

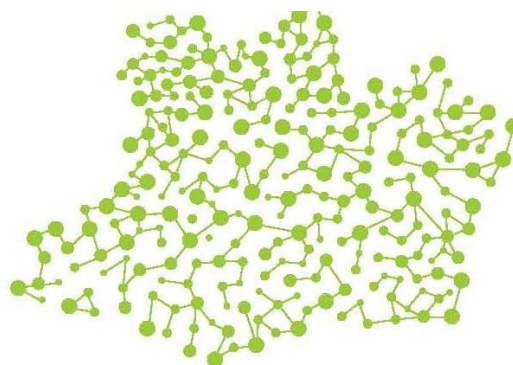


UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS



**CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À
AUTÓFAGIA NO GENOMA DO *Anopheles aquasalis***

IGOR BELÉM DE SOUZA



MANAUS
2023

IGOR BELÉM DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À
AUTOFAGIA NO GENOMA DO *Anopheles aquasalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientador: Prof^o Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Coorientadora: Prof^a Dra. Nágila Francinete Costa Secundino

**MANAUS
2023**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo autor.
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

B428cc de Souza, Igor Belém
Caracterização e classificação de genes relacionados à
autofagia no genoma do *Anopheles aquasalis* / Igor
Belém de Souza. Manaus : [s.n], 2023.
62 f.: color.; 30 cm.

Dissertação - Pós Graduação em Medicina Tropical –
Mestrado em Doenças Tropicais e Infeciosas -
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.
Inclui bibliografia
Orientador: Paulo Filemon Paolucci Pimenta
Coorientador: Nágila Francinete Costa Secundino

1. Transmissão da malária. 2. Interações plasmodium
vetor. 3. Autofagia. I. Paulo Filemon Paolucci Pimenta
(Orient.). II. Nágila Francinete Costa Secundino
(Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV.
Caracterização e classificação de genes relacionados à
autofagia no genoma do *Anopheles aquasalis*

FOLHA DE JULGAMENTO**CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE GENES
RELACIONADOS À AUTOFAGIA NO GENOMA DO *Anopheles
aquasalis*****IGOR BELEM DE SOUZA**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

DEDICATÓRIA

*À minhas mães, Maria Etelvina e Maria da Saúde,
sem o apoio e as orações delas nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida e por todo conhecimento que adquiri até aqui, por ter botado no meu caminho as pessoas certas e por me dá força e coragem para enfrentar todas as batalhas diárias. Ao meu padroeiro São José, que me abençoa todos os dias e intercede milagres em minha vida.

À minha família, minha tia Ana Cândida, a mulher mais forte e corajosa que eu conheço, ao meu pai de coração, Ivaldo, à minha mãe Maria Etelvina que é a minha maior inspiração, obrigado por todos os abraços e principalmente por está comigo quando eu mais precisei, à minha mãe Maria da Saúde, minha primeira professora, foi quem me alfabetizou, me ensinou a ler, escrever e me ensinou sobre a vida, foi quem comemorou cada vitória minha e sempre me incentivou a dar um passo a mais, mas sempre um degrau de cada vez, “Professorinha, nós conseguimos, seu filho hoje é mestre”. Vocês quatro são a base da minha vida e sem dúvidas hoje eu só tenho a agradecer, obrigado por serem meus maiores apoiadores e incentivadores, tudo isso é por vocês.

Aos meus orientadores, Dr. Paulo Pimenta e Dra. Nagila Secundino, muito obrigado pela oportunidade, pelos ensinamentos e por serem fonte de grande inspiração.

Aos meus principais colaboradores, Camilo Sepulveda e Rodrigo Alencar, muito obrigado por compartilharem todo o conhecimento de vocês, desde a época da iniciação científica onde vocês me ensinaram a catar pupa, até os longos dias de treinamento de bioinformática, confesso que já sinto falta das aulas cansativas, mas que por muitas vezes vocês fizeram parecer tão fácil quanto 1+1.

À minha orientadora de Estágio Supervisionado, Dra. Gisely Cardoso de Melo, das melhores lembranças que eu vou levar do mestrado, certamente o Estágio Supervisionado é uma delas, muito obrigado por todo conhecimento repassado, por todas as aulas e principalmente por não medir esforços quando precisei de ajuda. No total foram oito aulas que tive que ministrar, no início parecia um grande desafio, mas com a senhora ali do lado tudo ficou mais leve.

À minha primeira orientadora de iniciação científica da FMT, Dra. Ana Paula Duarte, muito obrigado por ter me escolhido naquela seleção para IC,

aquele primeiro contato me fez ter ainda mais vontade de querer continuar na vida acadêmica, foi ali que me senti desafiado e eu gosto de desafios.

À todas as pessoas que conheci durante essa caminhada, às meninas da iniciação científica, Deilane, Marry e Paula, obrigado por serem a melhor companhia de trabalho que eu pude ter durante o IC. À Gigliola Mayara por ser a minha dupla de projeto, estudávamos juntos e demos muito trabalho para os meninos da bioinformática, mas no fim, deu tudo certo.

A todos os colegas e amigos da turma de 2021 do mestrado, obrigado pela troca de experiências, em especial a Emily de Sousa, Izabele Guimarães, Mayanne Dias e Aline Santiago que por muitas vezes me ajudaram com as disciplinas.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA), à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e ao Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB), pelo excelente Programa de pós-graduação.

Por fim, agradeço ao Igor de 2020 que em meio a pandemia e diversos problemas, não desistiu de realizar aquela prova que por mais que tivesse estudado e se dedicado, havia muitas incertezas, a falta de autoconfiança somada com os inúmeros “Tu não vai conseguir” “Se eu fosse tu eu tentava no próximo ano” eram motivos suficientes para desistir, mas ele arriscou, aprovou e com muito esforço, hoje mestre se tornou.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Às agências financiadoras: FAPPEAM, FAPPEMIG, CAPES e CNPq, por financiarem o projeto.

À CAPES pela concessão da Bolsa de apoio.

EPÍGRAFE

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão
uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa
de Calcutá)*

RESUMO

A malária é uma doença parasitária transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*, tem um grande impacto na saúde pública e ameaça a economia de um terço da população mundial. No Brasil o *Plasmodium vivax* é o principal causador da malária, e o *Anopheles darlingi* é o principal mosquito transmissor, outro importante vetor é o *Anopheles aquasalis*. A interação parasita/vetor é compreendida em vários aspectos moleculares, biológicos e imunológicos, além disso, a infecção disseminada do vetor e sua capacidade de transmitir a doença a humanos é dependente da indução de genes relacionados a processos como autofagia, apoptose, resposta imune inata e digestão. O objetivo deste estudo foi realizar a anotação dos genes relacionados ao processo celular de autofagia em *An. aquasalis*, comparando através de filogenia os genes preditos com outros anofelinos. Os dados do genoma foram obtidos do banco do NCBI (National Center for Biotechnology Information), sequenciados pela tecnologia de sequenciamento Illumina HiSeq. A Identificação dos genes de interesse foi feita por homologia pelo BLASTp com um e-value 10^{-5} utilizando as sequências das proteínas anotadas do *An. gambiae* como modelo contra o proteoma de *An. aquasalis*. As sequências de aminoácidos dos outros anofelinos foram descarregadas dos bancos de dados do VectorBase. Foi realizado um alinhamento múltiplo e gerado a árvore filogenética pelo programa MEGA-X utilizando o teste neighbor-joining, com 1000 réplicas bootstrap que mostrou 24 proteínas relacionadas a autofagia e pré-autofagia para o *An. aquasalis* e um total de 95 sequências das quatro espécies de anofelinos. *An. aquasalis* e *An. albimanus* tiveram a mesma quantidade de genes comparado com o identificado no *An. gambiae*, com exceção pela duplicação da proteína relacionada com o gene ATG12, enquanto *An. darlingi* apresentou duas proteínas a menos, sendo ATG1 e ATG7. Com base em nossos resultados, propomos que essas proteínas envolvidas no processo de autofagia são altamente conservadas e essenciais para a resposta imune dos anofelinos, sendo um mecanismo crítico de defesa para vetores do Novo Mundo contra patógenos.

Palavras-Chave: Transmissão da malária, Interações *plasmodium*-vetor, Autofagia.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease transmitted by mosquitoes of the genus *Anopheles* sp., has a significant impact on public health, and threatens the economy of low-income people in tropical areas. In Brazil, *Plasmodium vivax* is the main causative agent of malaria, and *Anopheles darlingi* is the primary transmission mosquito, followed by another important vector, *Anopheles aquasalis*. The parasite/vector interaction is understood in several molecular, biological, and immunological aspects; moreover, the widespread infection of the vector and its ability to transmit the disease to humans is dependent on the induction of genes related to processes such as autophagy, apoptosis, innate immune response, vitellogenesis, and digestion. This study's objective was to annotate genes associated with the cellular function of autophagy in *An. aquasalis*, comparing through phylogeny the predicted genes with other anophelines. The genome data were obtained from the NCBI (National Center for Biotechnology Information), sequenced by Illumina HiSeq sequencing technology. Identification of the genes of interest was done by homology by BLASTp with an e-value of 10^{-5} using the annotated protein sequences of *An. gambiae* as a model against the proteome of *An. aquasalis*. The amino acid sequences of the other anophelines were downloaded from the VectorBase databases, and the proteins of interest were also identified by the same methodology. Multiple alignments were performed, and the phylogenetic tree generated by the MEGA-X program using the neighbor-joining test, with 1000 bootstrap replicates that showed 24 proteins related to autophagy and pre-autophagy for *An. aquasalis* and a total of 95 sequences from the four anopheline species. *An. aquasalis* and *An. albimanus* had the same of genes compared to that identified in *An. gambiae*, except for the duplication of the protein related to the ATG12 gene, while *An. darlingi* presented two proteins less, being ATG1 and ATG7. Based on our results, we propose that these proteins involved in the autophagy process are highly conserved and essential for the anopheline immune response, being a critical defense mechanism for New World vectors against pathogens.

Keywords: Malaria transmission, *Plasmodium*-vector interactions, Autophagy.

RESUMO LEIGO

A malária é uma doença transmitida por mosquitos, tem um grande impacto na saúde pública e ameaça a economia. A interação entre o parasita (causador da doença) e o mosquito (transmissor) é estudada de diversas formas. O modo que o parasita age dentro do mosquito e sua capacidade de transmitir a malária a humanos depende da ativação de genes (partes do DNA) relacionados a processos que ocorrem no interior do mosquito, dentre eles, a digestão. O objetivo deste estudo foi nomear e entender a função dos genes relacionados ao processo celular de autofagia (autoalimentação) no mosquito *Anopheles aquasalis*, responsável pela transmissão da malária, comparando o material biológico de outros mosquitos através da relação desses genes com seus ancestrais comuns. Os dados de um conjunto de genes foram obtidos do banco do NCBI que é uma biblioteca online. A Identificação dos genes de interesse foi feita comparando com outros genes já descritos do *An. gambiae* que é uma espécie modelo. Foram utilizadas ferramentas computacionais que encontraram 24 genes para o *An. aquasalis* e um total de 95 para os quatro tipos de mosquitos estudados no presente trabalho, que são: *An. aquasalis*, *An. gambiae*, *An. darlingi* e *An. albimanus*. De acordo com os resultados encontrados foi possível observar que os genes de autofagia são um grupo conservado, onde quase todas as espécies tiveram o mesmo número de genes, apresentando pouca variação ou nenhuma, que é o caso do *An. aquasalis* que apresentou a mesma quantidade de genes que o *An. albimanus* comparado com o identificado no *An. gambiae*, com exceção pela duplicação da proteína relacionada com o gene ATG12, enquanto *An. darlingi* apresentou duas proteínas a menos, sendo ATG1 e ATG7. Nossos resultados mostraram que essas proteínas envolvidas no processo de autofagia são altamente conservadas e importantes para os mosquitos aqui estudado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa dos países endêmicos da malária para o ano de 2021.....	1
Figura 2: Casos de malária por país na Região das Américas em 2021.....	2
Figura 3: Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil,2021.....	2
Figura 4: Distribuição de Anofelinos no mundo.....	3
Figura 5: Esquema geral do ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i>	5
Figura 6: Esquema do ciclo de autofagia.....	8

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

An. - *Anopheles*

APG/ATG – Autophagy/Autofagia

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BLASTp - Basic Local Alignment Search Tool Protein

CDD - Conserved Domain Database

CDS - Coding sequences

MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NGS - Next Generation Sequencing

OMS - Organização Mundial de Saúde

P. – *Plasmodium*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos epidemiológicos da malária	1
1.2 Aspectos gerais dos anofelinos	3
1.3 Aspectos gerais do <i>Plasmodium</i>	4
1.4 Interação Parasita-Vetor	6
1.5 A importância da autofagia em Anofelinos	6
1.6 Relevância	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Geral.....	11
2.2 Específicos.....	11
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	12
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS.....	34
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS.....	36
7. ANEXOS E APÊNDICES.....	42
7.1 Procedimentos Operacionais Padrão	42
7.2 Equipe.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos da malária

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, é uma das mais importantes no mundo inteiro devido suas altas taxas de morbidade e mortalidade afetando não somente a saúde, mas também a economia, principalmente nas comunidades mais pobres ao redor do mundo. Segundo o “World Malaria Report” 2022 da Organização Mundial de Saúde (OMS) foram registrados 247 milhões de casos, com cerca de 619.000 óbitos no ano de 2021 (1).

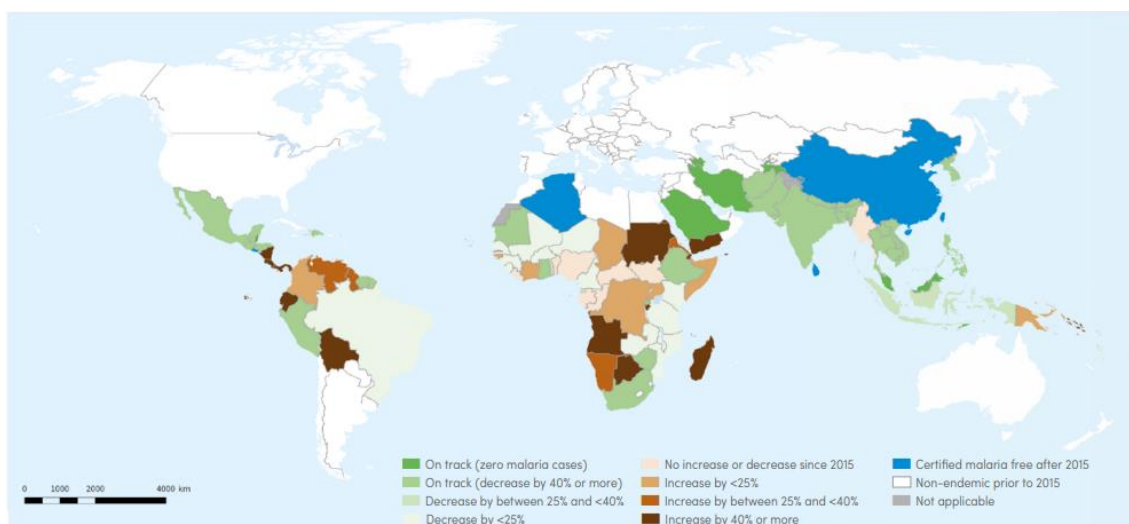


Figura 1: Mapa dos países endêmicos da malária para o ano de 2021 mostrando redução de pelo menos 40% no número de casos em relação a 2015. Fonte: World Malaria Report 2022.

Na Região das Américas, foram registrados casos de malária em 17 países para o ano de 2021 (Figura 2), de acordo com a OMS entre os anos de 2000 e 2021. Os casos de malária e a incidência de casos reduziram 60% e 70% respectivamente, assim como as mortes por malária e a taxa de mortalidade que reduziram 64% e 73% respectivamente. Alguns países foram certificados livres de malária, como Argentina, El Salvador, Paraguai e Belize. Na Região das Américas, a República Bolivariana da Venezuela, Brasil e Colômbia foram responsáveis por 79% de todos os casos (1).

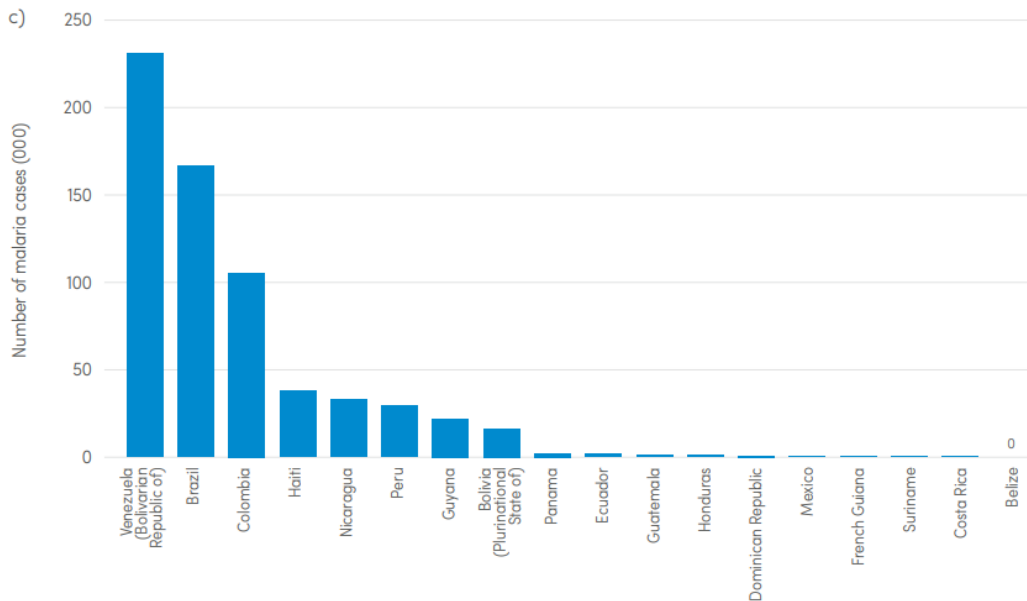


Figura 2: Casos de malária por país na Região das Américas em 2021. Fonte: world malaria report 2022

No mesmo ano, o Brasil teve cerca de 22,23% de todos os casos confirmados pela OMS para a região das Américas, onde a região Amazônica é responsável por 99% dos casos (Figura 3), sendo 41,1% no estado do Amazonas (1,2).

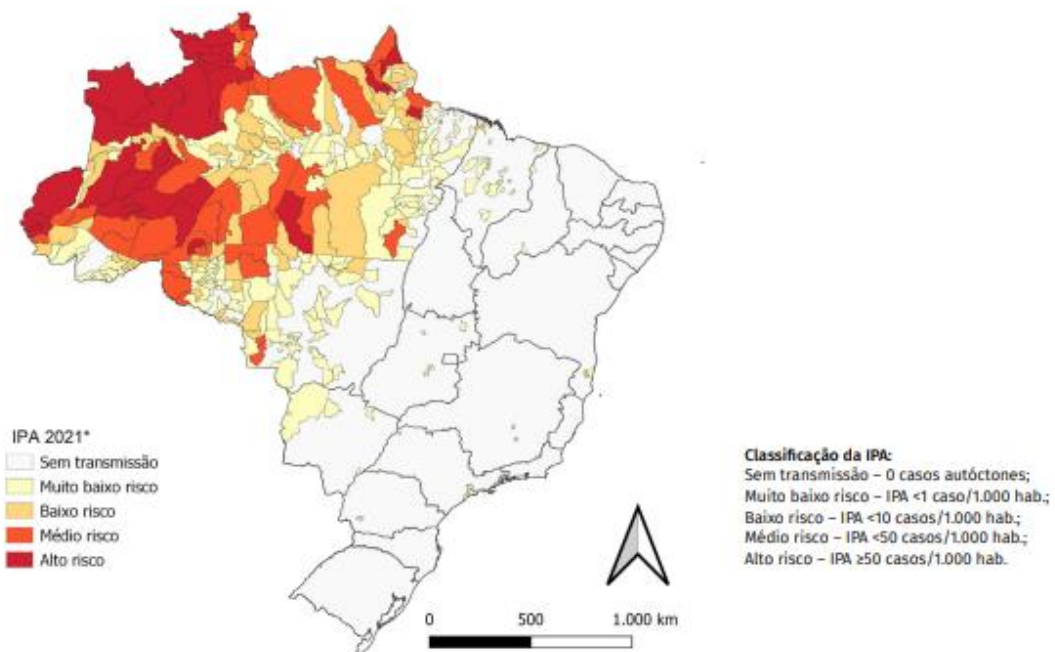


Figura 3: Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2021.

1.2 Aspectos gerais dos anofelinos

As formas infectantes ao homem são transmitidas através da picada da fêmea de anofelinos, que são mosquitos pertencentes a ordem Diptera, infraordem Culicomorpha, família Culicidae, gênero *Anopheles*. Cerca de 400 espécies fazem parte do gênero *Anopheles* (Figura 4), porém somente 10% destas espécies são importantes vetores dos parasitos da malária. No Brasil 5 espécies são consideradas vetores: *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. cruzi*, *An. Bellator* e *An. darlingi*, sendo esse último o principal vetor da doença no nosso país (3,4, 6). Recentemente este anofelino foi colonizado, mas ainda é muito pouco estudado (7). Outro importante vetor no Brasil é o *Anopheles aquasalis*, colonizado em laboratório desde 1995. Apresenta-se com uma boa opção de modelo de estudo e pode ser experimentalmente infectado pelos *Plasmodium vivax* e *Plasmodium yoelli nigeriensis* (N67), modelos de malária humana e murina respectivamente (5).

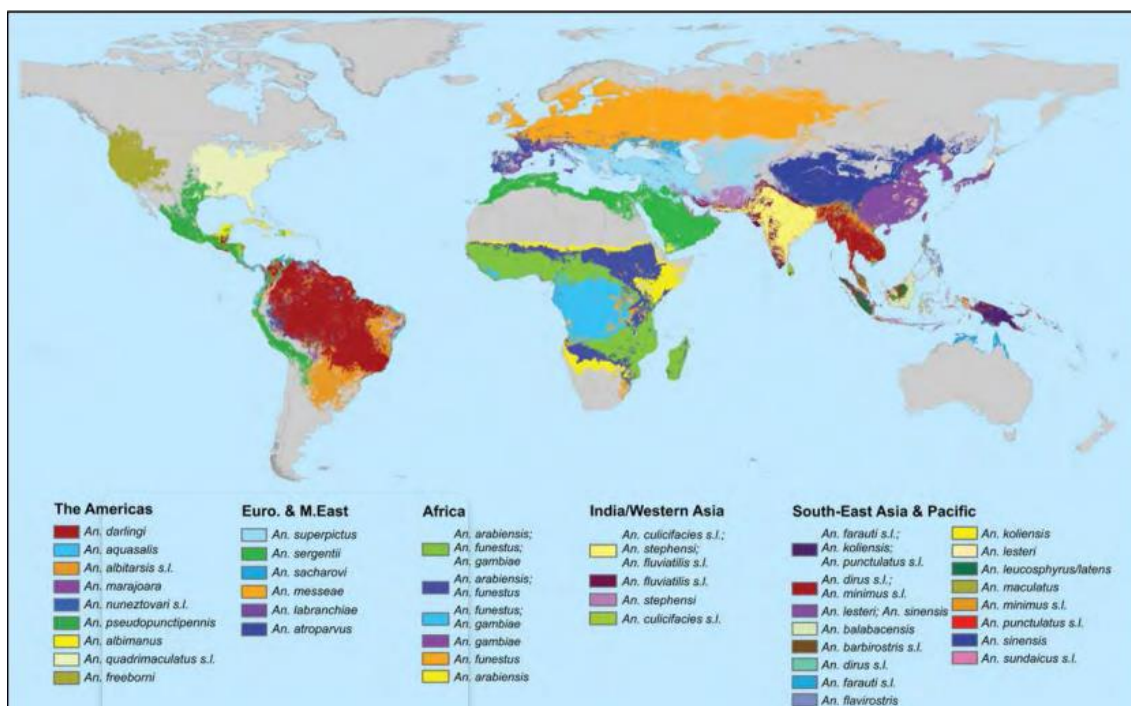


Figura 4: Distribuição de Anofelinos no mundo. Fonte: Sinka et al. 2012

Os culicídeos são holometábolos, ou seja, passam por uma metamorfose completa. Durante seu desenvolvimento o anofelino passa por quatro estágios, que são: ovo, larva, pupa e adultos. Os estádios de ovo, larva e pupa são aquáticos. As larvas passam por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) e se

diferenciam de outros culicídeos pela ausência de sifão respiratório e por apresentarem, uma posição paralela à superfície da água. As pupas têm formato de vírgula e os adultos são alados, possuem dimorfismo sexual pernas e antenas longas, aparelho bucal picador-sugador, asas e pernas. Seu corpo é dividido em três partes, sendo cabeça, tórax e abdômen. Na parte posterior são localizados os olhos, antenas e palpos, já no tórax ficam as pernas e as asas, o abdômen inclui a maior parte dos órgãos internos do aparelho reprodutor, digestivo e excretor (7,32).

As fêmeas são hematófagas e o repasto sanguíneo está relacionado ao desenvolvimento dos ovos. O repasto sanguíneo é feito através da proboscídea, que possui lábio com um conjunto de órgãos constituintes do aparelho bucal do tipo picador, formados por hipofaringe, labro, pares de mandíbulas e maxilas. Ao perfurar a pele do hospedeiro humano, os lábios se dobram, através da hipofaringe a fêmea libera a saliva, o sangue entra no organismo através do labro, e a sucção do sangue se dá pela ação das bombas cibarial e faríngea. (8, 7). A saliva possui anticoagulantes, vasodilatadores e outras moléculas importantes para a hematofagia (9).

1.3 Aspectos gerais do *Plasmodium*

A malária tem como agente etiológico o parasita do gênero *Plasmodium*, que pertencem ao filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Haemosporida e família Plasmodiidae (33). Para malária humana seis espécies têm importância clínica e epidemiológica: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. simium* (10,11).

O *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum* são as principais espécies que causam malária em humanos. O *P. vivax*, tem uma ampla disseminação no mundo, onde a maioria dos casos são registrados no centro e sudeste da Ásia, África e América Latina (34). Já o *P. falciparum* apresenta a maior letalidade, responsável pela maioria das mortes relacionadas à doença em todo o mundo, inclusive na África (35).

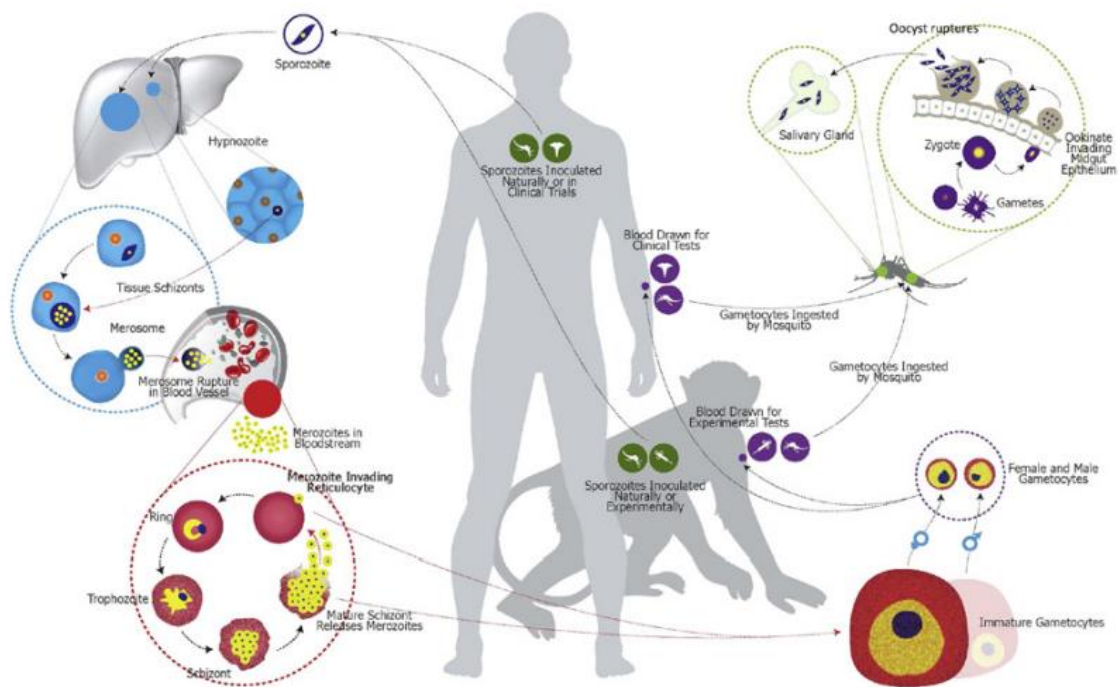


Figura 5: Esquema geral do ciclo de vida do *Plasmodium* sp. Fonte: Galinski et al. 2013

O ciclo de vida do *Plasmodium* (Figura 5) é dividido em fase esporogônica e fase esquizogônica, sendo a primeira uma fase sexual exógena onde ocorre a multiplicação do parasita no mosquito. O ciclo se inicia quando a fêmea do anofelino faz alimentação de sangue humano contendo gametócitos, que são as formas sexuadas. No lúmen do intestino, a fase sexual do ciclo começará com a diferenciação em microgametócitos e macrogametócito, gametas masculino e feminino, respectivamente, os microgametas passam pelo processo de exflagelação e se fundem ao macrogameta formando zigoto (36). O zigoto se diferencia em oocineto e atravessa a matriz peritrófica, atinge a parede do epitélio intestinal e se transforma em oocisto, entre 12 e 15 dias o oocisto já maduro se rompe e libera esporozoítos na hemolinfa (37). Os esporozoítos migram até as glândulas salivares do inseto capacitando o mosquito fêmea de fazer uma nova infecção (38).

Já a segunda é uma fase assexuada endógena onde ocorre a multiplicação no hospedeiro vertebrado em células parenquimatosas hepática ou eritrocitária de humanos e murinos. Ao realizar o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito inocula os esporozoítos, que migram para células do parênquima

hepático, e se multiplicam por esquizogonia, gerando esquizontes primários que se rompem e liberam merozoítos que infectam as hemácias dos vertebrados. Os merossomos se transformam em trofozoítos jovens e após várias divisões formam os esquizontes. Os merozoítos diferenciam-se nas formas sexuadas do parasito, denominadas gametócitos, e quando ingeridos pelo mosquito, reiniciam o ciclo do *Plasmodium* (39).

O ciclo hepático tem duração de cerca de 14 dias, formando os esquizontes sanguíneos, que são as formas do *Plasmodium* que induzem resposta imunitária, é nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária. (12,13,14).

1.4 Interação Parasita-Vetor

O conhecimento atual da biologia na interação parasita-vetor é basicamente sobre os vetores da malária na África e Índia, *An. gambiae* e *An. stephensi*, respectivamente. A susceptibilidade dos mosquitos à invasão pelo *Plasmodium* é um fator determinante na eficiência dos vetores na transmissão da malária. Sabe-se que algumas espécies de mosquitos podem se infectar com o *Plasmodium* enquanto outros não, e que, dentro da mesma população de mosquitos, alguns são mais susceptíveis do que outros. A partir destes estudos, a interação parasita/vetor do Velho Mundo foi compreendida em vários aspectos moleculares, biológicos e imunológicos, e hoje é melhor entendido o desenvolvimento do parasita em seu ciclo dentro dos anofelinos (15,16). No entanto, estas informações sobre a interação parasita/vetor nas Américas ainda são escassas e muitos pontos ainda não foram esclarecidos (20).

1.5 A importância da autofagia em Anofelinos

Os estudos moleculares já podem ser realizados com uma maior facilidade devido aos avanços das tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS). Essas tecnologias são as metodologias que podem ser usadas para estudar o genoma e transcriptoma de um organismo. As análises genômicas associadas a metodologias funcionais têm provido novas oportunidades para entender interações com parasitas, incluindo com

Plasmodium. Além disso, a infecção disseminada do vetor, e conseqüentemente, a sua capacidade de transmitir a doença a humanos é dependente da indução de genes relacionados aos processos como autofagia, apoptose, resposta imune inata, vitelogênese e digestão (20).

A autofagia, ou “autoalimentação”, descrita pela primeira vez em 1963 por Christian de Duve (56), é um processo conservado no qual as proteínas citoplasmáticas ou organelas são empacotadas em modos seletivos e não seletivos para degradação e tem papéis essenciais na sobrevivência, desenvolvimento e homeostase (40). Assim, a autofagia tem funções de manutenção e regulação em organismos eucarióticos (41).

Takehige e colaboradores em 1992, foram os pioneiros a descrever a autofagia em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde 16 genes essenciais (ATGs) foram identificados (42) e o processo é semelhante nos eucariotos superiores (43).

A autofagia é uma das várias respostas à falta de nutrientes, infecção por patógenos, estresse oxidativo e danos a organelas (17, 44, 57, 58), sendo dividida em três grupos principais: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (CMA), que diferem nos mecanismos pelos quais os substratos são internalizados nos lisossomos (45, 46).

Durante a macroautofagia um grande número de componentes citoplasmáticos é incluído de forma não seletiva dentro de uma estrutura de membrana dupla chamada autofagossomo. A formação do autofagossomo (Figura 6) pode ser dividida em três etapas: nucleação, expansão e finalização. (47, 48). A membrana externa do autofagossomo se funde com um lisossomo/vacúolo (50). Uma estrutura transitória de membrana única, o corpo autofágico, é liberado no lúmen e subseqüentemente degradada no lisossomo/vacúolo. As proteínas envolvidas na macroautofagia foram designadas proteínas ATG (49).

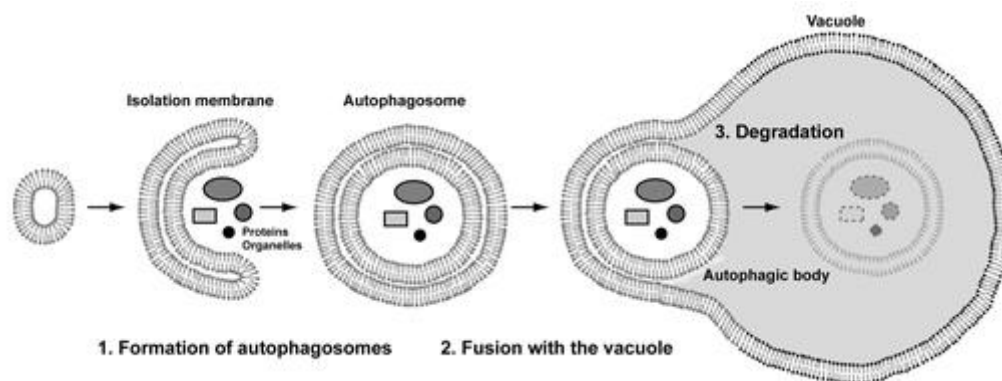


Figura 6: Esquema do ciclo de autofagia. Fonte: Noda et al. 2009

Além da macroautofagia, a captação aleatória de componentes celulares também pode ocorrer via microautofagia, processo caracterizado pela captação de uma porção do citoplasma por invaginação direta da membrana vacuolar (51).

Poucos artigos tratam da autofagia em anofelinos e com relação aos anofelinos brasileiros somente recentemente Santana e colaboradores descreveu a importância deste evento celular durante o processo de infecção de *An. aquasalis* pelo *P. vivax*, assim como já descrito para o *An. albimanus* em 2012 por Martínez-Barnette (17, 29). Estes autores demonstraram que a autofagia é regulada pela invasão do *P. vivax* no epitélio do intestino médio do mosquito. Um grande número de genes associados à autofagia foi regulado por infecção, dos quais 60% foram regulados positivamente. Além disso, após a inibição da autofagia pela espermidina, Santana e colaboradores observaram uma redução significativa da prevalência e intensidade da infecção do *Plasmodium* nos mosquitos. Diante destes resultados, os autores propuseram que na invasão dos oocinetos às células do intestino médio do mosquito, desencadeia um rearranjo morfológico da célula do mosquito, com remodelamento de actina e microtúbulos, produção de radicais de nitrogênio e oxigênio e como consequência, possível morte celular. A autofagia desencadeada pela invasão do *Plasmodium* nas células epiteliais do intestino médio é um novo mecanismo para mosquitos no combate à infecção por *Plasmodium*. Assim, a regulação positiva da autofagia pode aumentar a resistência à patógenos, um fenômeno que também foi associado à resistência de *Drosophila melanogaster* à bactérias

(18). E também foi observado em *An. stephensi* infectado por *P. falciparum* que foi induzido genes associados a autofagia (ATG), incluindo aqueles reguladores-chave ATG 6 e ATG 8, no epitélio do intestino médio 24 h após a infecção (19). O papel da autofagia também foi observado em outros dípteros como *Aedes albopictus*, onde o ATG 8 mostrou ser regulador chave na resposta imune de *Aedes* infectados por *Listeria monocytogenes*, recentemente Wang e colaboradores identificaram doze novos genes relacionados à autofagia em *Aedes* (30,31).

Em nosso grupo através de estudos pioneiros, como o de Ana C Bahia (52, 53, 54) e Claudia M Rios-Velásquez (55) nós já descrevemos alguns aspectos sobre o papel de processos, tais como, a resposta à fisiologia digestiva da alimentação sanguínea e a resposta imune inata ao patógenos dos anofelinos em resposta à infecção com o *Plasmodium* utilizando o modelo de estudo *An. aquasalis/P. vivax*.

Porém neste assunto, ainda há muito mais o que saber (20). Costa-da-Silva e colaboradores descreveram e deduziram os genes expressos do *An. aquasalis* alimentados com sangue e com açúcar (21). Estes dados foram os primeiros a estabelecer uma análise comparativa indicando um conhecimento na biologia deste vetor. Porém, comparativamente, uma análise da literatura existente, constata de imediato que existem poucas informações a nível molecular e genômico dos processos de infecção dos mosquitos vetores de *P. vivax* do Novo Mundo, sendo este tipo de conhecimento extremamente escasso. Considerando-se este importante fato, é necessário reforçar os estudos genômicos que visem a elucidar a biologia de interação vetor-parasita e que possam auxiliar no conhecimento de transmissão.

1.6 Relevância

A falta de vacinas efetivas, o desenvolvimento nos mosquitos de resistência aos inseticidas e o incremento da resistência dos parasitos às drogas, torna clara a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de combate e controle

da doença. Uma das principais limitações para estudar a biologia da transmissão da doença por vetores brasileiros é a falta de um modelo robusto para realizar infecções de rotina em laboratório, o qual pode ser um importante instrumento para identificar as respostas imunes e fisiológicas do vetor ao parasita, e assim gerar informações que possam limitar a transmissão da doença. Através do uso dos genes da autofagia podemos ter um mecanismo de controle para eliminar as diferentes espécies de plasmódios. Além disso, estudos em modelos de malária humana só são possíveis em regiões endêmicas, como nos estados da região Norte do Brasil localizados na Amazônia.

A autofagia desencadeada pela invasão do *Plasmodium* nas células epiteliais do intestino médio é um novo mecanismo para os mosquitos combaterem a infecção por *Plasmodium*. Os dados gerados sobre genes pertencentes ao sistema imune de *An. aquasalis*, serão essenciais para a compreensão desses processos, e para estudos futuros sobre a interação *An. aquasalis/P. vivax*. Portanto, este projeto visa identificar e caracterizar os genes de autofagia do *An. aquasalis*.

2.OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar a anotação dos genes relacionados ao processo celular de autofagia em *An. aquasalis*.

2.2 Específicos

- a) Identificar os genes relacionados ao processo celular de autofagia no genoma do *An. aquasalis*;
- b) Reconhecer a composição de domínios das proteínas alvos de estudo;
- c) Comparar filogeneticamente os genes preditos com outros anofelinos.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Manuscrito a ser submetido a revista PLOS ONE

CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF GENES RELATED TO AUTOPHAGY IN THE GENOME OF *Anopheles aquasalis*

Igor Belém de Souza^{1,2}, Cesar Camilo Prado Sepulveda^{1,2}, Rodrigo Maciel Alencar^{1,2},
Gigliola Mayara Ayres D'Elia^{1,2}, Ana Paula Duarte^{1,2}, Rosa Amélia Santana^{1,2}, Nágila
Francinete Costa Secundino^{1,2,4,5}, Leonardo Barbosa Koerich³, Paulo Filemon Paolucci
Pimenta^{1,2,4,5*}.

¹ Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas,
Brazil. CEP 69.040-000

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Fundação de Medicina Tropical
Heitor Vieira Dourado, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas,
Brazil. CEP69.040-000

³ Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brazil. CEP 31.270-901

⁴ Instituto de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas
Gerais, Brazil. CEP 30.190-009

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, FIOCRUZ – Belo Horizonte.
Minas Gerais, Brazil. CEP 30.190-009

*Corresponding author: Paulo F. P. Pimenta

Email: pfppimenta@gmail.com

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease transmitted by mosquitoes of the genus *Anopheles* sp., has a significant impact on public health, and threatens the economy of low-income people in tropical areas. In Brazil, *Plasmodium vivax* is the main causative agent of malaria, and *Anopheles darlingi* is the primary transmission mosquito, followed by another important vector, *Anopheles aquasalis*. The parasite/vector interaction is understood in several molecular, biological, and immunological aspects; moreover, the widespread infection of the vector and its ability to transmit the disease to humans is dependent on the induction of genes related to processes such as autophagy, apoptosis, innate immune response, vitellogenesis, and digestion. This study's objective was to annotate genes associated with the cellular function of autophagy in *An. aquasalis*, comparing through phylogeny the predicted genes with other anophelines. The genome data were obtained from the NCBI (National Center for Biotechnology Information), sequenced by Illumina HiSeq sequencing technology. Identification of the genes of interest was done by homology by BLASTp with an e-value of 10^{-5} using the annotated protein sequences of *An. gambiae* as a model against the proteome of *An. aquasalis*. The amino acid sequences of the other anophelines were downloaded from the VectorBase databases, and the proteins of interest were also identified by the same methodology. Multiple alignments were performed, and the phylogenetic tree generated by the MEGA-X program using the neighbor-joining test, with 1000 bootstrap replicates that showed 24 proteins related to autophagy and pre-autophagy for *An. aquasalis* and a total of 95 sequences from the four anopheline species. *An. aquasalis* and *An. albimanus* had the same of genes compared to

that identified in *An. gambiae*, except for the duplication of the protein related to the ATG12 gene, while *An. darlingi* presented two proteins less, being ATG1 and ATG7. Based on our results, we propose that these proteins involved in the autophagy process are highly conserved and essential for the anopheline immune response, being a critical defense mechanism for New World vectors against pathogens.

Keywords: Malaria transmission, *Plasmodium*-vector interactions, Autophagy.

INTRODUCTION

Malaria is an acute febrile infectious disease; it is one of the most important worldwide due to its high morbidity and mortality rates. According to the "World Malaria Report" 2022 of the World Health Organization (WHO) 247 million cases were registered, with about 619.000 deaths in the year 2021, Brazil was responsible for about 22.23% of all cases confirmed by the WHO for the Americas region, where the Amazon region is reported 99% of cases, affecting not only health but also the economy, especially in the poorest communities around the world (1,2). Infectious forms for humans are transmitted through the bite of female anophelines when infected by parasites of the genus *Plasmodium* (2).

The susceptibility of mosquitoes to invasion by *Plasmodium* is a determining factor in the efficiency of vectors in transmitting malaria. It is known that some species of mosquitoes can be infected with *Plasmodium* while others cannot, in addition, the disseminated infection of the vector, and consequently, its ability to transmit the disease to humans is dependent on the induction of genes related to processes such as autophagy, apoptosis, innate immune response, vitellogenesis and digestion (3).

Autophagy is a conserved process in which cytoplasmic proteins or organelles are packaged in selective and non-selective ways for degradation and play essential roles in survival, development and homeostasis (4). Takeshige and collaborators in 1992 were the pioneers to describe autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, where 16 essential genes (ATGs) were identified (5) the process is similar to that of higher eukaryotes (6). Autophagy is one of several responses to nutrient starvation (7) and is divided into three main groups: macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy (CMA), which differ in the mechanisms by which substrates are internalized into lysosomes (8,9). During macroautophagy, a large number of cytoplasmic components are non-selectively enclosed within a double-membrane structure called an autophagosome. Autophagosome formation can be divided into three steps: nucleation, expansion, and termination. (10, 11). Proteins involved in macroautophagy have been designated ATG proteins (12). The outer membrane of the autophagosome fuses with a lysosome/vacuole (13). A transient single-membrane structure, the autophagic body, is released into the lumen and subsequently degraded in the lysosome/vacuole. In addition to macroautophagy, the random capture of cellular components can also occur via microautophagy, a process characterized by capturing a portion of the cytoplasm by direct invagination of the vacuolar membrane (14).

Autophagy triggered by *Plasmodium* invasion of midgut epithelial cells is a novel mechanism for mosquitoes to combat *Plasmodium* infection. The data generated on genes belonging to the *An. aquasalis* immune system will be essential for understanding these processes and for future studies on the *An.*

aquasalis/*P. vivax*. Therefore, this project aims to identify and characterize the *An. aquasalis* autophagy genes.

MATERIAL AND METHOD

Genome data

The sequences used for the bioinformatic analyzes were from data available in the NCBI database (National Center for Biotechnology Information), sequenced by the Illumina HiSeq sequencing technology (15). The genome of *An. aquasalis* is available with project access NJHH00000000. Protein coding genes (CDS) and proteins from *An. aquasalis* were annotated using Maker and Augustus predictors (Prado-Alencar et al, unpublished).

Identification of genes of interest in the genome

Identification of the genes of interest was done by homology using the annotated protein sequences of *An. gambiae* as a model. Initially the amino acid sequences of *An. gambiae* (*Anopheles-gambiae*-PEST_PEPTIDES_AgamP4.12.fa), *An. darlingi* (*Anopheles-darlingi*-Coari_PEPTIDES_AdarC3.8.fa) and *An. albimanus* (*Anopheles-albimanus*-STECLA_PEPTIDES_AalbS2.6), were downloaded from the VectorBase databases (16). The proteins of *An. aquasalis* previously annotated were used. Then, using the BLAST tool (sequence alignment program), a BLASTp of *An. gambiae* proteins, previously downloaded from the VectorBase database, was performed against the proteome of other mosquito species (*An. aquasalis*, *An. darlingi* and *An. albimanus*). Results were selected according to e-value less than 0.005 and identity values greater than 35% (17).

For the analyses, the Galaxy online server (use.galaxy.org) was used with the tools: `makeblastdb`, `blastdbcmd` entry(s) and `blastp`. The `makeblastdb` tool is used to format sequences and create a BLAST database from a FASTA file. The `blastdbcmd` entry(s) tool extracts the strings from the database retrieved by the `makeblastdb` tool. `blastp` performs a search in a database of proteins similar to that protein sequence that was used as query; important tool for protein identification (18).

The Genewise program was used for the manual prediction of the genes in the case of fragmented or lost genes during the annotation. For this, a tBLASTn was performed using the proteins of the *An. gambiae* mosquito families of interest as a query against the genome of *An. aquasalis*, with an e-value less than 0.005. Scaffolds with greater than 35% identity were selected for Genewise annotation (19). The non-redundant sequences were used to search against the NCBI Conserved Domain Database (CDD) database to identify the domain composition of the protein sequence of each mosquito species' protein sequence to confirm the final prediction (20).

The standard deviation of the average copy number in each identified gene family calculated the copy number variation. A heatmap was built using Heatmapper (21).

For the construction of phylogenetic trees, the MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) program was used. The protein sequences were combined into a multifasta file containing the sequences from *An. aquasalis*, *An. gambiae*, *An. darlingi* and *An. albimanus* (22).

The predicted amino acid sequences were aligned with the sequences of the model organisms used in the initial BLAST, using the MUSCLE tool in the

following parameters: gap open -2.90; gap extend -0.00; cluster method UPGMA. The phylogenetic tree was built in the MEGA-X program using the neighbor-joining test, with 1000 bootstrap replicates. Evolutionary distances were calculated using the P-distance method and all ambiguous positions were removed for each pair of sequences (pairwise deletion option) (23).

RESULTS

Ninety-five proteins were identified as autophagy-related proteins, of which 24 are present in *An. aquasalis*. These proteins were divided into APG (Figure 1) that are directly related to the autophagy process and a second group (Figure 2) was identified as proteins that induce autophagy.

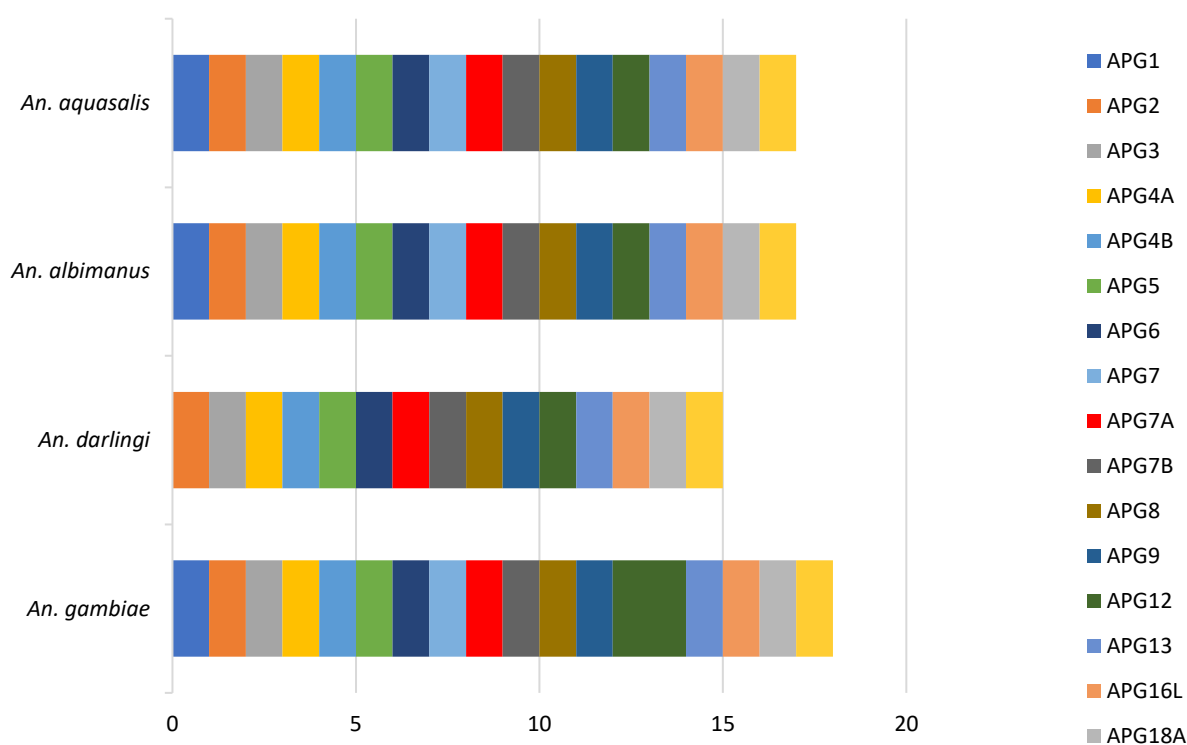


Figure 1. Number of genes related to autophagy found in each anopheline.

Our results showed that *An. aquasalis* kept the same number of genes as *An. gambiae*, the Old World reference mosquito, except for APG 12, which is duplicated in *An. gambiae*. The *An. albimanus* also presented the same number of copies as *An. aquasalis*, while *An. darlingi* had two proteins less, with the absence of APG1 and APG7.

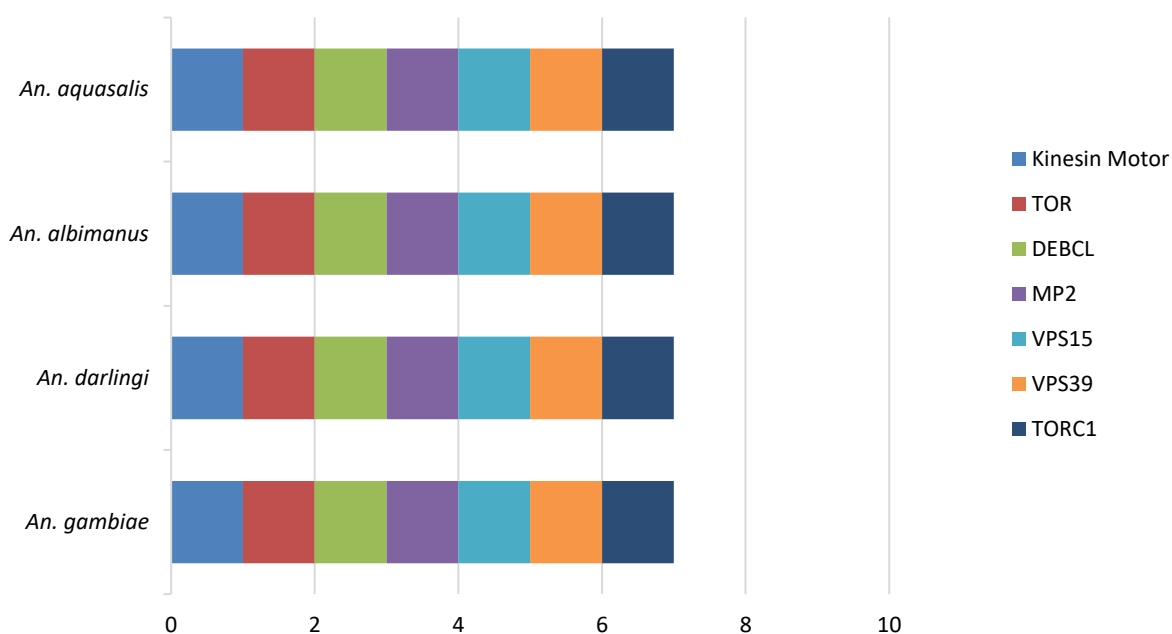


Figure 2. Number of genes related to pre-autophagy found in each anopheline.

Twenty-eight proteins were identified as belonging to pre-autophagy. All anophelines studied here presented the same number of copies, among them *Anopheles aquasalis*.

To identify the relationship in the specific variation in the number of APG genes, a heatmap analysis (Figure 3) of the number of copies was performed exclusively for the genes related to macroautophagy, considering that it was the only group that presented variation. Only three proteins showed variations, APG12 showed an exclusive duplication for *Anopheles gambiae*, APG1 and

APG7 were not found in *Anopheles darlingi*. The other genes did not show any variation, leading us to believe that the autophagy genes are highly conserved in these species.

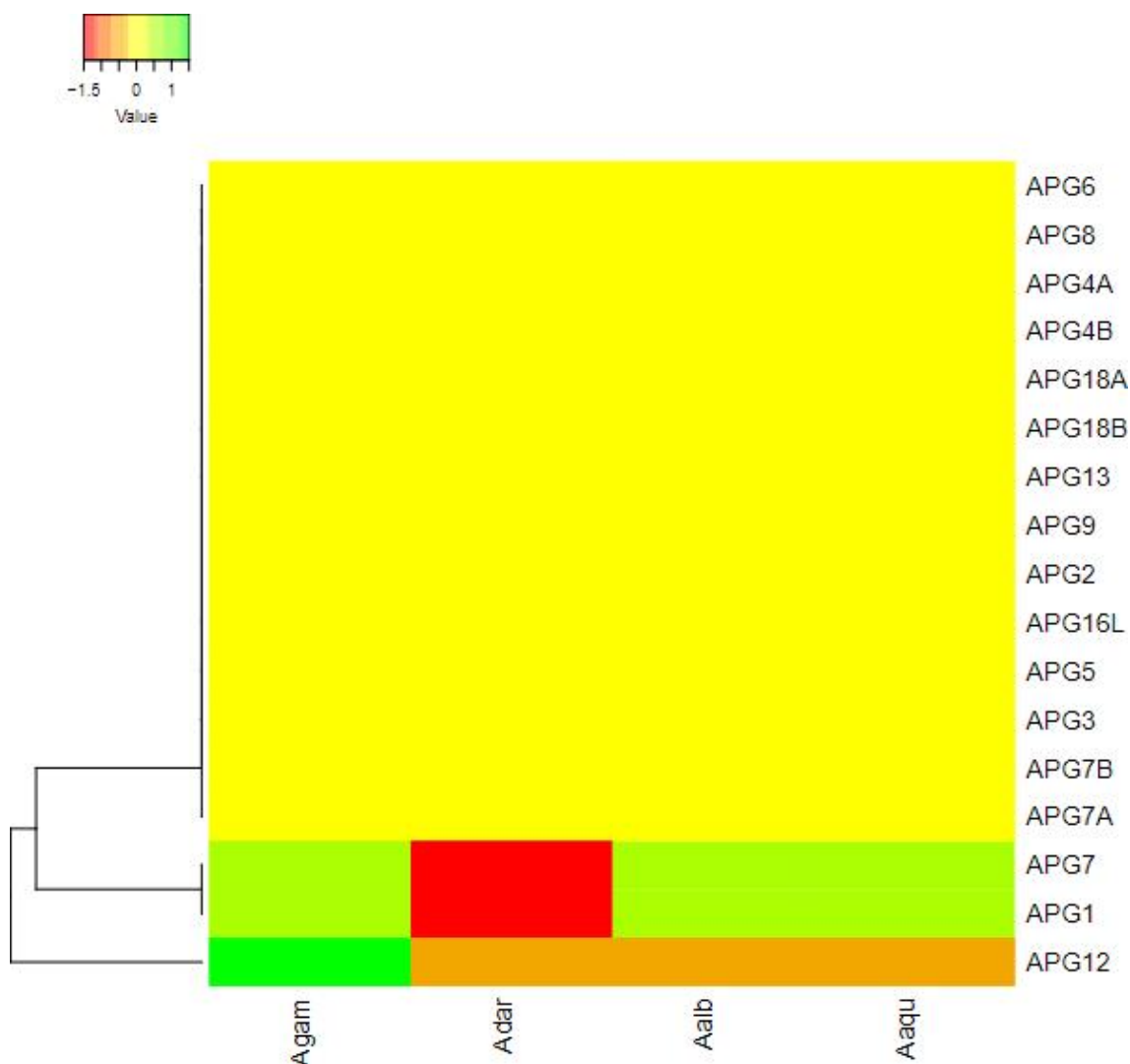


Figure 3. Heatmap of gene copy number variation in *Anopheles gambiae* (Agam), *Anopheles darlingi* (Adar), *Anopheles albimanus* (Aalb) and *Anopheles aquasalis* (Aaqu).

Phylogenetic analysis of autophagy genes

After identifying the autophagy genes, a phylogenetic analysis was performed, where two trees were built, one for each group. For the first group (Figure 4) 67 genes were grouped into 17 clades, where each clade has 4 genes, 1 for each species, except for clades number 1, 7 and 12, the first two have only 3 genes, and the last 5 genes.

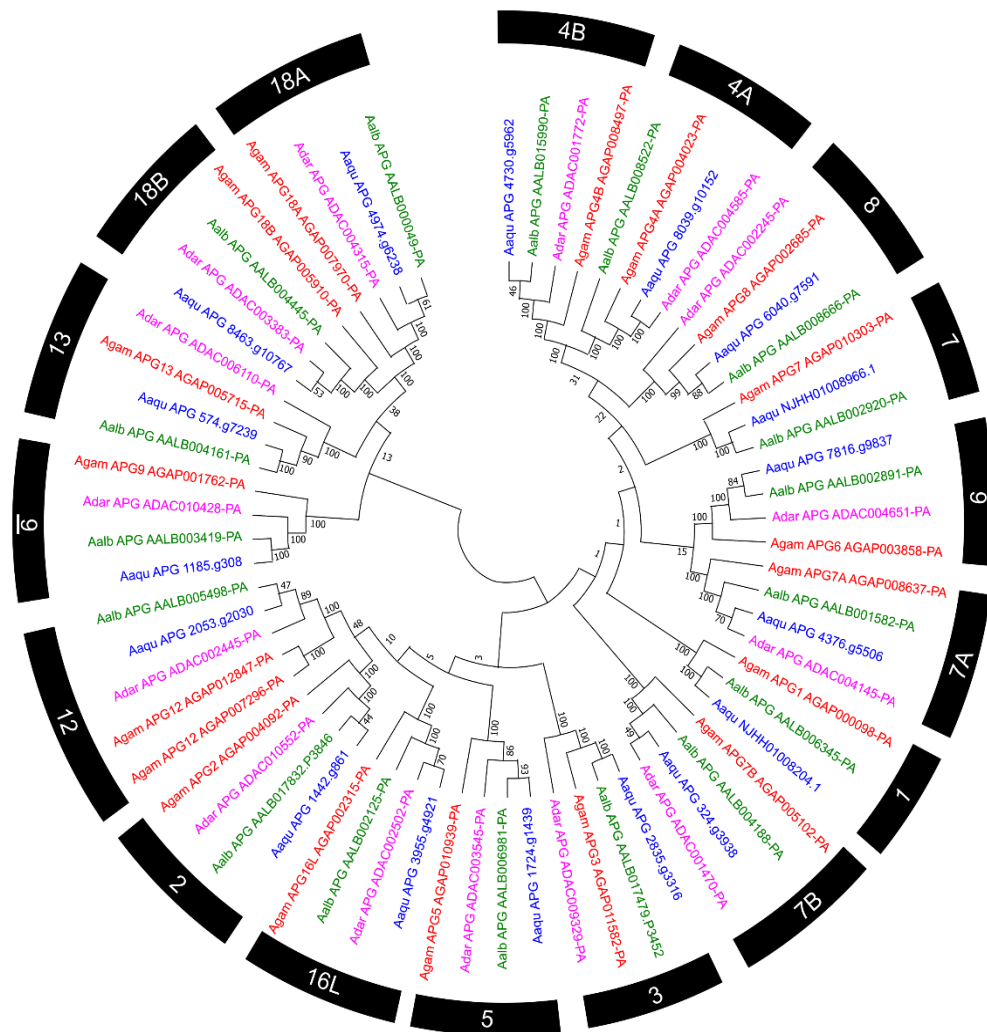


Figure 4. Evolutionary relationship of *An. aquasalis* genes related to autophagy. Phylogenetic tree by the Neighbor-joining method of amino acid sequences of mosquitoes *An. aquasalis* (blue), *An. darlingi* (pink), *An. albimanus* (green) and *An. gambiae* (red). Bootstrap values were calculated with 1000 replicates, and their values were presented on each tree branch.

For the second group (Figure 5) 28 genes were grouped into 7 clades, with 4 genes each. Each clade corresponds to a family of genes, namely: Target of Rapamycin (TOR), B-cell CLL/lymphoma 2 (DEBCL), MP2, Vacuolar Protein Sorting 15 (VPS 15), Rapamycin Complex 1 (TORC1), Vacuolar Protein Sorting 39 (VPS 39) and Kinesin Motor were identified as belonging to pre-autophagy.

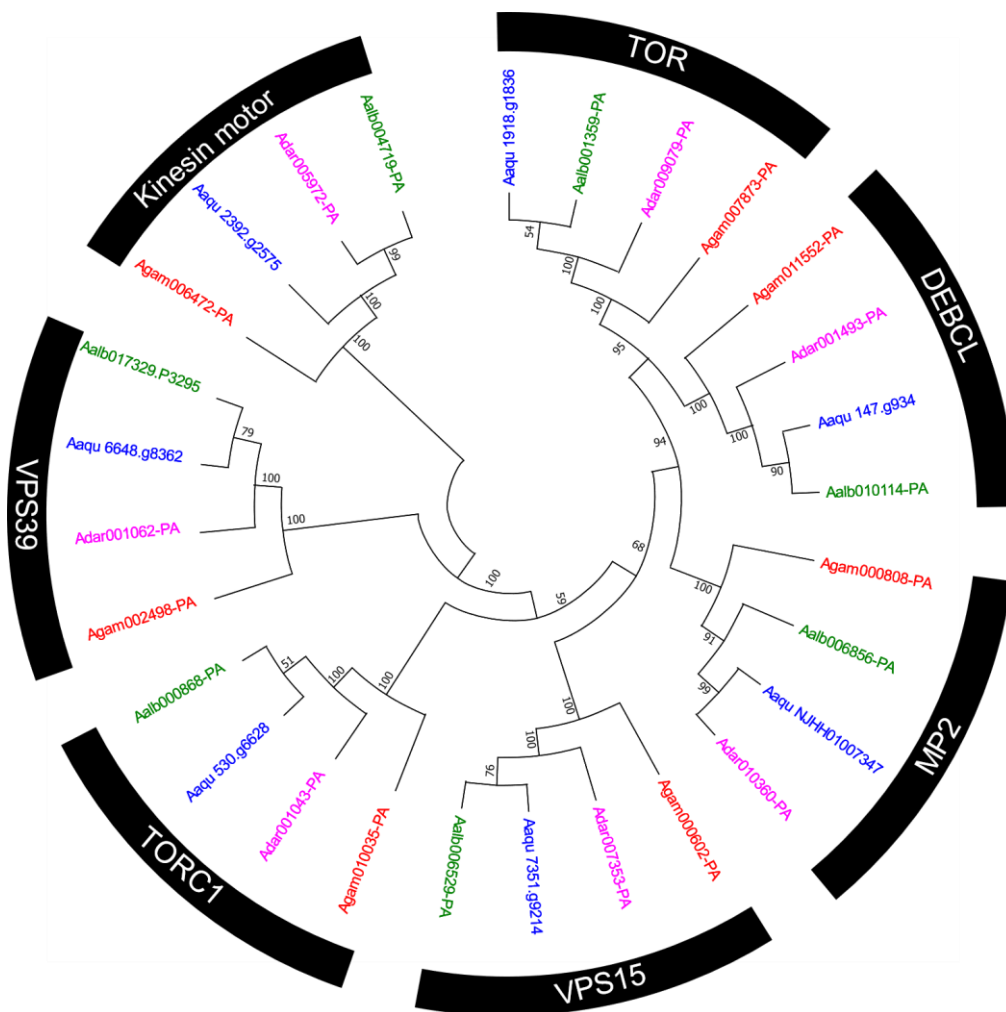
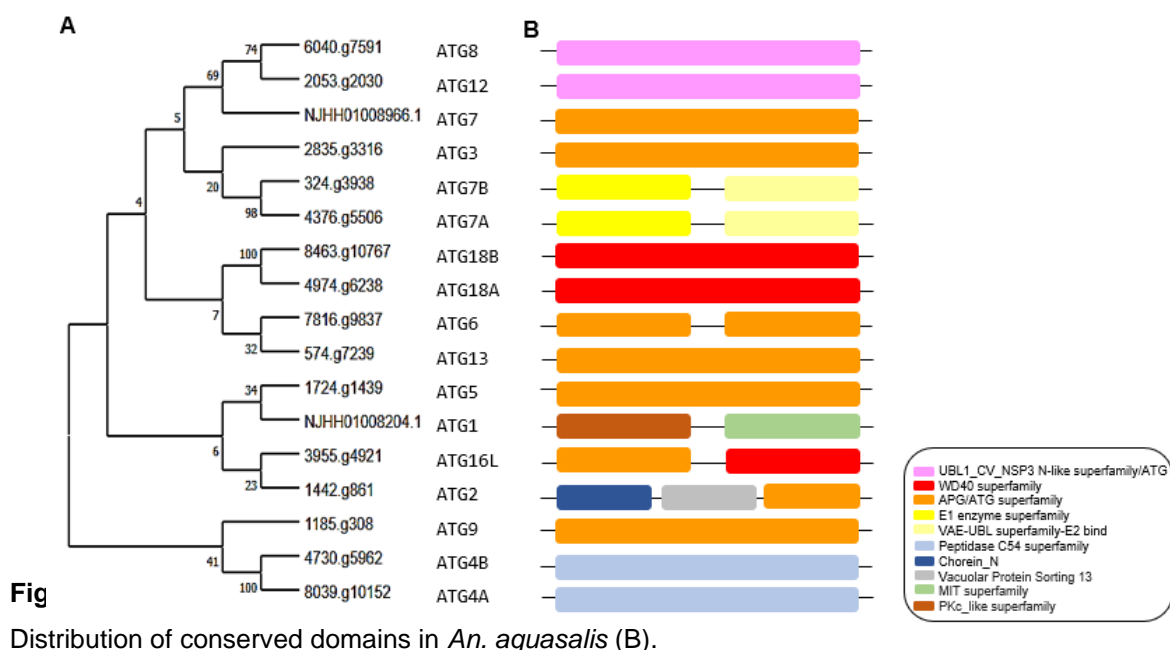


Figure 5. Evolutionary relationship of *An. aquasalis* genes related to pre-autophagy. Phylogenetic tree by the Neighbor-joining method of amino acid sequences of mosquitoes *An. aquasalis* (blue), *An. darlingi* (pink), *An. albimanus* (green) and *An. gambiae* (red). Bootstrap values were calculated with 1000 replicates, and their values were presented on each branch of the tree.

Conserved domains in proteins related to autophagy

Autophagy proteins are shown to be conserved in anophelines, in *An. aquasalis* 17 genes were described (Figure 6) for autophagy, and 7 genes were shown to belong to pre-autophagy (Figure 7). We can observe (Figure 6A) the evolutionary distribution of autophagy proteins and how is the composition of each one (Figure 6B).



For autophagy 10 different classes of domains were identified as composition of each APG protein of the 17 *An. aquasalis* proteins, 6 had exclusive APG domains. The others are composed of families such as WD40, UBL1 and C54.

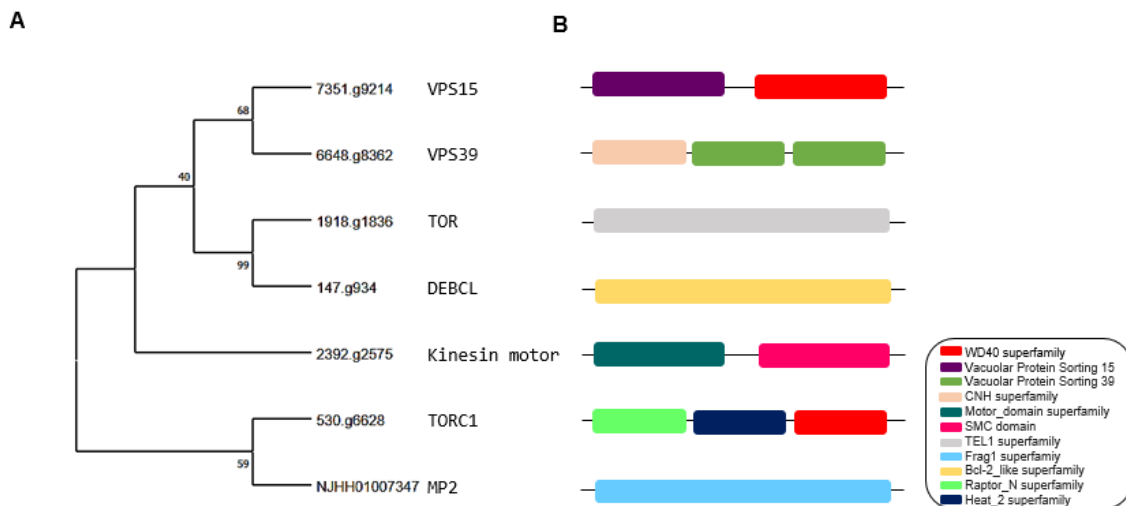


Figure 7. Phylogenetic relationship of genes from *An. aquasalis* related to pre-autophagy (A). Distribution of conserved domains in *An. aquasalis* (B).

We can observe (Figure 7A) the evolutionary distribution of pre-autophagy proteins and the composition of each one (Figure 7B), which reveals families of proteins not found in autophagy, including Frag 1, BCL 2, and Heat 2.

DISCUSSION

In this study, we performed the annotation of genes related to the cellular process of autophagy in *An. aquasalis*, comparing through phylogeny with the predicted genes in other anophelines, and recognizing each protein's domain composition.

The anophelines studied here are all Americans, except for *An. gambiae*, which is the primary African vector for human malaria and an essential object of study because it is well characterized (24).

Autophagy is regulated by genes responsible for autophagosome initiation, expansion, and nucleation, in addition to being upregulated or

downregulated by drugs, as described by Santana et al. (43), where wortmannin inhibited the autophagic pathway and spermidine activated it.

Autophagy genes are highly conserved from yeast to plants and mammals (25). In anophelines, these genes also proved to be well conserved according to our results. This conservation is often associated with essential genes for survival. The *An. aquasalis* was shown to have the same number of orthologs as *An. gambiae*, except for the ortholog of the ATG12 gene, was found with two copies in *An. gambiae*, as well as two isoforms of ATG12 in a plant of the *Arabidopsis* genus (26). The emergence of extra copies in *An. gambiae* may be related to a more remarkable ability to regulate the apoptosis process. However, only the functional evaluation of the sequence would indicate the role played by the extra ATG12 in autophagy (27).

ATG1 and ATG7 were conserved proteins in all anophelines except *An. darlingi*. These proteins participate in the initiation and expansion, respectively, of the autophagosome (28,29). In addition to these proteins, others may have the same function, such as ATG9 and ATG13, which are also responsible for initiation (30,31), which leads us to believe that *An. darlingi* uses other proteins for the autophagy process. The same occurs with the presentation of homologues 1:1 in ATG3, ATG5, and ATG16L, which are responsible for the expansion of the autophagosome (32,33,34), which can replace the non-conserved ATG7 in *An. darlingi*. All the proteins mentioned above are present in all anopheles studied in this work.

In addition to initiation and expansion, the autophagosome goes through a phase called nucleation, ATG6 is one of the proteins that are part of this process

(35) and is part of the formation of the pre-autophagosomal structure, along with proteins such as VPS15 (36).

There are two protein conjugation systems that act during the nucleation and expansion phases of the phagophore membrane, divided into ATG12 and ATG8. The ATG8 conjugation system is formed by ATG4, ATG5, ATG7 and ATG8 (37). The ATG12 conjugation system is formed by ATG5, ATG7, ATG10, ATG12 and ATG16 (38).

Some proteins have been identified as participants in autophagic processes even if they do not have the ATG domain, including TORC1, a homologue of ATG8 in yeast, and TOR is the target of the rapamycin complex, responsible for negatively regulating the autophagy pathway (37, 39).

VPS39 and Kinesin motor were also proteins that showed 1:1 homology in all anophelines, VPS39 is present in the fusion of the vacuole, while motor Kinesin is responsible for the movement of the autophagosome and in the fusion with the endocytic pathway (40,41).

Among the domains of autophagy proteins that we identified, ATG and WD40 were the main ones. The WD40 domain is present in proteins that are very abundant in eukaryotic organisms and are rarely present in prokaryotes, although some cases have been reported in bacteria (42).

Overall, the results presented in this study show that the autophagy pathway is highly conserved in anophelines. The results raised here will contribute to further research on autophagy and a better understanding of one of the mechanisms used by New World vectors.

CONCLUSION

In the present study, we used comparative genomics and functional annotation tools to explore autophagy proteins in *An. aquasalis*, the primary malaria vector in South America. Based on our results, we propose that these proteins involved in the autophagy process are highly conserved and essential for the anopheline immune response. The set of proteins presented here provides a solid basis for future investigations of the molecular functions of autophagy-related proteins in New World vectors.

REFERENCES

- 1- World malaria report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022.
Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 2- de Pina-Costa A, Brasil P, di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF e. S, et al. Malaria in Brazil: What happens outside the endemic Amazonian region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(5):618–33.
- 3- Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(1):23–47
- 4- He, C. and Klionsky, D.J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93.
- 5- Takeshige K., Baba M., Tsuboi S., Noda T.& Ohsumi Y.. 1992 Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119, 301–311. (doi:10.1083/jcb.119.2.301).
- 6- Baba M., Takeshige K., Baba N., Ohsumi Y. (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization.. *J. Cell Biol.* 124, 903-913.
- 7- Klionsky, D.J., and Y. Ohsumi 1999. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:1–32
- 8- Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(7):1125–1136.

- 9- Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(6):365–381.
- 10- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(12):759–774.
- 11- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20: 5971–5981
- 12- Klionsky, Daniel J et al. “A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes.” *Developmental cell* vol. 5,4 (2003): 539-45.
- 13- Baba M., Ohsumi M., Ohsumi Y. (1995). Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method.. *Cell Struct. Funct.* 20, 465-471.
- 14- Kunz J. B., Schwarz H.& Mayer A.. 2004 Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J. Biol. Chem.* 279, 9987–9996. (doi:10.1074/jbc.M307905200).
- 15- Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. 2013 Mar 15. In: *The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition.* Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013.
- 16- Giraldo-Calderón, G. I., Emrich, S. J., MacCallum, R. M., Maslen, G., Emrich, S., Collins, F., Dialynas, E., Topalis, P., Ho, N., Gesing, S., Madey, G., Collins, F. H., Lawson, D., Kersey, P., Allen, J., Christensen, M., Hughes, D., Koscielny, G., Langridge, N., Wieck, R. (2015). *VectorBase: An updated Bioinformatics Resource for*

invertebrate vectors and other organisms related with human diseases.

Nucleic Acids Research, 43(D1), D707–D713.

- 17-Jalili, Vahid et al. “The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update.” *Nucleic acids research* vol. 48,W1 (2020): W395-W402. doi:10.1093/nar/gkaa434
- 18-Birney, E., Clamp, M., & Durbin, R. (2004). GeneWise and Genomewise. *Genome Research*, 14(5), 988–995. <https://doi.org/10.1101/gr.1865504>
- 19- Lu, Shennan et al. “CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020.” *Nucleic acids research* vol. 48, D1 (2020): D265-D268.
- 20-Kumar, Sudhir et al. “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.” *Molecular biology and evolution* vol. 35,6 (2018): 1547-1549.
- 21-Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(1):W147–53.
- 22-Kumar, Sudhir et al. “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.” *Molecular biology and evolution* vol. 35,6 (2018): 1547-1549.
- 23-Saitou, N, and M Nei. “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.” *Molecular biology and evolution* vol. 4,4 (1987): 406-25.
- 24-Mongin E, Louis C, Holt RA, Birney E, Collins FH. The *Anopheles gambiae* genome: An update. *Trends Parasitol.* 2004;20(2):49–52.

- 25-Díaz-Troya, Sandra et al. "The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals." *Autophagy* vol. 4,7 (2008): 851-65.
- 26- Chung, Taijoon et al. "ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in Arabidopsis require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci." *The Plant journal : for cell and molecular biology* vol. 62,3 (2010): 483-93.
- 27-Bryant B, Blair CD, Olson KE, Clem RJ. Annotation and expression profiling of apoptosis-related genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008;38(3):331–45.
- 28-Sanjuan, Miguel A et al. "Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis." *Nature* vol. 450,7173 (2007): 1253-7.
- 29-Zhao, Haigang et al. "Atg1 phosphorylation is activated by AMPK and indispensable for autophagy induction in insects." *Insect biochemistry and molecular biology* vol. 152 (2023): 103888.
- 30-Mari, Muriel, and Fulvio Reggiori. "Atg9 trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Autophagy* vol. 3,2 (2007): 145-8.
- 31-Wong, Pui-Mun et al. "The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation." *Autophagy* vol. 9,2 (2013): 124-37.
- 32-Murrow, L., Malhotra, R. & Debnath, J. ATG12–ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function. *Nat Cell Biol* 17, 300–310 (2015).

- 33-Matsushita, Minako et al. "Structure of Atg5.Atg16, a complex essential for autophagy." *The Journal of biological chemistry* vol. 282,9 (2007): 6763-72.
- 34-Hamaoui, Daniel, and Agathe Subtil. "ATG16L1 functions in cell homeostasis beyond autophagy." *The FEBS journal* vol. 289,7 (2022): 1779-1800.
- 35-Kourtis, N, and N Tavernarakis. "Autophagy and cell death in model organisms." *Cell death and differentiation* vol. 16,1 (2009): 21-30.
- 36-Kihara, A et al. "Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of cell biology* vol. 152,3 (2001): 519-30.
- 37-Ichimura, Y et al. "A ubiquitin-like system mediates protein lipidation." *Nature* vol. 408,6811 (2000): 488-92.
- 38-Mizushima, N et al. "A protein conjugation system essential for autophagy." *Nature* vol. 395,6700 (1998): 395-8.
- 39-Kamada, Y et al. "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." *The Journal of cell biology* vol. 150,6 (2000): 1507-13.
- 40-Eitzen, G et al. "Sequential action of two GTPases to promote vacuole docking and fusion." *The EMBO journal* vol. 19,24 (2000): 6713-20.
- 41-Hunt, Sylvie D, and David J Stephens. "The role of motor proteins in endosomal sorting." *Biochemical Society transactions* vol. 39,5 (2011): 1179-84.

- 42-Stirnimann, Christian U et al. "WD40 proteins propel cellular networks." *Trends in biochemical sciences* vol. 35,10 (2010): 565-74.
- 43-Santana, RAG, Oliveira MC, Cabral I et al. Anopheles aquasalis transcriptome reveals autophagic responses to Plasmodium vivax midgut invasion. *Parasit Vectors*. 2019. 24;12(1):261

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

O início das análises foi realizado no servidor da FIOCRUZ-MG. Porém o servidor entrou em manutenção e não foi possível continuar o trabalho. Já o servidor de Manaus tem somente disponibilidade para acesso local. Para resolver o problema foi utilizado o servidor online do galaxy, que permitiu realizar as análises com a mesma eficiência.

Não foi possível encontrar duas proteínas para *An. darlingi*, não podemos afirmar se ele perdeu ou faltou caracterizar, mas como o foco do nosso estudo foi caracterizar e classificar proteínas de *An. aquasalis*, isso não afetou os nossos resultados.

Com os dados encontrados torna-se possível a caracterização dessas proteínas a nível molecular, o que pode ser realizado em trabalhos futuros.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, usamos genômica comparativa e ferramentas de anotação funcional para explorar proteínas de autofagia em *An. aquasalis*, o principal vetor costeiro da malária da América do Sul. Com base em nossos resultados, propomos que essas proteínas envolvidas no processo de autofagia são altamente conservadas e essenciais para a resposta imune dos anofelinos. O conjunto dessas proteínas aqui apresentado fornece uma base sólida para futuras investigações das funções moleculares de proteínas relacionadas a autofagia em vetores do Novo Mundo.

6. REFERÊNCIAS

1- World malaria report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

2 - Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Malária 2021. Boletim Epidemiológico [Internet]. 2021 nov [22/07/2022]; Número Especial:22-35.Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletimsepidemiologicos>

3 - Deane, Leonidas M. 1986. Malaria vectors in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 81, p. 5- 14.

4- 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 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and Vectors* 5: 1–11.

5 - Orfano AS, Duarte APM, Molina-Cruz A, et al. *Plasmodium yoelii nigeriensis* (N67) is a robust animal model to study malaria transmission by South American anopheline mosquitoes. *PLoS One*. 2016;11(12):1–15.

6- de Pina-Costa A, Brasil P, di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF e. S, et al. Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):618–33.

7- Consoli, RA; Oliveira, RL 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz.

8 - Clements, NA 2013. *The Physiology of Mosquitoes: International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Zoology*, Elsevier v. 17.

9 - Titus, R. G.; Bishop, J. V.; Mejia, J. S 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite immunology*, v. 28, n. 4, p. 131- 141.

10 - Service, Mike. 2012. *Anopheline mosquitoes (Anophelinae)*. *Medical Entomology for Students*. 5. ed. United States of America: Cambridge University Press p. 37. ISBN 978-1-107-66818-8.

11 - Brasil P, Gustavo Zalis M, PinaCosta A de, Machado Siqueira A, Bianco Júnior C, Silva S, Luiz Lisboa Areas A, Pelajo-Machado M, Anete Madureira de Alvarenga D, Carolina Faria da Silva Santelli A, Gomes Albuquerque H, Cravo P, Vieira Santos de Abreu F, Leonel Peterka C, Maria

Zanini G, Cecilia Suárez Mutis M, Pissinatti A, Lourenço-deOliveira R, Ferreira Alves de Brito C, Fátima Ferreira-da-Cruz M de, Culleton R, Tadeu DanielRibeiro C 2017. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*. v. 5, p. e1038-1046.

12 – Galinski MR, Meyer EV, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: modern strategies to study a persistent parasite's life cycle. *Adv Parasitol*. 2013;81:1-26. doi: 10.1016/B978-0-12-407826-0.00001-1. PMID: 23384620.

13 - Sinnis, P and Coppi, A. A long and winding road: the *Plasmodium* sporozoite's journey in the mammalian host. *Parasitol.Int*. 56[3], 171-178. 2007.

14 - Lacerda MVG, Siqueira AM, Alecrim MGC; Alecrim WD. 2015. Malária. In: Tavares W; Marinho LAC. (ed.). *Rotinas de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu. cap. 115, p. 772-773. ISBN 978-85-388- 0641-7

15 - Mohanty AK, Nina PB, Ballav S, Vernekar S, Parkar S, Maria D, et al. Susceptibility of wild and colonized *Anopheles stephensi* to *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*. 2018;1–10.

16 - Molina-cruz A, Dejong RJ, Ortega C et al. Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria parasite, evade the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes. 2012;1–6.

17- Santana, RAG, Oliveira MC, Cabral I et al. *Anopheles aquasalis* transcriptome reveals autophagic responses to *Plasmodium vivax* midgut invasion. *Parasit Vectors*. 2019. 24;12(1):261

18 - Moy RH, Cherry S. Antimicrobial autophagy: a conserved innate immune response in *Drosophila*. *J Innate Immun*. 2013;5:444–55.

19- Drexler AL, Pietri JE, Pakpour N, et al. Human IGF1 regulates midgut oxidative stress and epithelial homeostasis to balance lifespan and *Plasmodium falciparum* resistance in *An. stephensi*. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004231.

20- Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(1):23–47

21 - Costa-da-Silva AL, Marinotti O, Ribeiro JMC et al. Transcriptome Sequencing and Developmental Regulation of Gene Expression in *Anopheles aquasalis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e3005.

22 - Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. 2013 Mar 15. In: The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013.

23- Giraldo-Calderón, G. I., Emrich, S. J., MacCallum, R. M., Maslen, G., Emrich, S., Collins, F., Dialynas, E., Topalis, P., Ho, N., Gesing, S., Madey, G., Collins, F. H., Lawson, D., Kersey, P., Allen, J., Christensen, M., Hughes, D., Koscielny, G., Langridge, N., Wieck, R. (2015). VectorBase: An updated Bioinformatics Resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D707–D713. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1117>

24 - Jalili, Vahid et al. “The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update.” *Nucleic acids research* vol. 48,W1 (2020): W395-W402. doi:10.1093/nar/gkaa434

25- Birney, E., Clamp, M., & Durbin, R. (2004). GeneWise and Genomewise. *Genome Research*, 14(5), 988–995. <https://doi.org/10.1101/gr.1865504>

26- Lu, Shennan et al. “CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020.” *Nucleic acids research* vol. 48, D1 (2020): D265-D268. doi:10.1093/nar/gkz991

27 - Kumar, Sudhir et al. “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.” *Molecular biology and evolution* vol. 35,6 (2018): 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096

28- Saitou, N, and M Nei. “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.” *Molecular biology and evolution* vol. 4,4 (1987): 406-25. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

29- Martínez-Barnette J, Gómez-Barreto RE, Ovilla-Muñoz M, et al. Transcriptome of the adult female malaria mosquito vector *Anopheles albimanus*. *BMC Genomics*. 2012;13:207. Published 2012 May 30.

30 - Wang Y, Qiao J, Zhang D, Zhong C, Wang S, et al. (2021) Systematic identification of autophagy-related proteins in *Aedes albopictus*. *PLOS ONE* 16(1): e0245694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245694>

31 - Kim CE, Park KB, Ko HJ, Keshavarz M, Bae YM, Kim B, Patnaik BB, Jang HA, Lee YS, Han YS, Jo YH. *Aedes albopictus* Autophagy-Related Gene 8

(*AaAtg8*) Is Required to Confer Anti-Bacterial Gut Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(8):2944.

32 - Forattini O. *Culicidologia Médica*. São Paulo; 2003.

33 - Neves DP. *Parasitologia Humana*. 11 ed. Atheneu, editor. São Paulo; 2005. 494 p.

34 - Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. In: *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001. p. 97–106.

35 - Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. Vol. 4, *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2012.

36 - Sinden, RE. *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parasitologia* 41[1-3], 139-148. 1999.

37- Hillyer, JF, Barreau, C, and Vernick, KD. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *Int.J Parasitol*. 37[6], 673-681. 2007.

38- Pimenta, PF, Touray, M, and Miller, L. The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J Eukaryot.Microbiol*. 41[6], 608-624. 1994.

39- Miller, LH, Baruch, DI, Marsh, K, and Doumbo, OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415[6872], 673-679. 2002.

40- He, C. and Klionsky, D.J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet*. 43, 67–93.

41- Wang RC, Levine B (2010) Autophagy in cellular growth control. *FEBS Lett* 584:1417–1426.

42 - Takeshige K., Baba M., Tsuboi S., Noda T.& Ohsumi Y.. 1992 Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol*. 119, 301–311.

43- Baba M., Takeshige K., Baba N., Ohsumi Y. (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization.. *J. Cell Biol*. 124, 903-913.

44- Klionsky, D.J., and Y. Ohsumi 1999. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 15:1–32

45- Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(7):1125–1136.

46- Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(6):365–381.

47- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(12):759–774.

48 - Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20: 5971–5981

49- Klionsky, Daniel J et al. “A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes.” *Developmental cell* vol. 5,4 (2003): 539-45.

50- Baba M., Ohsumi M., Ohsumi Y. (1995). Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. *Cell Struct. Funct.* 20, 465-471.

51- Kunz J. B., Schwarz H.& Mayer A. (2004). Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J. Biol. Chem.* 279, 9987–9996.

52- Bahia, Ana C et al. “Anopheles aquasalis Infected by Plasmodium vivax displays unique gene expression profiles when compared to other malaria vectors and plasmodia.” *PloS one* vol. 5,3 e9795. 22 Mar. 2010.

53- Bahia, Ana C et al. “The JAK-STAT pathway controls Plasmodium vivax load in early stages of Anopheles aquasalis infection.” *PLoS neglected tropical diseases* vol. 5,11 (2011): e1317.

54- Bahia, Ana C et al. “An Anopheles aquasalis GATA factor Serpent is required for immunity against Plasmodium and bacteria.” *PLoS neglected tropical diseases* vol. 12,9 e0006785. 24 Sep. 2018.

55- Rios-Velásquez, Claudia M et al. “Experimental Plasmodium vivax infection of key Anopheles species from the Brazilian Amazon.” *Malaria journal* vol. 12 460. 21 Dec. 2013.

56- De Duve, C. “The lysosome.” *Scientific American* vol. 208 (1963): 64-72.

57 - Cuervo, Ana Maria. “Autophagy and aging: keeping that old broom working.” *Trends in genetics : TIG* vol. 24,12 (2008): 604-12.

58 - Yun, Hyeong Rok et al. "Roles of Autophagy in Oxidative Stress." *International journal of molecular sciences* vol. 21,9 3289. 6 May. 2020.

7. ANEXOS E APÊNDICES

7.1 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		Versão
Título	Análises filogenéticas	
Língua do Documento	Português - BR	
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
		Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas

1. OBJETIVO

Padronizar o procedimento de análises filogenéticas de proteínas do *Anopheles aquasalis* comparando com outras espécies de anofelinos realizado no Laboratório de Bioinformática do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) / Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Grupos de pesquisa do IPCCB / FMT-HVD.

3. DEFINIÇÕES

Não se aplica

4. RESPONSABILIDADES

Alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado, pesquisadores e colaboradores treinados em bioinformática.

5. POP'S RELACIONADOS

Anotação do genoma do *Anopheles aquasalis*

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Equipamentos

Biblioteca de dados VectorBase e NCBI

Servidor online Galaxy (use.galaxy.org) e Genewise

Computador com acesso à internet

Programas MEGA-X e Inkscape

7. PROCEDIMENTOS

7.1 Busca da família de genes de interesse

Acessar a biblioteca de dados VectorBase e buscar os a família de genes de interesse no proteoma do *An. gambiae* (ATG)

Genes > Arthropoda > Insecta > Diptera > Culicidae > Anopheles > Gambiae species complex > Anopheles gambiae PEST > Export as a Search Strategy > Download > Tab- or comma-delimited (openable in Excel) - choose columns to make a custom table > Choose Columns > Gene name or Symbol > Download Type > Comma-delimited(.csv).file* > Get genes

Formatar dados baixados em formato de tabela no Excel

Baixar proteoma do *An. aquasalis* – Augustus_Proteínas_aquasalis.fasta (anotado pelo nosso grupo de estudos de Bioinformática)

Baixar proteoma do *An. gambiae* no VectorBase > Data > Download data files > release-55/ > AgambiaePEST/ > fasta/ > data/ > VectorBase-55_AgambiaePEST_AnnotatedProteins.fasta

Baixar proteoma do *An. darlingi* no VectorBase > Data > Download data files > release-55/ > AdarlingiCoari/ > fasta/ > data/ > VectorBase-55_AdarlingiCoari_AnnotatedProteins.fasta

Baixar proteoma do *An. albimanus* no VectorBase > Data > Download data files > release-55/ > AalbimanusSTECLA/ > fasta/ > data/ > VectorBase-55_AalbimanusSTECLA_AnnotatedProteins.fasta

7.2 Servidor Online Galaxy

Criar conta no servidor usando email e senha para manter o histórico das atividades, bem como os arquivos salvos

Carregar as bases de dados dos proteomas dos anofelinos

Upload Data > Choose local files > Augustus_Proteinas_aquasalis.fasta >

VectorBase-55_AgambiaePEST_AnnotatedProteins.fasta >

VectorBase-55_AdarlingiCoari_AnnotatedProteins.fasta >

VectorBase-55_AalbimanusSTECLA_AnnotatedProteins.fasta

Type > Fasta > Genome > A.gambiaeOct.2006 > Start

Descarregar os cabeçalhos das sequências de proteínas da família de interesse

Copiar todos os códigos das proteínas da família de interesse em bloco de notas e salvar como arquivo "txt"

Repetir o procedimento com todas as famílias de interesse

Carregar os arquivos dos cabeçalhos no Galaxy

7.3 MAKEBLASTDB

Fazer um MAKEBLASTDB de cada uma das bases de dados para formatar a base de dados das proteínas de interesse.

NCBI BLAST+ makeblasdb > protein > Anopheles_selecionado.fasta > Execute

7.4 BLASTDBCMD entry(s)

Extrair as sequências do BLAST das bases de dados de interesse

NCBI BLAST + blastdbcmd entry(s) > protein > BLAST database from your history > from file > sequence identifier(s) > cabeçalho_familia_de_interesse >

Execute

Baixar arquivos

7.5 BLASTP

Buscar proteína da base de dados contra a proteína de interesse

Protein query sequence > arquivo_resultante_blastdbcmd_entry(s) > BLAST database from your history > protein BLAST database > arquivo_resultante_makeblastdb > type of BLAST > blastp > output format > tabular (standard 12 columns) > Execute

Nota: Fazer o mesmo procedimento para as outras espécies *An. albimanus* e *An. darlingi*.

7.6 Organização dos resultados em planilhas

Organizar os resultados em planilha do Excel

Classificar os dados de acordo com o maior valor de identidade acima de 35%, seguido por menor valor de e-value

Remover as duplicatas

Fazer uma busca do gene modelo nos resultados do blast com o PROCV para retornar o melhor resultado do blast para o gene modelo.

7.7 Anotação manual

Anotar manualmente os genes fragmentados e perdidos

Abrir o servidor online do Genewise (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/genewise/>)

Fazer o upload da proteína modelo de *An. gambiae*

Fazer o upload da scaffold do *An. aquasalis* onde o gene será anotado

Na opção Splice Site selecionar a opção Modelled

Executar

Nota: No resultado será gerado um arquivo no formato gff com os dados da anotação, assim como o arquivo fasta de proteínas e CDS

7.8 Filogenia

Descarregar os cabeçalhos das sequências de proteínas da família de interesse

Copiar todos os códigos das proteínas da família de interesse em bloco de notas e salvar como arquivo “txt”

Repetir o procedimento com todas as famílias de interesse

Recuperar as sequência fasta para a filogenia, segundo o item 7.4

Concatenar as sequências de proteínas de *An. aquasalis*, *An. darlingi*, *An. albimanus* e *An. gambiae* em um arquivo multifasta

Abrir o arquivo multifasta no MEGA-X

Clicar em Alinhamento > Alinhamento pelo Muscle > Deixar opções padrão > OK

Exportar o arquivo do resultado do alinhamento no formato “.meg”

Clicar em Filogenia > Construir Filogenia Neighbor-joining > Selecionar arquivo do alinhamento no formato “.meg”

Preferências de Análise:

Teste de filogenia – método Bootstrap

Número de réplicas – 1000

Modelo de substituição tipo – aminoácido

Modelo – p-distance

Taxa entre sítios – taxas uniformes

Gaps/Missing data – Deleção por pares

Número de threads – 3

Salvar a árvore filogenética no formato “.MTSX”

Clicar em Imagem > Salvar como SVG > Salvar

Abrir a imagem SVG no Inkscape para a edição de cores para cada espécie

Salvar imagem no formato “PNG.”

8. REFERÊNCIAS

AFGAN, E., BAKER, D., BATUT, B., et al. "The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update", **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W537–W544, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky379.

BIRNEY, E., CLAMP, M., DURBIN, R. "GeneWise and Genomewise", **Genome Research**, v. 14, n. 5, p. 988–995, 2004. DOI: 10.1101/gr.1865504.

BLEIDORN, C. **Phylogenomics: An introduction**. [S.l.: s.n.], 2017.

KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., et al. "MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

MADDEN, T. "The BLAST sequence analysis tool", **The BLAST Sequence Analysis Tool**, n. Md, p. 1–17, 2013.

SAITOU, N., NEI, M. "The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees", **Mol. Biol. Evol**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

7.2 EQUIPE

Igor Belém de Souza - mestrando - PPGMT-UEA

Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta - orientador - FIOCRUZ/MG e PPGMT-UEA

Dra. Nágila Francinete Costa Secundino - coorientadora- FIOCRUZ/MG e PPGMT-UEA

Cesar Camilo Prado Sepúlveda – colaborador - PPGMT-UEA

MSc. Rodrigo Maciel Alencar - colaborador - PPGMT-UEA

Gigliola Mayara Ayres D'Elia - mestranda - PPGMT-UEA

Dr. Wuelton Marcelo Monteiro - colaborador - PPGMT-UEA

Dr. Leonardo Barbosa Koerich - colaborador– UFMG

Dra. Ana Paula Marques Duarte - colaboradora - PPGMT-UEA

Dra. Rosa Amélia Gonçalves Santana - colaboradora - PPGMT-UEA

Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira - colaborador - UFRJ

Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine - colaborador - UFRJ

Dra. Ana Cristina Bahia Nascimento – UFRJ