVA com similaridade de 97% entre as sequências.

As análises foram realizadas empregando-se parâmetros de diversidade *Alpha* e *Beta*. Os valores de *alpha*-diversidade foram calculados pelo índice de Simpson e entropia de Shannon. A  $\beta$ -diversidade é aplicada para comparar como as amostras sequenciadas se distanciam uma da outra em relação à composição da microbiota intestinal, para aferir estas diferenças executamos uma análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando a medida de Bray-curtis. Para completar os dados de  $\beta$ -diversidade foi realizada a análise PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) no *software CLC Microbial Genomics Module*.

## 10.5 Avaliação da carga bacteriana

A possibilidade de eventuais alterações na carga bacteriana após alimentação dos mosquitos com sangue portando parasitas vivos e inativados foi realizada por meio de qRT-PCR com o uso de um par de primers capazes de amplificar um fragmento do gene RNA ribossomal 16S (16S rRNA). Desta forma, pôde-se estimar a carga bacteriana nos mosquitos nos diferentes pontos de tempo após infecção. A expressão gênica foi normalizada utilizando-se o *housekeeping* RP49, por meio do método  $\Delta$ CT (Livak & Schmittgen, 2001).

# 11. RESULTADOS

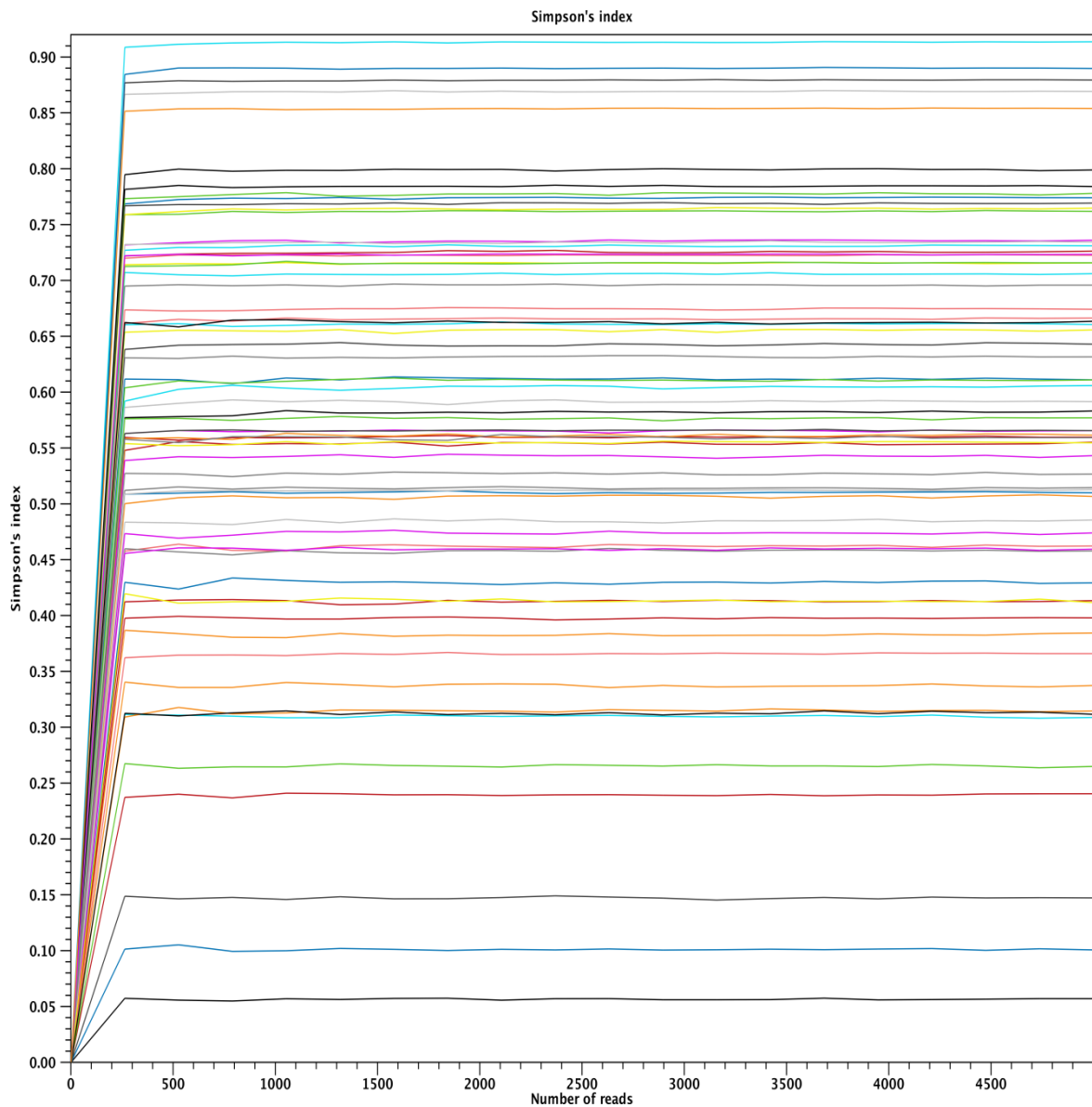
## 11.1 Diversidade *Alpha* e *Beta*

As análises foram realizadas com a utilização do *software CLC Microbial Genomics Module (Qiagen)*, utilizando-se parâmetros de *alpha* e *beta*-diversidade. A análise do tipo *alpha* infere a diversidade taxonômica dentro de uma única amostra, estimando riqueza (ou número de OTUs) e a distribuição dos táxons (quantas *reads* em cada amostra) (Morgan e Huttenhower, 2012).

Neste estudo, a diversidade *alpha* foi estimada através do índice de Simpson, que leva

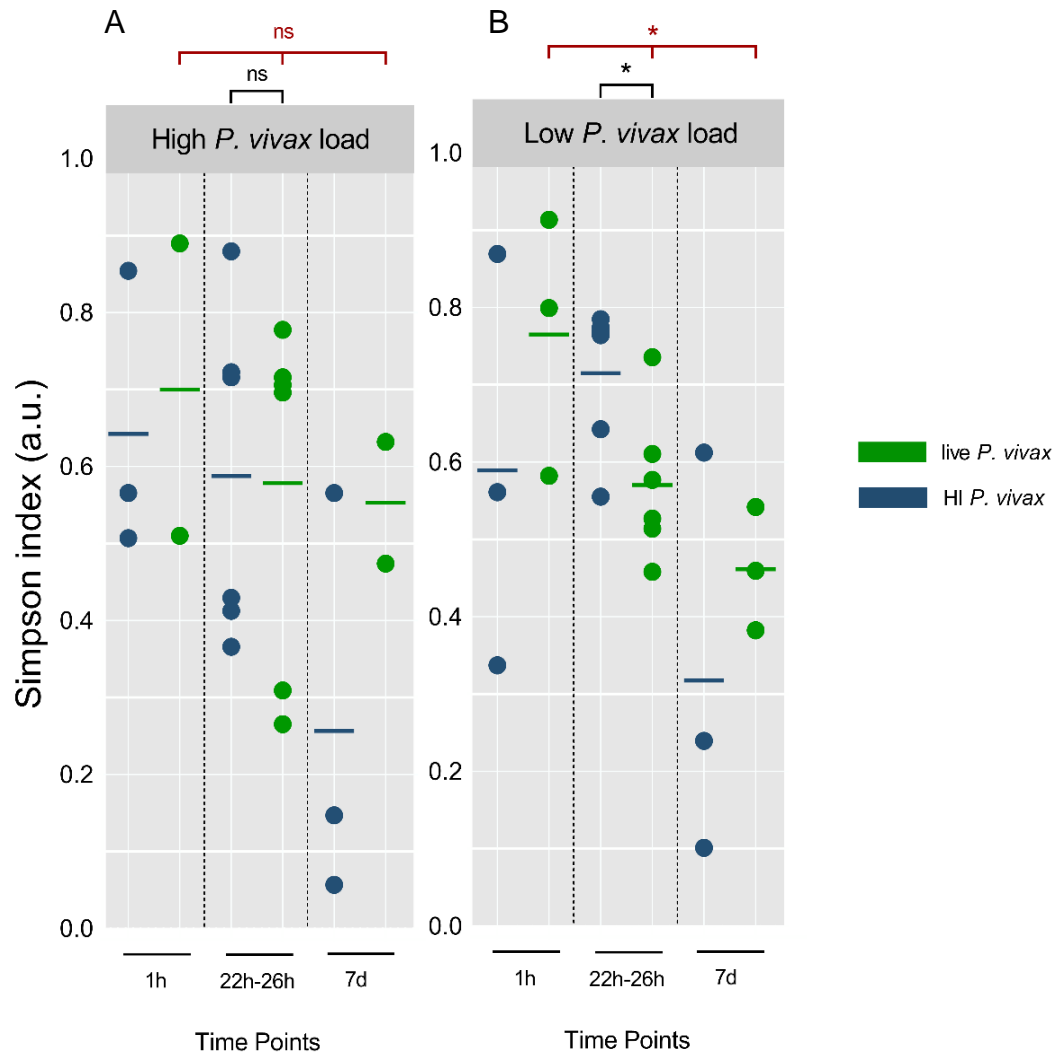
em consideração riqueza, uniformidade das amostras e abundância de cada OTU, dando mais peso para as OTUs dominantes do que para as raras e pelo índice de Shannon que é mais sensível a mudanças na abundância de OTUs raras (Hill et al., 2003).

É possível observar na figura 10 que todas as curvas de rarefação obtidas alcançam um platô, que tem início em aproximadamente 300 *reads*. Ademais, não há diminuição da heterogeneidade conforme aumento do número de *reads* das amostras. Isso indica que o sequenciamento foi realizado em um nível suficiente para estimar a diversidade microbiana das amostras analisadas.



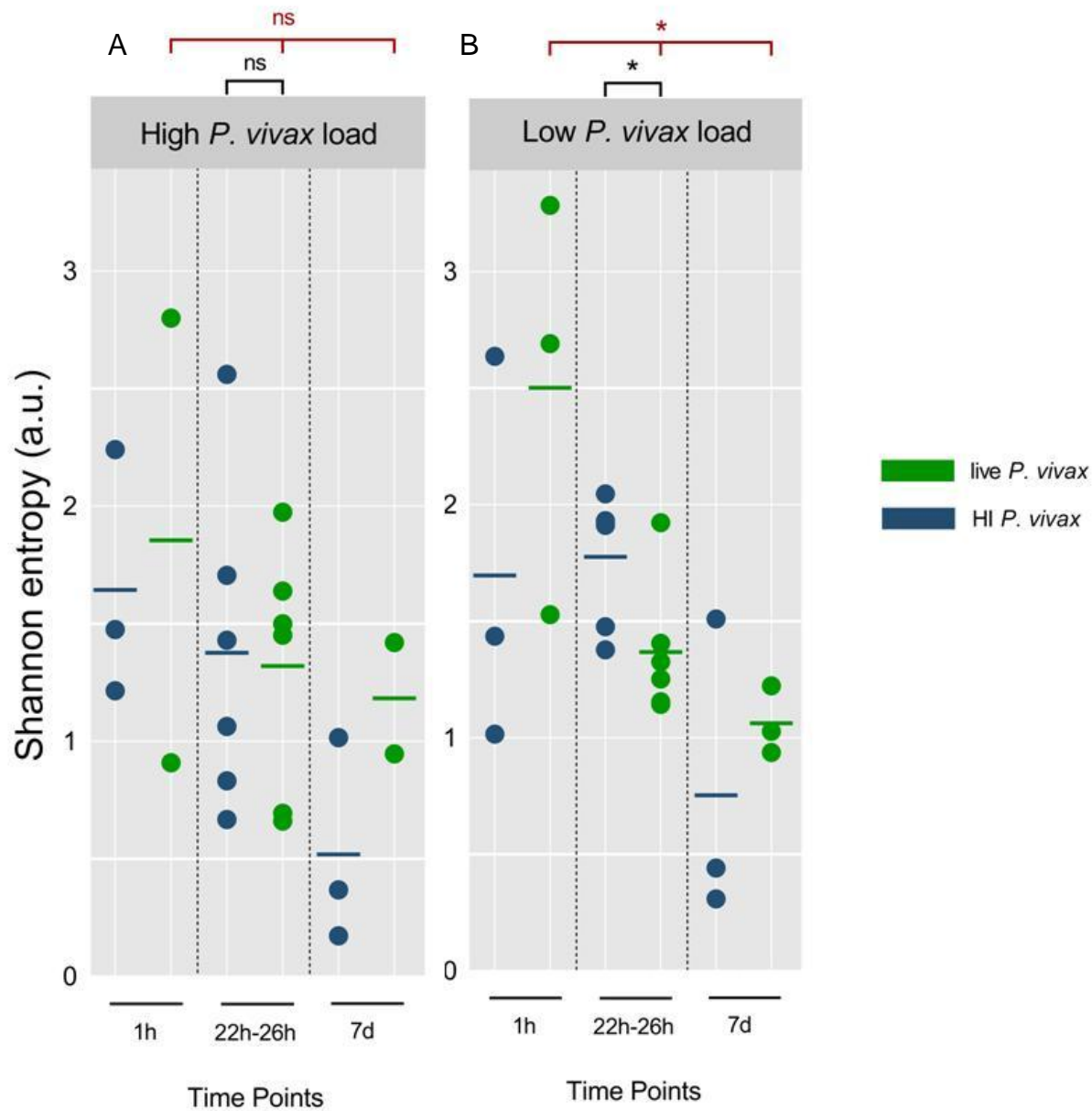
**Figura 10: Gráfico resultante da análise de diversidade *alpha*.** Cada amostra está disposta no gráfico de forma que o eixo horizontal representa o número de *reads* sequenciados, enquanto o eixo vertical os índices de heterogeneidade de Simpson.

Além disso, os mosquitos que ingeriram os parasitas vivos apresentaram um perfil de diminuição de diversidade bacteriana ao longo do tempo. Sobretudo, os que exibiram baixa infecção por *Plasmodium* (com validação estatística por ANOVA, cujo: P: 0,0266 para Simpson; e Shannon P: 0,0078). A partir das figuras 11 e 12, nota-se também que no momento da passagem dos oocistos pelo intestino (em 22-26h) em baixa infecção, há significativa redução da diversidade bacteriana ao comparar grupo controle e experimental.



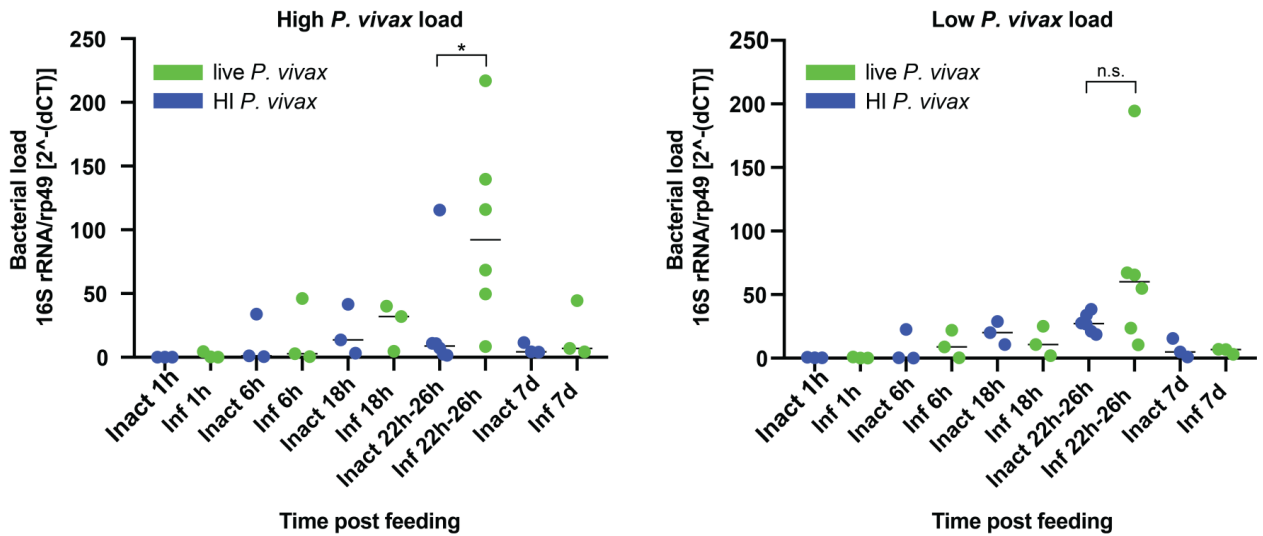
**Figura 11: Gráfico de diversidade alpha estimado através do índice de Simpson para alta e baixa infecção por *P. vivax*.**

Em azul estão representados os mosquitos que ingeriram os parasitas inativados, e em verde parasitas vivos. A: mosquitos que apresentaram alta infecção por *Plasmodium*, B: mosquitos que apresentaram baixa infecção por *Plasmodium*. Com validação estatística por teste T, cujo: \* =  $p < 0.05$  e por ANOVA (em vermelho no gráfico) cujo: \* =  $p < 0.05$ .



**Figura 12: Gráfico de diversidade alpha estimado através do índice de Shannon para alta e baixa infecção por *P. vivax*.** Em azul estão representados os mosquitos que ingeriram os parasitas inativados, e em verde parasitas vivos. A: mosquitos que apresentaram alta infecção por *Plasmodium*, B: mosquitos que apresentaram baixa infecção por *Plasmodium*. Com validação estatística por teste T, cujo: \* =  $p < 0.05$  e por ANOVA (em vermelho no gráfico) cujo: \* =  $p < 0.05$ .

Todavia, em alta infecção não houve alteração significativa da diversidade neste mesmo ponto do tempo (figura 11A e 12A). Apesar de não ter sido observada diferença na diversidade, pode-se constatar que há um aumento da carga bacteriana no grupo experimental de alta infecção, em 22h-26h (figura 13).

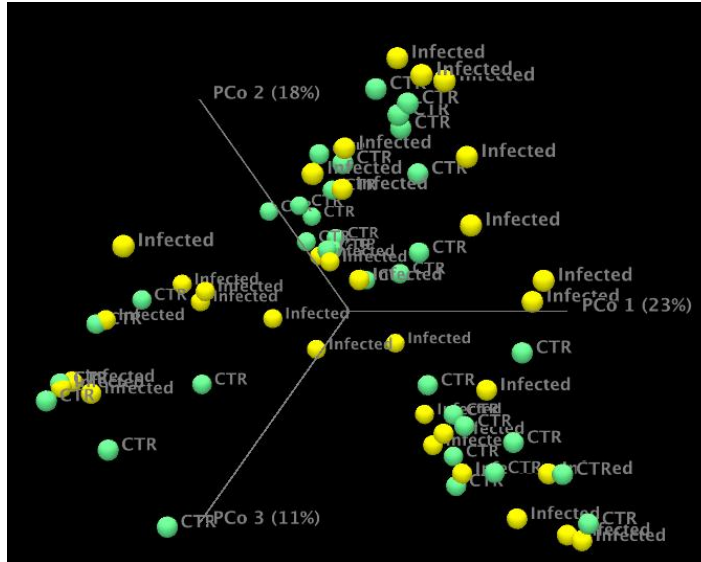


**Figura 13: Carga bacteriana avaliada através de expressão gênica relativa.** Com validação estatística por Mann-Whitney, cujo: \* =  $p < 0,05$ . A expressão do gene foi normalizada em função do *housekeeping* RP49. Em azul estão representados os mosquitos que ingeriram os parasitas inativados, e em verde os parasitas vivos.

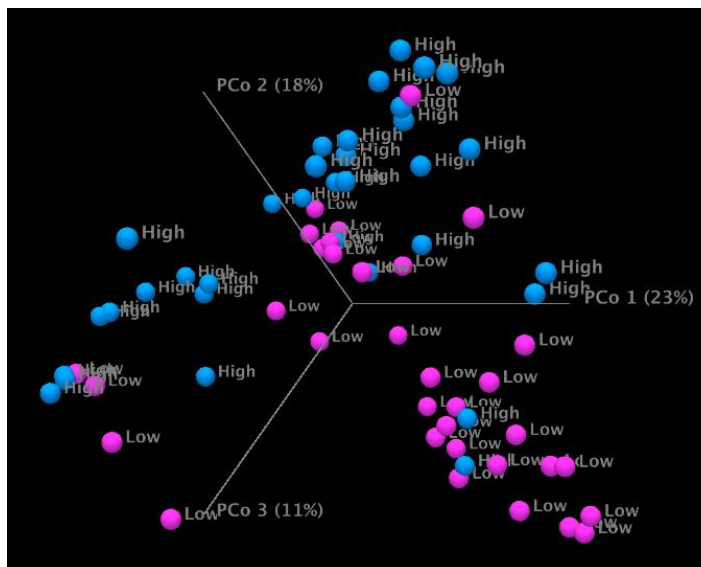
Ao passo que uma medida de diversidade *alpha* estima a diversidade taxonômica dentro de uma determinada amostra, a *beta* age inferindo a similaridade ou diferença entre amostras (Morgan e Huttenhower, 2012). Para estabelecer estas relações de dissimilaridade, utilizamos a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), utilizando a medida de Bray-Curtis.

Foram realizadas análises distintas de PcoA, primeiramente com bases nas condições experimentais (grupo controle e experimental), porém não foi observado agrupamento expressivo (figura 14). Todavia, ao observar os *clusters* gerados na figura 15, nota-se uma tendência maior das amostras a se agruparem de acordo com a intensidade da infecção por *Plasmodium* (Valor de P para PERMANOVA: 0,00003). Ainda, quando foram executadas análises de PcoA para os distintos pontos do tempo após alimentação, individualmente, distinguiu-se amostras controle e infectadas, não obtivemos resultados estatisticamente significativos para nenhum dos tempos analisados (figura 16). Porém, quando as amostras dos diferentes pontos de tempos foram avaliadas considerando-se os níveis de infecção, obteve-se

significância estatística em 18h (como pode se observar na figura 17C) (Valor de P para PERMANOVA:0,00216 ) e 22h-26h (Valor de P para PERMANOVA: P:0,01267) (figura 17D).

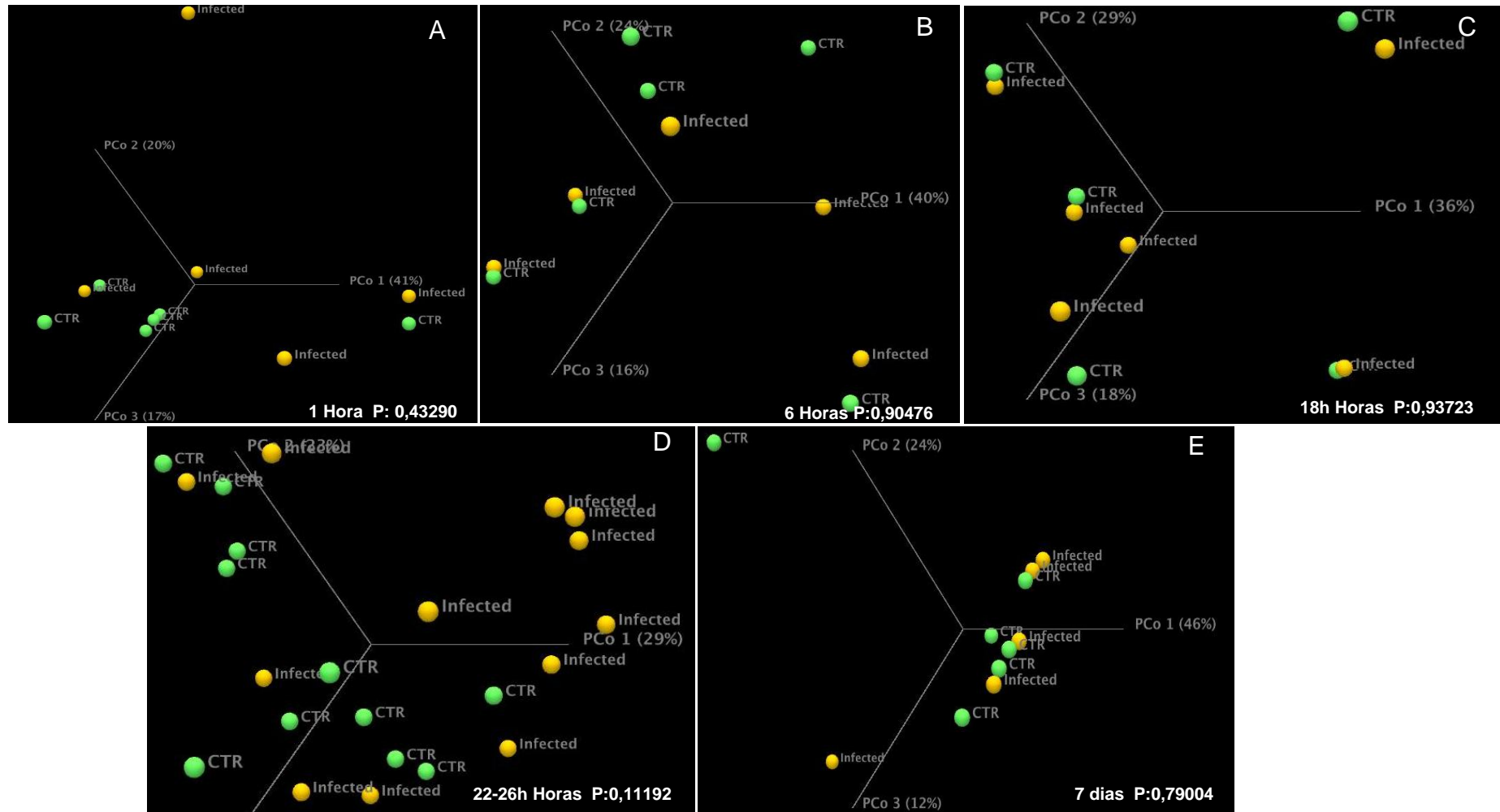


**Figura 14: Análise de *Beta* diversidade por condições experimentais.** Ilustrando o grupo controle (CTR- que ingeriu parasita inativo) em verde e o infectado na cor amarela.

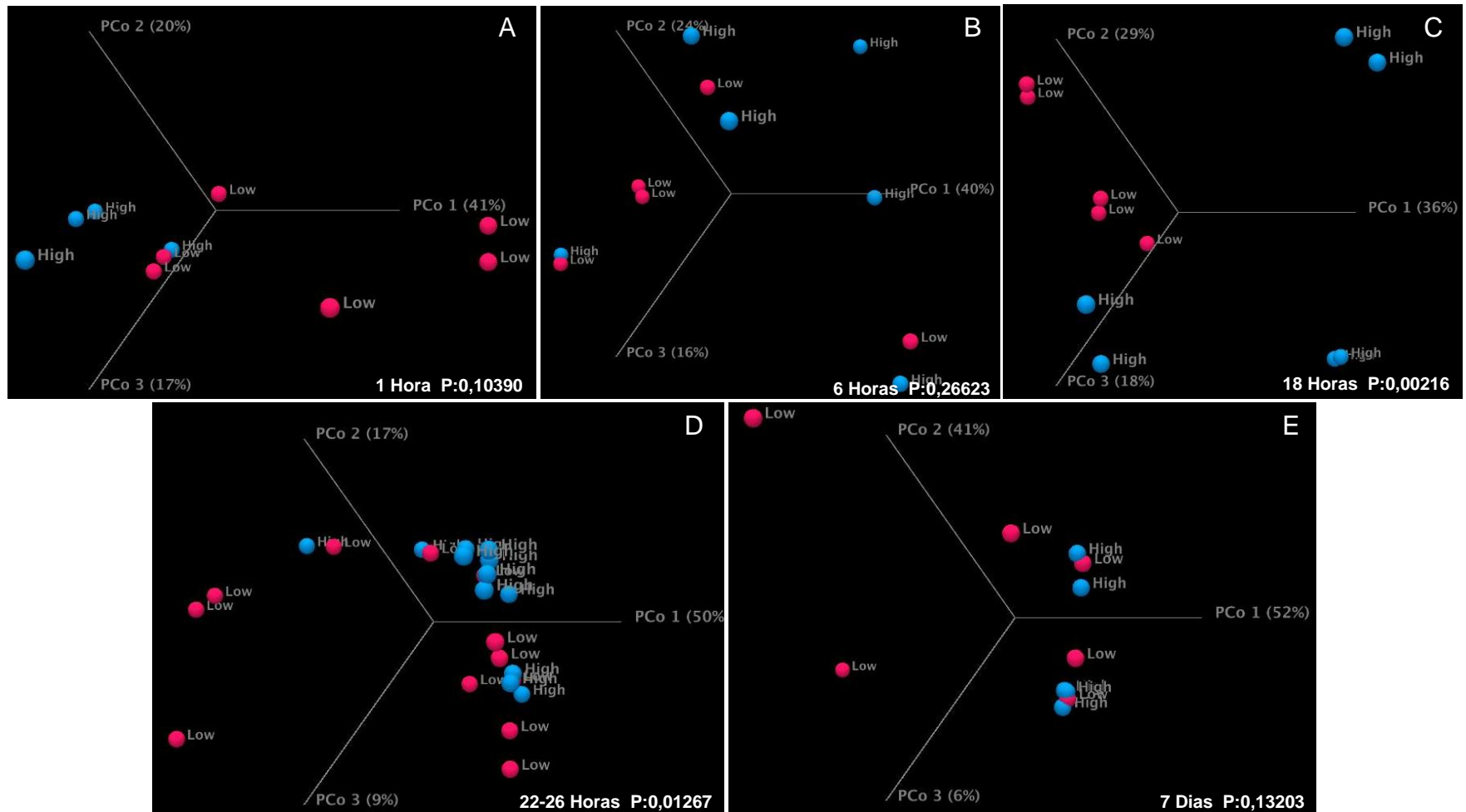


**Figura 15: Análise de *Beta* diversidade por intensidade de infecção.** Ilustrando baixa infecção por *P. vivax* em rosa, e alta infecção na cor azul.





**Figura 16: Análise de *Beta* diversidade por pontos do tempo, dividindo as amostras em grupo controle e experimental.** Ilustrando o grupo controle (CTR- parasita inativo) em verde e o infectado na cor amarela. A: 1 hora, B: 6 horas , C: 18 horas, D: 22-26 horas, E: 7 dias.



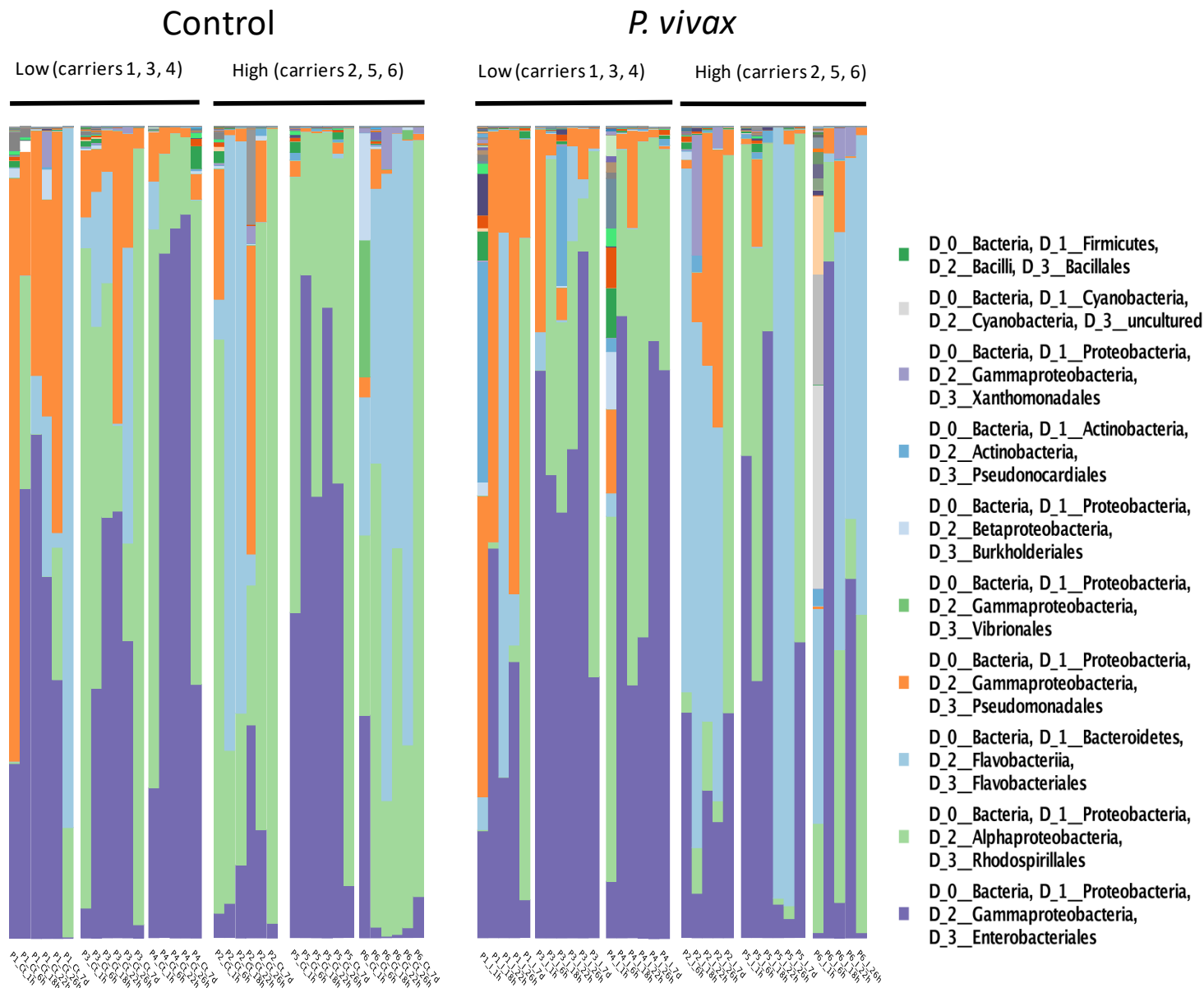
**Figura 17: Análise de *Beta* diversidade por pontos do tempo, separando as amostras por intensidade de infecção. Ilustrando baixa infecção por *P. vivax* em rosa, e alta infecção na cor azul. A: 1 hora, B: 6 horas, C: 18 horas, D: 22-26 horas, E: 7 dias.**

## 11.2 Análises da composição taxonômica bacteriana

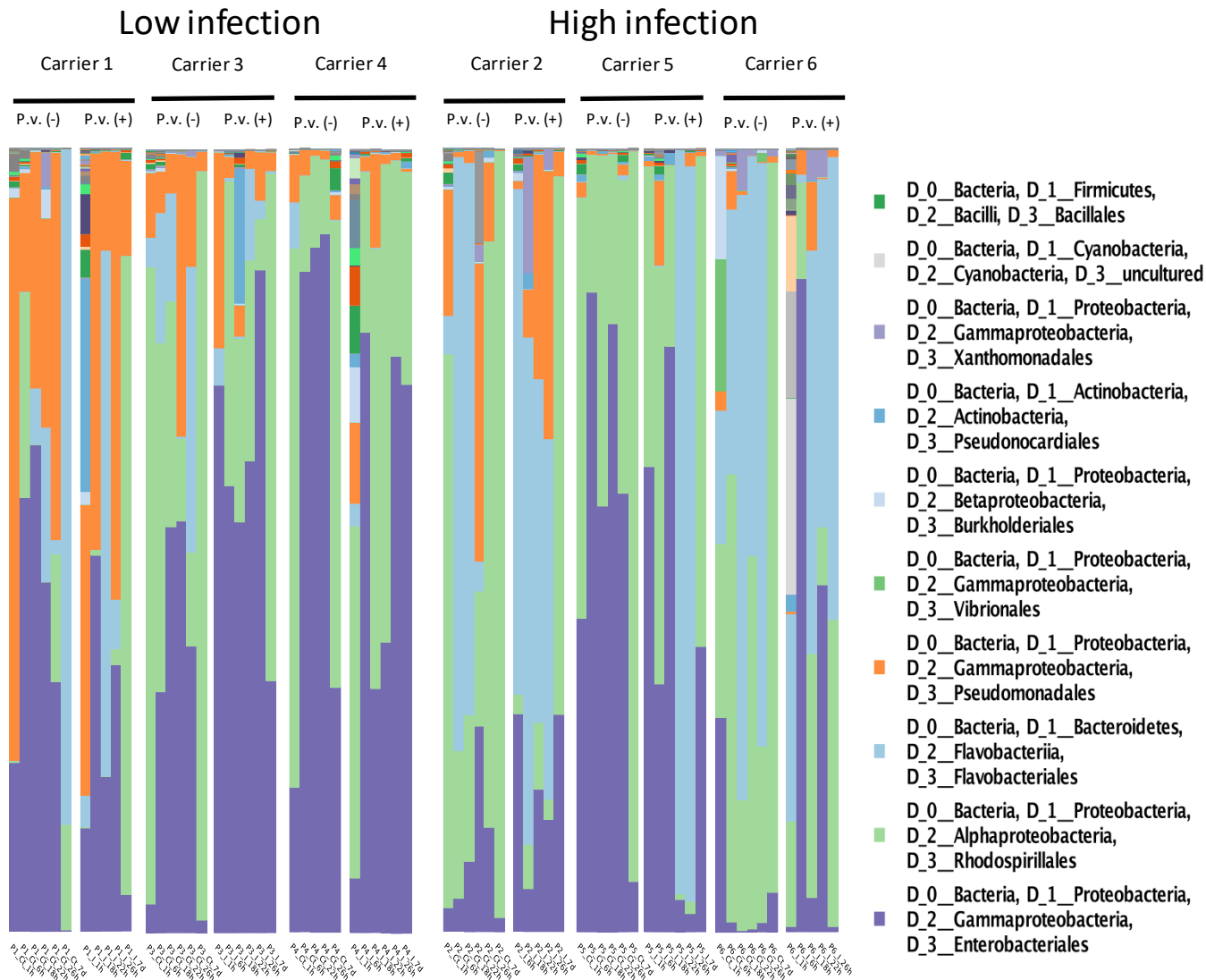
O agrupamento mais evidente em nossas análises *Beta* ocorreu de acordo com a intensidade da infecção por *Plasmodium vivax*, ao invés da formação de *clusters* por grupos experimentais. Em virtude disso, parte de nossas análises de abundância da composição taxonômica bacteriana foram realizadas tomando como base apenas os níveis de infecção por *Plasmodium vivax*.

Além disso, a composição bacteriana demonstrou-se extremamente similar entre grupo controle e experimental (figura 18). Todavia, as bactérias demonstraram porcentagens de abundância distintas em alta e baixa infecção por *Plasmodium* (figura 19).

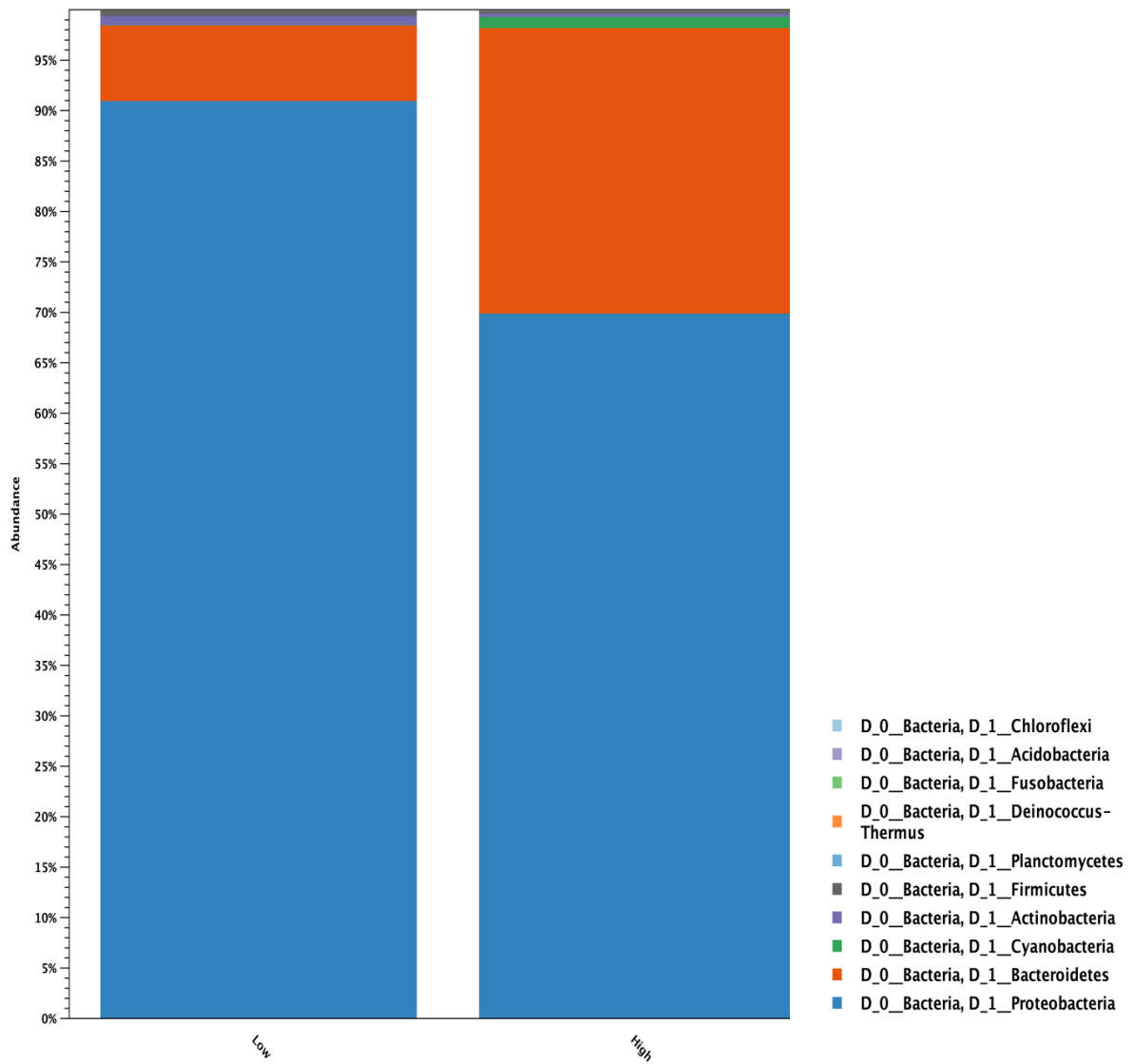
Dos dez filos encontrados em nossas análises, daremos enfoque inicialmente, aos filos Proteobacteria e Bacteroidetes, em virtude de maior abundância nas amostras (figura 20). As classes pertencentes a estes filos encontradas com maior representatividade são: Gamaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Flavobacteria (figura 21). É possível destacar que Gamaproteobacteria é encontrada em maior frequência nos mosquitos que apresentaram baixa infecção por *P. vivax* em contraposição aos mosquitos com alta infecção, em que é observada em menor proporção. Já o oposto ocorre com Flavobacteria, a qual é observada em menor quantidade nas amostras com baixa infecção por *P. vivax*. Além disso, em nível de família Flavobacteriaceae também prevaleceu em alta infecção, e Enterobacteriaceae (pertencente à Gamaproteobactéria) é observada em maior quantidade nos mosquitos que apresentaram baixa quantidade de *P. vivax* (figura 23). Quanto à classe Alphaproteobactéria, não foi encontrada diferença expressiva em sua proporção de abundância relativa, o mesmo ocorre em nível de família: com Acetobacteriaceae, tendo proporções similares em baixa e alta infecção (figura 23). Quando analisamos os gêneros de bactérias identificadas em nossos experimentos, os observados em maior abundância são *Asaia*, *Pantoea*, *Elizabethkingia* e *Serratia* tanto em alta, bem como em baixa infecção (figura 24). Todavia, é possível observar diferenças nas proporções em que estes gêneros aparecem nas duas condições.



**Figura 18:** Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de ordem para cada amostra, separadas pela condição experimental. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada ordem bacteriana, enquanto o eixo horizontal apresenta as diferentes amostras. P.v (-) : Controle (parasita inativado), P.v (+) Grupo experimental.

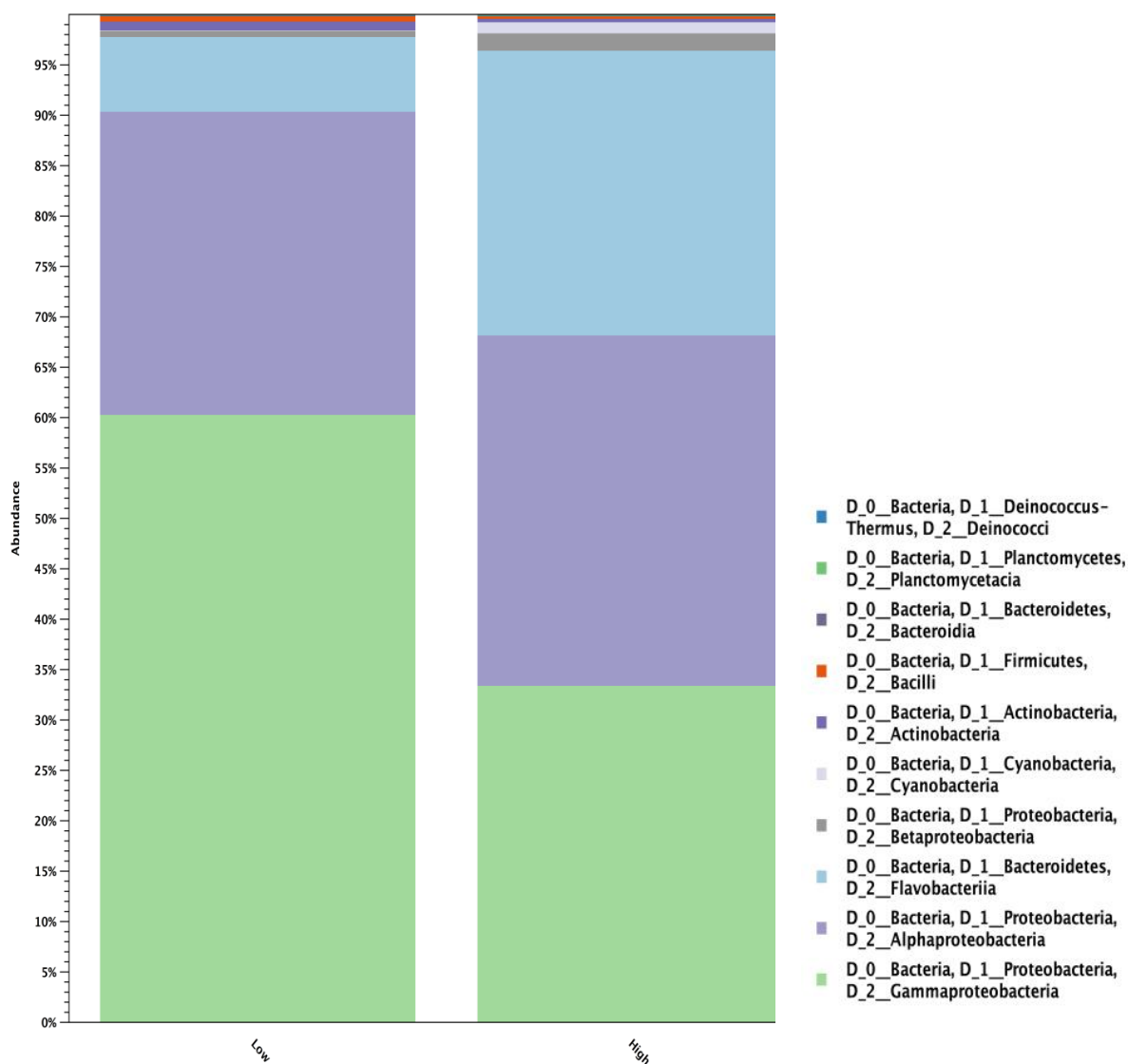


**Figura 19: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de ordem para cada amostra, separadas por nível de infecção por *Plasmodium*. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada ordem bacteriana, enquanto o eixo horizontal apresenta as diferentes amostras. P.v (-) : Controle (parasita inativado), P.v (+) Grupo experimental.**

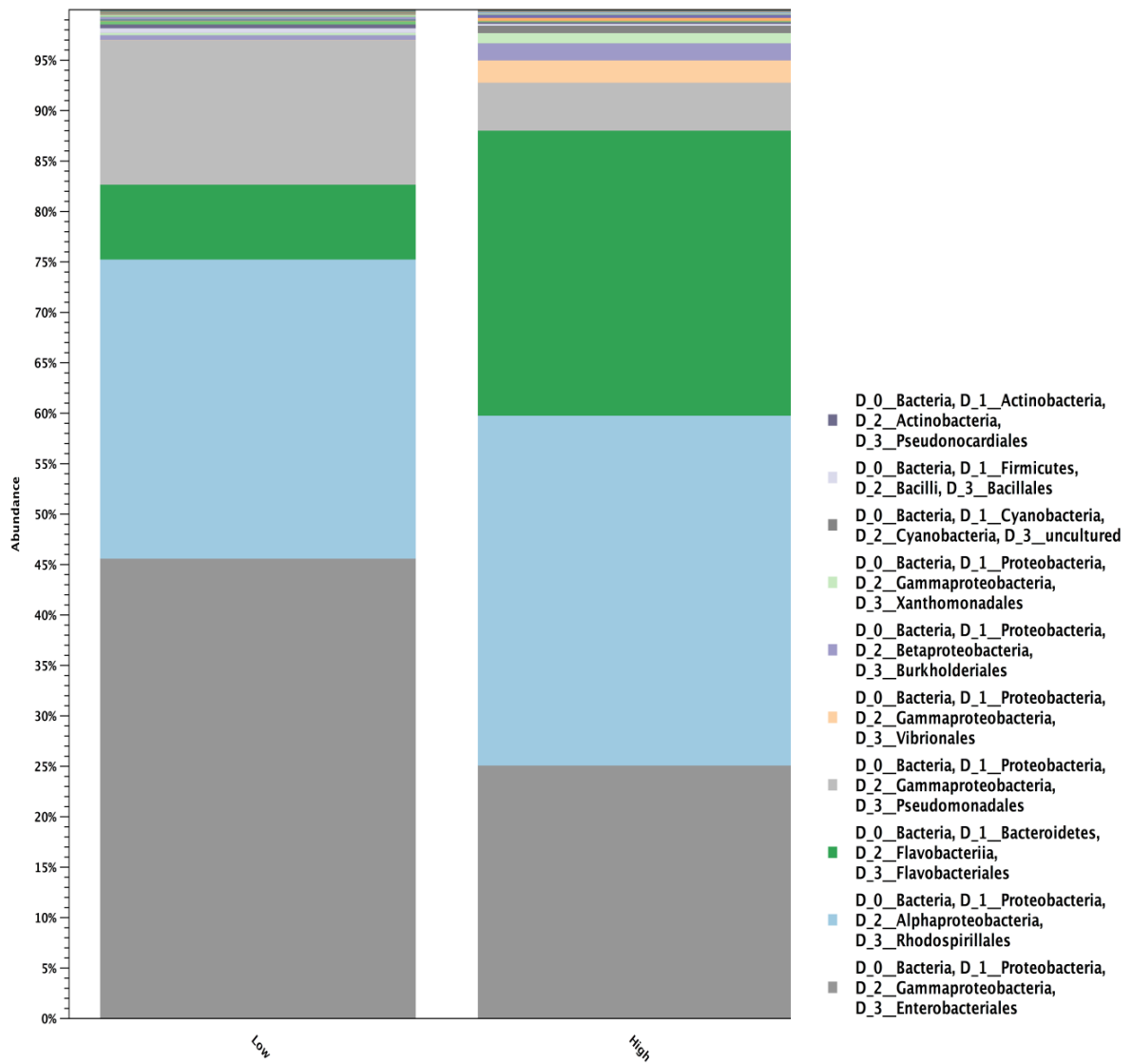


**Figura 20: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Filo.**

O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada filo bacteriano, enquanto o eixo horizontal apresenta os níveis de infecção por *Plamodium*.

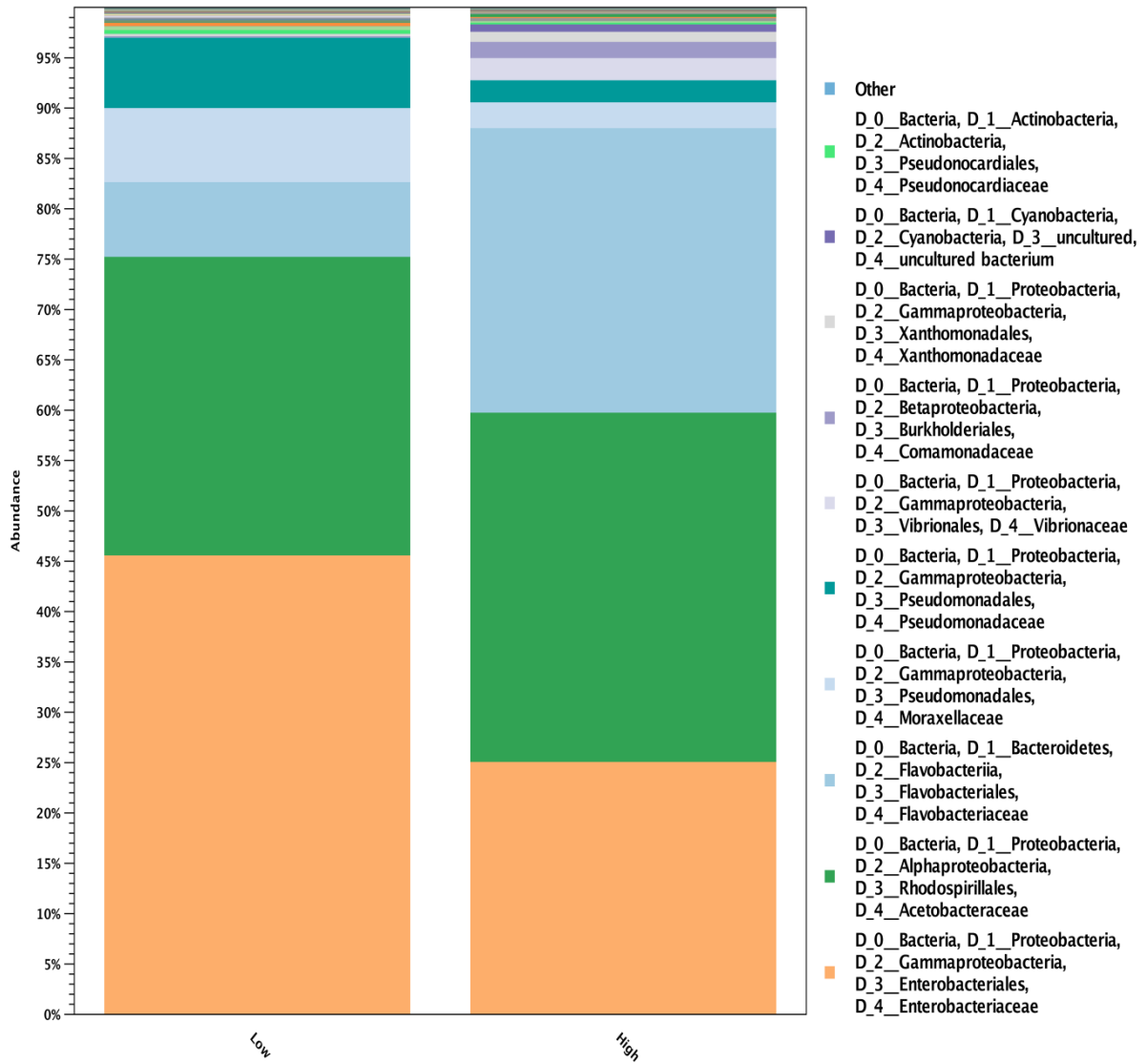


**Figura 21:** Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de **Classe**. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada classe bacteriana, enquanto o eixo horizontal representa os níveis de infecção por *Plamodium*.

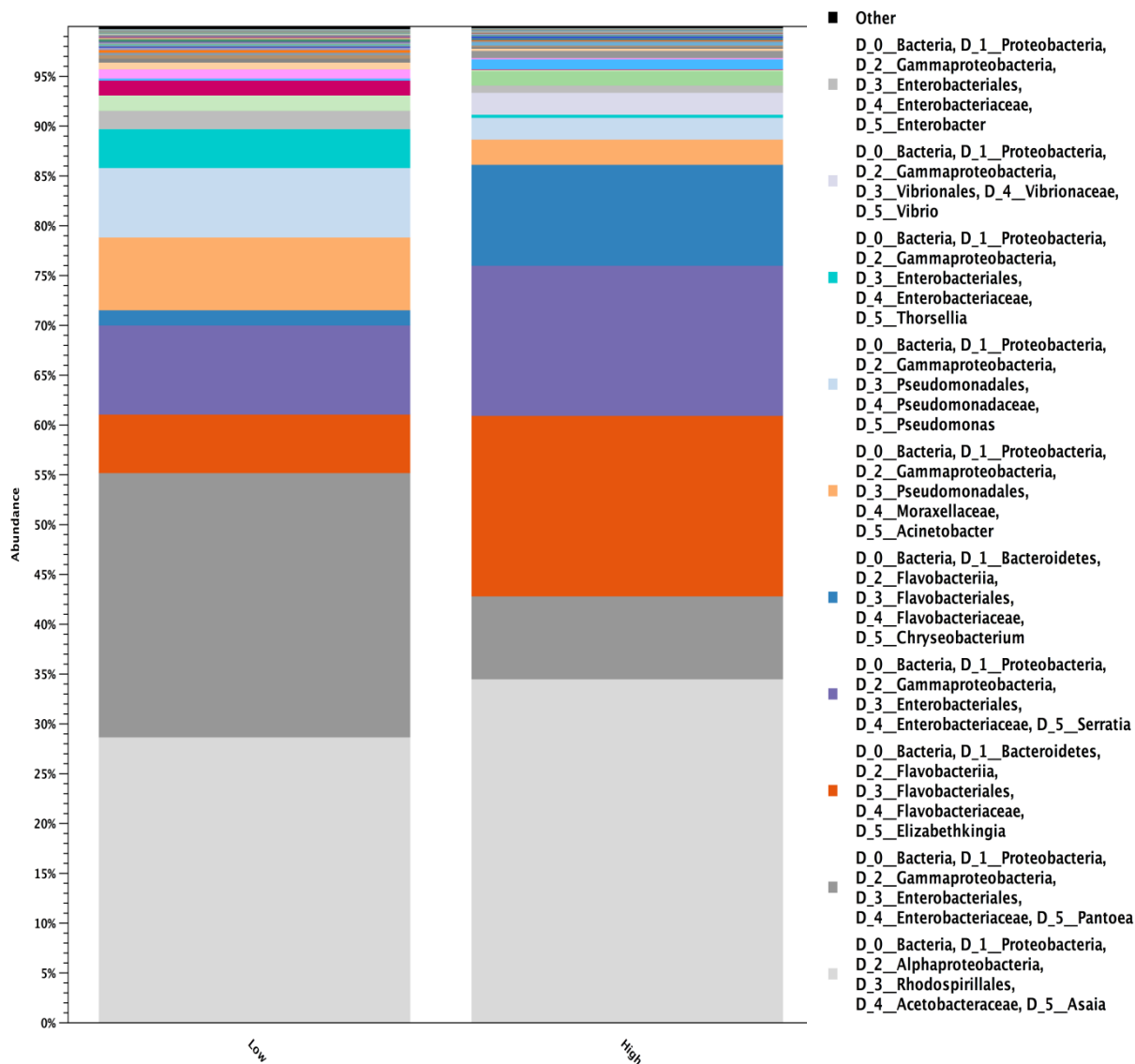


**Figura 22: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem.** O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada ordem bacteriana, enquanto o eixo horizontal representa os níveis de infecção por *Plamodium*.





**Figura 23: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Família.** O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada família bacteriana, enquanto o eixo horizontal representa os níveis de infecção por *Plasmodium*.



**Figura 24:** Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de gênero. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada gênero bacteriano, enquanto o eixo horizontal representa os níveis de infecção por *Plamodium*

## 12. DISCUSSÃO

Novas estratégias para controle da disseminação das doenças transmitidas por artrópodes se fazem extremamente necessárias. Desta forma, nos últimos anos os estudos envolvendo as relações microbiota- vetor- patógeno em mosquitos transmissores de doenças têm sido priorizados e intensificados, uma vez que a microbiota demonstrou ter papel determinante na competência vetorial destes insetos (Bourtzis et al., 2014; Ngo et al., 2016). Estudos prévios sugeriram a existência de um grupo principal de bactérias associadas de modo estável com hospedeiros do gênero *Anopheles*. Entretanto, a insuficiência de informações sobre os vetores neotropicais pode dificultar a definição de uma microbiota central e a melhor compreensão dessa interação mosquito-bactéria (Villegas e Pimenta, 2014). Ainda, cabe salientar que os estudos sobre *A. darlingi*, um dos principais vetores neotropicais, sendo o mais relevante na América do Sul, são extremamente escassos, principalmente no que se refere à sua microbiota intestinal. Por conseguinte, nós fornecemos aqui algumas informações sobre a comunidade microbiana do intestino deste importante transmissor de malária.

Ao analisar a diversidade *alpha* utilizando-se os índices de Simpson e entropia de Shannon que levam em conta riqueza, uniformidade das amostras e abundância de cada OTU, dando mais peso para as OTUs mais abundantes e menos abundantes, respectivamente (Hill et al., 2003), observou-se uma tendência à diminuição da diversidade bacteriana ao longo do tempo. Essa diminuição pode ser constatada tanto para o índice de Simpson (figura 11), bem como para Shannon (figura 12), o que sugere que essa dinâmica de diminuição da diversidade não é dependente do peso que se dá para OTUs raras ou mais abundantes.

Todavia, esta diminuição foi estatisticamente significativa apenas em baixa infecção por *Plasmodium* para o grupo experimental, ou seja, que recebeu parasitas vivos. É possível que este comportamento de diminuição da diversidade esteja envolvido com algum mecanismo que possibilite a sobrevivência do parasita. Bahia et al. (2013) relatam que *P. vivax* pode modular o sistema de desintoxicação do mosquito inibindo enzimas antioxidantes, para permitir seu próprio desenvolvimento, diminuindo a microbiota. Da mesma forma, é possível que este mecanismo esteja ocasionando diminuição da diversidade microbiana em nosso estudo.

Ademais, em um transcriptoma realizado em nosso laboratório com as mesmas amostras utilizadas no presente trabalho, observou-se uma maior expressão de genes imunes em baixa infecção e redução da expressão de genes imunes em alta infecção. Esta maior

expressão de genes imunes também poderia explicar a redução da diversidade microbiana em baixa infecção por *Plasmodium*.

Além disso, essa redução da expressão gênica em alta infecção pode ser a causa do aumento na carga bacteriana em relação ao controle, no momento da passagem dos oocistos pelo intestino (22-26h) (figuras 13). No entanto, não foi detectado aumento significativo na baixa infecção, possivelmente devido a maior expressão de genes imunes.

Quanto à beta diversidade, não foi observado agrupamento por condições experimentais, a forma mais evidente de agrupamento em nossas análises foi de acordo com os níveis de infecção por *Plasmodium*. Além disso, também não detectamos diferença na composição e análises de abundância combinada entre grupo controle (que ingeriram parasitas inativados e, portanto, incapazes de invadir o intestino médio) e grupo experimental (que recebeu *P. vivax* vivo).

Considerando-se que a ativação das respostas imunes contra patógenos ocorre por meio da identificação de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), é possível que algum PAMP de *P. vivax*, mesmo com o parasita inativado, tenha sido reconhecido e desta forma, ocasionado a ativação das vias imunes do mosquito. Consequentemente, não havendo diferenças significativas entre a microbiota de mosquitos infectados e controle.

Ademais, Dong et al. (2006) avaliaram a expressão gênica de mosquitos frente a oocinetos de *P. falciparum* e *P. berghei* capazes de invadir o intestino médio e de oocinetos nocautes (não invasores), e constataram que ambos induziram a expressão de genes relacionados à imunidade de forma equivalente. Ou seja, é possível que o mosquito seja capaz de detectar componentes no sangue infectado mesmo na ausência de oocinetos invasores, induzindo assim respostas imunes anti-*Plasmodium*. Isso também explicaria o fato de não termos observado diferenças na microbiota entre grupo controle (com o parasita inativado) e experimental. Estes autores ainda destacam que essa capacidade de responder ao sangue infectado mesmo na ausência de invasão do oocineto, teria papel importante para controle da infecção por *Plasmodium*. Este mecanismo permitiria a produção de fatores anti-*Plasmodium* previamente a invasão epitelial.

Além disso, Dong et al. (2006) observaram um menor número de genes imunes modulados por *P. berghei* (que naturalmente produz uma maior quantidade de oocistos) e sugerem que o reconhecimento deste *Plasmodium* seria capaz de suprimir, de alguma forma, a resposta imunológica do mosquito, e isso justificaria níveis mais elevados de infecção do parasita de roedores *P. berghei* em *A. gambiae*.

Estes resultados também corroboram nossos dados uma vez que as diferenças observadas na abundância e composição bacteriana são ao comparar os níveis de alta e baixa infecção por *Plasmodium* (figuras 18-23) e no transcriptoma realizado em nosso laboratório, como mencionado anteriormente, em alta infecção por *Plasmodium* há menor expressão de genes imunes.

Como o agrupamento que ficou mais evidente em nossas análises *Beta* foi de acordo com os níveis de infecção por *Plasmodium* ao invés da formação de *clusters* por grupos experimentais, a discussão quanto a caracterização da microbiota será tomando como base apenas os níveis de infecção independentemente dos grupos experimentais.

A microbiota encontrada neste estudo, compreende dez filos no intestino médio dos mosquitos adultos, como pode ser observado na figura 20 (Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobactéria, Actinobactéria, Firmicutes, Plantomycetes, Deinococcus-Thermus, Fusobacteria, Acidobactéria e Chloroflexi). Além disso, apresenta semelhanças com comunidades microbianas intestinais de outros invertebrados, incluindo outras espécies de mosquitos. Por exemplo, em estudos prévios (como o de Gimonneau et al., 2014 e Duguma et al., 2015) envolvendo microbiota dos gêneros *Anopheles* e *Culex*, também foi observada uma maior predominância do filo Proteobactéria. Ademais, neste estudo foram encontradas em maior abundância três classes: Gammaproteobactéria, Alphaproteobactéria, e Flavobactéria, pertencentes ao filo Proteobactéria.

Ainda, dentre as bactérias detectadas neste estudo, grande parte dos gêneros foram previamente identificados na população microbiana de anophelinos. Dentre estes, merecem destaque *Pantoea* e *Pseudomonas* que do mesmo modo foram identificadas por Terenius et al. (2008) em *A. darlingi* adultos alimentados com sangue de pato.

Gendrin e Chistophides (2013) reuniram dados que somam dez gêneros de bactérias encontradas em *A. darlingi*: *Aeromonas*, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia-Shigella*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, todos pertencentes ao filo proteobactéria e à classe Gammaproteobactéria. Esses dados corroboram nossos resultados, uma vez que a classe encontrada em maior abundância também foi Gammaproteobactéria. Todavia, dentre estes gêneros, encontramos em nosso trabalho apenas *Enterobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas*. Tal fato possivelmente se dá em virtude de nosso modelo experimental ser advindo de colônia laboratorial e os dados apresentados por Gendrin e Chistophides (2013) considerarem tanto mosquitos de colônia, bem como de campo. É sabido que diferenças drásticas podem ocorrer entre a microbiota de mosquitos de colônias laboratoriais e de

mosquitos de campo, incluindo perda de diversidade microbiana (Boissière et al., 2012).

Em nosso estudo, Gammaproteobactéria foi encontrada em maior abundância nas amostras de mosquitos com baixa infecção por *P. vivax*, ao passo que Flavobactéria é encontrada em maior proporção nos mosquitos com alta intensidade de oocistos. E isso se confirma ao olharmos o gráfico da figura 23, em nível taxonômico de família em que Flavobacteriaceae é observada em maior quantidade em alta infecção, isso sugere que esta família possa favorecer de algum modo *P. vivax* e, por conseguinte, aumentar o nível de infecção nos mosquitos. Flavobacteriaceae é frequentemente encontrada na microbiota de mosquitos de laboratório (Villegas e Pimenta, 2014). Akhouayri et al. (2013) relataram em *A. gambiae* uma patologia que ocasiona a formação de tumores melanóticos. Esta é ocasionada por *Elizabethkingia* (Flavobacteriales: Flavobacteriaceae), que em nosso estudo foi encontrada em maior proporção em alta infecção por *P. vivax*. Deste modo, devido à formação de tumores melanóticos nos tecidos do corpo gorduroso, principal órgão do sistema imune dos mosquitos, é possível que a presença dessa bactéria perturbe a resposta imune, ocasionando assim maior infecção por *P. vivax*.

Ao passo que Flavobacteriaceae é encontrada em maior proporção em alta infecção por *P. vivax*, Enterobacteriaceae é observada em maior abundância em baixa infecção, sugerindo que esta última possa atuar antagonizando a infecção com *P. vivax*. Tal fato corrobora os dados de Cirimotich et al. (2011), que identificaram uma cepa de *Enterobacter* capaz de inibir o desenvolvimento de *P. falciparum* através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, Gonzalez-Ceron et al. (2003) sugerem que espécies distintas de *Enterobacter* são capazes de modular a infecção por *P. vivax* em *A. albimanus*. No qual merece destaque *Pantoea spp.* que foi previamente relacionada ao bloqueio de *P. falciparum* em *A. gambiae*. Todavia, Boissière et al. (2012), em *Anophles gambiae*, sugeriram que bactérias da família *Enterobacteriaceae* no intestino do mosquito favoreceriam o desenvolvimento *P. falciparum*, revelando que a interação entre esta família de bactérias e *Plasmodium* merece maior atenção e estudos.

Como previamente relatado por Wong et al. (2013), o intestino é um habitat vivo e interações coevolutivas entre microbiota e o animal podem ocorrer. Essas interações podem ser antagônicas (competição e amensalismo) ou positivas (comensalismo e mutualismo). Em nosso trabalho Flavobacteriaceae e Enterobacteriaceae coocorrem de modo inversamente proporcional. Isto pode refletir alguma relação ecológica entre essas bactérias, possivelmente uma relação de competição. O mesmo tipo de interação ocorre com a microbiota humana.

Faust et al. (2012) constataram que grande parte das relações existentes na microbiota humana é negativa, sugerindo, assim, que processos como a competição e a diferenciação de nicho podem ter papel fundamental na definição da estrutura da comunidade microbiana. Considerando-se que as interações positivas favoreceriam a manutenção de um microbioma central, em contraposição, interações negativas limitariam a coocorrência microbiana, levando à variação na composição da microbiota entre os indivíduos hospedeiros (Wong et al., 2013).

Deste modo, estudos sobre a microbiota de *A. darlingi* podem fornecer melhor compreensão e entendimento sobre a estruturação microbiana em anophelinos e melhor elucidar questões ainda não totalmente esclarecidas, como a composição de uma microbiota “central” nesses mosquitos.

### 13. CONCLUSÕES

- Proteobacteria foi o filo com maior predominância dentre todos os encontrados nesse estudo.
- Foram encontradas em maior proporção três classes bacterianas: Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, e Flavobacteria.
- Gammaproteobactéria foi encontrada em maior abundância nas amostras de mosquitos apresentando baixa infecção com *P. vivax*.
- Flavobactériaceae é encontrada em maior proporção nos mosquitos que apresentaram alta infecção com *P. vivax*. Isso sugere que esta família bacteriana, de alguma maneira, possa favorecer o parasita e, por conseguinte, aumentar sua carga nos mosquitos.
- Enterobacteriaceae é observada em maior abundância nos mosquitos apresentando baixa infecção com *P. vivax*, sugerindo que esta família possa antagonizar o parasita, a exemplo do que ocorre com *P. falciparum*.

## 14. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1S. Número de oocistos por intestino

With inactive blood						Without inactivating the blood					
Pacient 1		Pacient 2		Pacient 3		Pacient 4		Pacient 5			
Lacz	LRIM1	Lacz	LRIM1	Lacz	LRIM1	Lacz	LRIM1	Lacz	LRIM1		
I1	105	I1	23	I1	132	I1	140	I1	35	I1	25
I2	42	I2	25	I2	114	I2	38	I2	3	I2	10
I3	70	I3	20	I3	34	I3	18	I3	0	I3	40
I4	1	I4	1	I4	141	I4	70	I4	1	I4	3
I5	170	I5	70	I5	156	I5	73	I5	19	I5	0
I6	38	I6	56	I6	47	I6	46	I6	37	I6	14
I7	78	I7	3	I7	61	I7	1	I7	62	I7	6
I8	0	I8	104	I8	75	I8	17	I8	0	I8	14
I9	60	I9	40	I9	123	I9	66	I9	6	I9	22
I10	29	I10	120	I10	41	I10	68	I10	4	I10	8
I11	1	I11	67	I11	35	I11	85	I11	0	I11	6
I12	90	I12	64	I12	0	I12	113	I12	49	I12	2
I13	36	I13	96	I13	68	I13	97	I13	18	I13	6
I14	36	I14	147		I14	9	I14	41	I14	25	
I15	59	I15	101				I15	21	I15	48	
I16	138	I16	149				I16	33	I16	0	
I17	84	I17	145				I17	2	I17	5	
	I18	74					I18	16			
									I18	36	



I19	32		I19	3		I19	38
I20	52		I20	9		I20	15
I21	48		I21	1		I21	35
I22	76		I22	2		I22	29
I23	123		I23	0		I23	21
			I24	12		I24	97
			I25	1		I25	43
			I26	0		I26	28
			I27	1		I27	33
			I28	9		I28	29
			I29	31		I29	17
			I30	1		I30	86
			I31	39			
			I32	10			
			I33	56			
			I34	0			
			I35	19			
			I36	13			
			I37	32			

Para cada condição experimental: *dsLacZ* ou *dsLRIM* na tabela, a primeira coluna se refere a identificação do intestino de cada mosquito dissecado, e a coluna da esquerda representa a quantidade de oocistos observada em cada intestino.

**Tabela 2S: Informações sobre as análises de infecção.**

<b>With inactive blood</b>						
<b>Patient 1</b>			<b>Patient 2</b>		<b>Patient 3</b>	
	<b>LacZ</b>	<b>LRIM1</b>	<b>LacZ</b>	<b>LRIM1</b>	<b>LacZ</b>	<b>LRIM1</b>
<b>Number of midguts analyzed</b>	17	23	13	14	17	37
<b>Range</b>	0-170	1-149	0-156	1-140	0-62	0-48
<b>Median</b>	59	67	68	67	9	8
<b>Prevalence</b>	100%	100%	92%	100%	83,7%	88,2%
<b>Gametocytemia</b>	330		330		270	

<b>Without inactivating the blood</b>				
	<b>Patient 4</b>		<b>Patient 5</b>	
	<b>LacZ</b>	<b>LRIM1</b>	<b>LacZ</b>	<b>LRIM1</b>
<b>Number of midguts analyzed</b>	8	8	30	16
<b>Range</b>	0-39	0-23	0-86	0-89
<b>Median</b>	6	15,5	29	19,5
<b>Prevalence</b>	87,50%	87,50%	93,30%	87,50%
<b>Gametocytemia</b>	360		630	

Informações detalhadas para todos os testes de infecção. São mostrados o número total de intestinos analisados, variação do número de oocistos, mediana de oocistos, prevalência de infecção e gametocitemia

## 15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhouayri IG, Habtewold T, Christophides GK. **Melanotic Pathology and Vertical Transmission of the Gut Commensal *Elizabethkingia meningoseptica* in the Major Malaria Vector *Anopheles gambiae*.** *PLoS One*. 2013, 8: e77619.

Armistead JS, Adams JH. **Advancing Research Models and Technologies to Overcome Biological Barriers to *Plasmodium vivax* Control.** *Trends Parasitol*. 2018, 34:114-126.

Bahia AC, Oliveira JH, Kubota MS, Araujo HR, Lima JB, Rios-Velasquez CM, Lacerda MV, Oliveira PL, Traub-Csekö YM, Pimenta PF. **The role of reactive oxygen species in *Anopheles aquasalis* response to *Plasmodium vivax* infection.** *PLoS One*. 2013,8:e57014.

Barbosa-de-Oliveira, S. **Estudo de genes relacionados à resposta imune de vetores brasileiros de *Plasmodium vivax*.** Tese (Mestrado em biologia) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte. 2009, 80 f.

Baxter RH, Steinert S, Chelliah Y, Volohonsky G, Levashina EA, Deisenhofer J. **A heterodimeric complex of the LRR proteins LRIM1 and APL1C regulates complement-like immunity in *Anopheles gambiae*.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107:16817-22.

Blandin S, Levashina EA. **Mosquito immune responses against malária parasites.** *Curr Opin Immunol*. 2004, 16:16-20.

Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, Levashina EA. **Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*.** *Cell*. 2004 5;116:661-70.

Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, Shahbazkia HR, Awono-Ambene PH, Levashina EA, Christen R, Morlais I. **Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection.** *PLoS Pathog*. 2012, e1002742.

Bourtzis K, Dobson SL, Xi Z, Rasgon JL, Calvitti M, Moreira LA, Bossin HC, Moretti R, Baton LA, Hughes GL, Mavingui P, Gilles JR. **Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control.** *Acta Trop*. 2014, 132:S150-63.

Broderick, N A, Welchman, DP, Lemaitre B. Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. In: Rolf J, Reynolds, SE. **Insect infection and immunity: Evolution, ecology, and mechanisms**. 1. ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 2009.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. **Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms**. *ISME J*. 2012, 6:1621-4.

CDC – Centers for disease control and prevention. **Biology parasites**. Aboutt Malaria (2016). [<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>] Acesso em : 15/02/2018.

Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. **Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae***. *Immunol Rev*. 2004, 198:127-48.

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Müller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC. **Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae***. *Science*. 2002, 4:159-65.

Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos G. **Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae***. *Science*. 2011, 13;33:855-8.

Cirimotich CM, Dong Y, Garver LS, Sim S, Dimopoulos G. **Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection**. *Dev Comp Immunol*. 2010, 34: 387–395.

Clayton AM, Dong Y, Dimopoulos G. **The *Anopheles* innate immune system in the defense against malaria infection**. *J Innate Immun*. 2014, 6 :169-81.

Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L. **Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus***. *J Biol Chem*. 1993, 268:19239-45.

Cohuet A, Osta MA, Morlais I, Awono-Ambene PH, Michel K, Simard F, Christophides GK, Fontenille D, Kafatos FC. **Anopheles and Plasmodium: from laboratory models to natural systems in the field.** *EMBO Reports*. 2006,7:1285-1289.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. 1994.

Dillon RJ, Dillon VM. **The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions.** *Annu Rev Entomol*. 2004;49:71-92.

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:e52.

Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. **Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites.** *PLoS Pathog*. 2009 ,5:e1000423.

Duguma D, Hall MW, Rugman-Jones P, Stouthamer R, Terenius O, Neufeld JD, Walton WE. **Developmental succession of the microbiome of Culex mosquitoes.** *BMC Microbiol*. 2015, 15:140.

Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. **Killing the messenger: short rnas that silence gene expression.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2003, 4: 457-467.

Escalante AA, Ayala FJ. **Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 20; 92:5793-7.

Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, Huttenhower C. **Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome.** *PLoS Comput Biol*. 2012, e1002606.

Ferreira MU, Castro MC. **Challenges for malaria elimination in Brazil.** *Malaria Journal*. 2016,15:284.

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

Fraiture M, Baxter RH, Steinert S, Chelliah Y, Frolet C, Quispe-Tintaya W, Hoffmann JA, Blandin SA, Levashina EA. **Two mosquito LRR proteins function as complement**

**control factors in the TEP1-mediated killing of *Plasmodium*.** *Cell Host Microbe*. 2009, 5:273-84.

Frolet C, Thoma M, Blandin S, Hoffmann JA, Levashina EA. **Boosting NF-kappaB-dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts development of *Plasmodium berghei*.** *Immunity*. 2006, 25:677-85.

Gaio Ade O, Gusmão DS, Santos AV, Berbert-Molina MA, Pimenta PF, Lemos FJ. **Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.)** *Parasit Vectors*. 2011, 14:4:105.

Garver LS, Bahia AC, Das S, Souza-Neto JA, Shiao J, Dong Y, Dimopoulos G. ***Anopheles* Imd pathway factors and effectors in infection intensity-dependent anti-*Plasmodium* action.** *PLoS Pathog*. 2012, e1002737.

Gendrin M, Christophides GK. **The *Anopheles* mosquitoes microbiota and their impact on pathogen transmission** In: Manguin S, editor. *Anopheles* mosquitoes—New insights into malaria vectors. Rijeka, Croatia: InTech Open Access; 2013;pp. 525–548.

Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, Patil AP, Tatem AJ, Howes RE, Myers MF, George DB, Horby P, Wertheim HF, Price RN, Müller I, Baird JK, Hay SI. **A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010.** *PLoS Negl Trop Dis*. 2012, 6:e1814.

Gimonneau G, Tchioffo MT, Abate L, Boissière A, Awono-Ambéné PH, Nsango SE, Christen R, Morlais I. **Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages.** *Infect Genet Evol*. 2014, 28:715-24.

Giraldo-Calderón GI, Emrich SJ, MacCallum RM, Maslen G, Dialynas E, Topalis P, Ho N, Gesing S, VectorBase Consortium, Madey G, Collins FH, Lawson D. **VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases.** *Nucleic Acids Research*. 2015, 43(Database issue):D707-13.

Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE. **Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development.** *J Med Entomol*. 2003, 40:371–4.

Gupta L, Molina-Cruz A, Kumar S, Rodrigues J, Dixit R, Zamora RE, Barillas-Mury C. **The STAT pathway mediates late-phase immunity against *Plasmodium* in the mosquito *Anopheles gambiae*.** *Cell Host Microbe* 2009, 5: 498-507.

Habtewold T, Groom Z, Christophides G K. **Immune resistance and tolerance strategies in malaria vector and non-vector mosquitoes.** *Parasit Vectors*. 2017; 10: 186.

Harbach RE. **Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera).** *Syst. Entomol.* 1998, 23:327–70

Hill TC, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. **Using ecological diversity measures with bacterial communities.** *FEMS Microbiol Ecol.* 2003, 1;43:1-11

Hiwat H, Bretas G. **Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review.** *Parasit Vectors*. 2011, 4:177.

Hoffmann JA, Reichhart J-M. ***Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective.** *Nature Immunology*. 2002, 3: 121-126.

Hoffmann, JA. **The immune response of *Drosophila*.** *Nature*. 2003, 6;426:33-8.

Hooper LV, Gordon JI. **Commensal host-bacterial relationships in the gut.** *Science*. 2001, 11;292:1115-8.

Hurst GD, Hutchence KJ. **Host defence: getting by with a little help from our friends.** *Curr Biol*. 2010, 28;20:R806-8.

Karimian F, Oshaghi MA, Sedaghat MM, Waterhouse RM, Vatandoost H, Hanafi-Bojd AA, Ravasan NM, Chavshin AR. **Phylogenetic analysis of the oriental-Palaearctic-Afrotropical members of *Anopheles* (Culicidae: Diptera) based on nuclear rDNA and mitochondrial DNA characteristics.** *Jpn J Infect Dis* 2014, 67:361-367.

Karunamoorthi K. **Vector control: a cornerstone in the malaria elimination campaign.** *Clin Microbiol Infect*. 2011, 17:1608-16.

Krzywinski J, Besansky NJ. **Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations.** *Annu RevEntomol*. 2003, 48:111-139.

Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ. **Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and the weight of evidence.** *Syst. Biol.* 2001, 50:540–56

Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capovilla M, Hoffmann JA. **Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 10;97:11427-32.

Lemaitre B, Hoffmann J. **The host defense of *Drosophila melanogaster*.** *Annu Rev Immunol.* 2007, 25: 697-743.

Leulier F, Rodriguez A, Khush RS, Abrams JM, Lemaitre B. **The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection.** *EMBO Rep.* 2000, 353-8.

Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. **Conserved role of complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*.** *Cell.* 2001, 104:709-718.

Levashina EA. **Immune responses in *Anopheles gambiae*.** *Insect Biochem Mol Biol.* 2004, 34:673-8.

Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method.** *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

Michel K, Kafatos FC. **Mosquito immunity against *Plasmodium*.** *Insect Biochem Mol Biol.* 2005, 35:677-89.

Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J. ***Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein.** *Nature.* 2001,414:756-9.

Moita LF, Wang-Sattler R, Michel K, Zimmermann T, Blandin S, Levashina EA, Kafatos FC. **In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*.** *Immunity.* 2005, 23:65-73.

Molina-Cruz A, DeJong RJ, Ortega C, Haile A, Abban E, Rodrigues J, Jaramillo-Gutierrez G, Barillas-Mury C. **Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria**



parasite, evades the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012, 109:E1957–E1962.

Morgan XC, Huttenhower C Chapter 12: **Human Microbiome Analysis**. *PLoS Comput Biol*. 2012, 8: e1002808.

MS 2015. Secretaria de vigilância em saúde. Ministério da saúde (Portal do MS). **Boletim Epidemiológico de Situação da malária no Brasil**, 2012 e 2013. Acesso em: 07 de outubro de 2017 [<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/16/2015-003---Mal-ria.pdf>]

MS 2018. Secretaria de vigilância em saúde. Ministério da saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (Tableau Public). **Número de casos de malária notificados e diferença de percentual entre 2016 e 2018**. Acesso em: 02 de dezembro de 2018 [[https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1518\\_2018\\_11\\_06/casos\\_notificados\\_2018\\_regio\\_Amaznica](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1518_2018_11_06/casos_notificados_2018_regio_Amaznica)].

MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da malária no Brasil**, 2008. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.

Murphy, K. **Imunobiologia de Janeway**. *Artmed*. 2014, 8. ed. 888 p.

Ngo CT, Romano-Bertrand S, Manguin S, Jumas-Bilak E. **Diversity of the Bacterial Microbiota of *Anopheles* Mosquitoes from Binh Phuoc Province, Vietnam**. *Front Microbiol*. 2016, 23;7:2095.

Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC. **Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development**. *Science*. 2004, 26;303:2030-2.

PATH. **From Pipeline to Product: Malaria R&D Funding Needs into the Next Decade Program for Appropriate Technology in Health**, Seattle, 2013.

Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, Pessoa FA, Oliveira GA, Campos KM, Villegas LM, Rodrigues NB, Nacif-Pimenta R, Simões RC, Monteiro WM, Amino R, Traub-Cseko YM, Lima JB, Barbosa MG, Lacerda MV. **An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2015, 110: 23–47.

Pompon J, Levashina EA. A New **Role of the Mosquito Complement-like Cascade in Male Fertility in *Anopheles gambiae***. *PLoS Biol.* 2015, 13:e1002255.

Povelones M, Bhagavatula L, Yassine H, Tan LA, Upton LM, Osta MA, Christophides GK. **The CLIP-domain serine protease homolog SPCLIP1 regulates complement recruitment to microbial surfaces in the malaria mosquito *Anopheles gambiae***. *PLoS Pathog.* 2013, 9:1003623

Povelones M, Upton LM, Sala KA, Christophides GK. **Structure-function analysis of the *Anopheles gambiae* LRIM1/APL1C complex and its interaction with complement C3-like protein TEP1**. *PLoS Pathog.* 2011, 7:e1002023.

Povelones M, Waterhouse RM, Kafatos FC, Christophides GK. **Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against *Plasmodium* parasites**. *Science.* 2009, 10;324:258-61.

Rachou RG. **Anophelinos do Brasil: Comportamento das espécies vetoras de malária**. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1958, 10:145-181.

Rajeev K, Mehlotra, D'Arbra Blankenship, Rosalind E. Howes, Tovonahary A. Rakotomanga, Brune Ramiranirina, Stephanie Ramboarina, Thierry Franchard, Marlin H. Linger, Melinda Zikursh-Blood, Arsène C. Ratsimbaoa, Peter A. Zimmerman, Brian T. Grimberg. **Long-term in vitro culture of *Plasmodium vivax* isolates from Madagascar maintained in *Saimiri boliviensis* blood**. *Malar J.* 2017; 16: 442.

Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, Dimopoulos G. **Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence**. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012, v. 6, p. 1-11.

Ramphul UN, Garver LS, Molina-Cruz A, Canepa GE, Barillas-Mury C. ***Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells**. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015, 112:1273–1280.

Rolff, J. and Reynolds, S. E., eds., 2009. **Insect Infection and Immunity: Evolution Ecology and Mechanisms**. *Oxford University Press*.

Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento T. **Anopheline Species Complexes in Brazil. Current Knowledge of Those Related to Malaria Transmission.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998, 93:651-655.

Silva Rd, Paiva CH. **The Juscelino Kubitschek government and the Brazilian Malaria Control and Eradication Working Group: collaboration and conflicts in Brazilian and international health agenda, 1958-1961.** *Hist Cienc Saude Manguinhos.* 2015, 22:95-114.

Sim, S, Jupatanakul, N, Dimopoulos, G. **Mosquito immunity against arboviruses.** *Viruses.* 2014, 6, 4479-504.

Sinden RE, Billingsley PF. **Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove?** *Trends Parasitol.* 2001, 17:209-12.

Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Kabaria CW, Burkot TR, Harbach RE, Hay SI. **A global map of dominant malaria vectors.** *Parasit Vectors.* 2012, 4;5:69.

Simões ML, Mlambo G, Tripathi A, Dong Y, Dimopoulos G. **Immune Regulation of Plasmodium Is Anopheles Species Specific and Infection Intensity Dependent.** *MBio.* 2017, 17; 8: 01631-17.

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. **An evolutionary conserved function of the JAKSTAT pathway in anti-dengue defense.** *PNAS.* 2009, 106: 17841-17846.

Tauil P, Deane L, Sabroza P, Ribeiro C. **A malária no Brasil.** *Cad. Saúde Pública* 1985, 1: 71-111.

Terenius O, de Oliveira CD, Pinheiro WD, Tadei WP, James AA, Marinotti O. **16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae) mosquitoes.** *J Med Entomol.* 2008, 45:172-5.

Villegas LM, Pimenta PF. **Metagenomics, paratransgenesis and the Anopheles microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014, 109:672-84.

Vizioli J, Bulet P, Hoffmann JA, Kafatos FC, Müller HM, Dimopoulos G. **Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*.** *Proc Natl Acad Sci.* 2001a, 23;98:12630-5.

Vizioli, A.M Richman, S Uttenweiler-Joseph, C Blass, P Bulet. **The defensin peptide of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: antimicrobial activities and expression in adult mosquitoes.** *Insect Biochem Mol. Biol.* 2001b, 31:241-8.

Waterhouse RM1, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, Barillas-Mury C, Bian G, Blandin S, Christensen BM, Dong Y, Jiang H, Kanost MR, Koutsos AC, Levashina EA, Li J, Ligoxygakis P, Maccallum RM, Mayhew GF, Mendes A, Michel K, Osta MA, Paskewitz S, Shin SW, Vlachou D, Wang L, Wei W, Zheng L, Zou Z, Severson DW, Raikhel AS, Kafatos FC, Dimopoulos G, Zdobnov EM, Christophides GK. **Evolutionary Dynamics of Immune-Related Genes and Pathways in Disease-Vector Mosquitoes.** *Science.* 2007, 316:1738-1743.

Waterhouse RM, Povelones M, Christophides GK. **Sequence-structure-function relations of the mosquito leucine-rich repeat immune proteins.** *BMC Genomics.* 2010, 11:531.

Weber AN, Tauszig-Delamasure S, Hoffmann JA, Lelièvre E, Gascan H, Ray KP, Morse MA, Imler JL, Gay NJ. 2003. **Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling.** *Nat. Immunol.* 2003, 4:794–800.

Weiss B, Aksoy S. **Microbiome influences on insect host vector competence.** *Trends in Parasitology.* 2011, 20: 1–9.

WHO 2015. World Health Organization (WHO Home page). World Malaria Report 2015. Acesso em 14 de outubro de 2017 [[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf?ua=1)]

WHO 2016. World Health Organization (WHO Home page). **10 facts on malaria.** Acesso em 12 de fevereiro de 2018 [<http://www.who.int/features/factfiles/malaria/en/>]

WHO 2017. World Health Organization (WHO Home page). World Malaria Report 2017. Acesso em 11 de fevereiro de 2018 [<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1>]

Wong AC, Chaston JM, Douglas AE. **The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis.** *ISME J.* 2013, 1922-32.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. **The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection.** *PLoS Pathog.* 2008, 4;4, e1000098.

Zimmerman RH. **Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992, 3:371-83.