

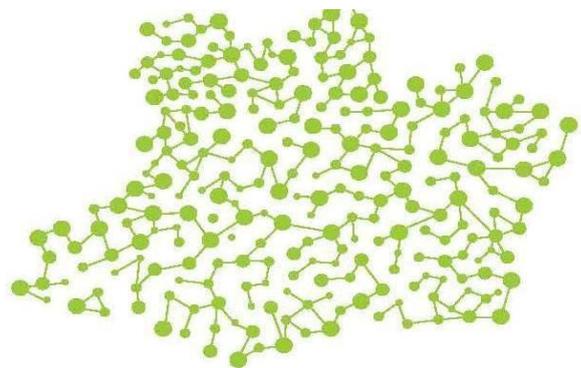


UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS



IMPORTÂNCIA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAM) NA RESPOSTA IMUNE
DE *Anopheles aquasalis* À INFECÇÃO POR *Plasmodium yoelii nigeriensis* E
Plasmodium vivax

MAURICIO COSTA DE OLIVEIRA



MANAUS

2018

MAURICIO COSTA DE OLIVEIRA

**IMPORTÂNCIA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAM) NA RESPOSTA IMUNE
DE *Anopheles aquasalis* À INFECÇÃO POR *Plasmodium yoelii nigeriensis* E
*Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre *em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador (a): Prof.^a Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra.

Co-orientador (a): Prof. Dr. Henrique Manuel Condinho da Silveira.

MANAUS

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

O48ei Oliveira, Mauricio Costa de
Importância dos Peptídeos Antimicrobianos (PAM's) na resposta imune de *Anopheles aquasalis* à Infecção por *Plasmodium yoelii nigeriensis* e *Plasmodium vivax*. Mauricio Costa Oliveira. - Manaus, 2018. / Mauricio Costa de Oliveira. Manaus: [s.n], 2018.
82 f.: color.; 30 cm.

Dissertação - Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018.

Inclui bibliografia

Orientador: Prof.^a Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Coorientador: Prof. Dr. Henrique Manuel Condinho da Silveira.

1. *Anopheles aquasalis*. 2. Mosquitos. 3. Peptídeos Antimicrobianos. I. Prof.^a Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra (Orient.). II. Prof. Dr. Henrique Manuel Condinho da Silveira. (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Importância dos Peptídeos Antimicrobianos (PAM's) na resposta imune de *Anopheles aquasalis* à Infecção por *Plasmodium yoelii nigeriensis* e *Plasmodium vivax*. Mauricio Costa Oliveira. - Manaus, 2018.

FOLHA DE JULGAMENTO**IMPORTÂNCIA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAM) NA
RESPOSTA IMUNE DE *Anopheles aquasalis* À INFECÇÃO POR
Plasmodium yoelii nigeriensis E *Plasmodium vivax*****MAURICIO COSTA DE OLIVEIRA**

“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 Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Prof.^a Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra
Presidente

Prof.^a Dr. Vanderson de Souza Sampaio
Membro

Prof.^a Dra. Ana Paula Marques Duarte
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que ajudaram, aos que investiram, aos que acreditaram nele e na minha capacidade. Especialmente ao meu Deus, à minha família, aos meus amigos e meus orientadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu querido e poderoso DEUS, por me conceder o seu amor, o seu poder, a minha vida, minha saúde e todas as bênçãos do mundo para exercer este trabalho. A cada dia admiro mais sua bondade, sua justiça, sua fidelidade, seu amor que me sustentou e vai ser a minha base em todos os momentos da minha vida. Sou imensamente grato em tudo concedido por DEUS, na minha vida e na vida das pessoas que amo, para ele eu dedico todas as minhas vitórias e glórias.

A minha amada família, especialmente a minha avó, Francisca Aguiar, minha mãe Arlene da Silva Costa, minha irmã Nirleane Costa de Oliveira, ao meu pai Claudomiro Aguiar de Oliveira, e todas as tias, tios, primas e primos pela admiração, ajuda nas dificuldades, alegria e por sempre acreditarem na minha capacidade.

A minha orientadora Professora Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra por ter me orientado, desde minha graduação, por ter permitido fazer parte do seu grupo de pesquisa, que considero como minha segunda família. Agradeço imensamente a paciência, a confiança, os ensinamentos, apoio nos diversos momentos, incentivo e as cobranças que foram essenciais e de suma importância para concluir este trabalho e por fazer parte deste momento da minha vida.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Henrique Silveira, pela confiança, pelo incentivo, por junto de minha orientadora, me proporcionar muitos momentos de conhecimento, ensinamentos valiosos, pela elaboração da dissertação, paciência, amizade, por ter me orientado também desde a minha graduação. Agradeço muito.

A Rosa Santana, pessoa que é muito importante para min, pois tenho como orientadora, uma maravilhosa amiga e mãe. Agradeço toda a sua atenção, sua amizade, seus ensinamentos, conversas, pelas muitas risadas, pelos conselhos importantes, correções, acompanhamento nos experimentos, mesmo em meio aos seus afazeres durante seu doutorado. Agradeço imensamente pelo seu apoio e sua dedicação. Sou eternamente grato por tudo.

O meu agradecimento a minha amiga Íria Cabral, a primeira pessoa a me orientar no laboratório, por sempre ter me ajudado desde o meu voluntariado até o meu mestrado. Na altura de técnica responsável pelo insetário Dr. Agostinho Cruz Marques, responsável pelo fornecimento de mosquitos para os experimentos deste

trabalho, agradeço por toda sua ajuda na execução do trabalho, ensinamentos, “puxões de orelhas”, amizade e diversos momentos de alegrias proporcionados.

Ao Sr. Nelson Ferreira Fé, gerente do Centro de Entomologia Médica da FMT-HVD, que me acolheu da melhor forma possível, possuidor de conhecimentos valiosos sobre a entomologia e por sua dedicação nesta fundação. Tenho imensa gratidão pelo apoio, por ter acreditado no meu potencial e pela sua disponibilidade.

Agradeço aos técnicos do Centro de Entomologia Médica da FMT-HVD, Sr. Flávio Fé, Dona Iolanda Noguth, Maria Auxiliadora, Silvana Arakian, no qual ajudaram na concretização deste estudo, à recepcionista Juciele Queiroz, o Senhor Francisco de Assis, do setor de transportes, que realizava a condução de materiais. Agradeço a todos estes, os ensinamentos e momentos alegres no qual foram compartilhados.

A Arineia Soares, Débora Raysa, Lucas Ferreira e Susan Smith, por ajudar na parte escrita e principalmente nos procedimentos de biologia molecular deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos de laboratório pelo respeito, amizades, ajuda em alguns momentos da pesquisa e pelo convívio: Andréa Paz, Bárbara Chaves, Camila Fabbri, Cláudia Rodrigues, Denner Carvalho, Djane Clarys, Emily de Sousa, Érica Chagas, Evelyn Vaz, Felipe Jules, Francineude Garcia, Francys Andrade, George Silva, Glenda Quaresma, Igor Tavares, Jéssica Ortiz, José Júnior, Kenny Rodrigues, Kleine Feitosa, Laylah Magalhães, Laíse Magalhães, Luís Carlos, Luís Maciel, Macejane Ferreira, Marcel Gonçalves, Roberta Cláudia, Rômulo Freire, Sabrina Brito, Sara Giselle, Rahyja Teixeira, Rubens Celso, Suzan Simões e Tirza Gabrielle.

Aos técnicos do setor de coleta da malária, que me ajudaram no recrutamento ou na coleta de sangue dos pacientes: Elizabeth Raitz, Rai Costa, Ednildo Rocha, Marta Oliveira, Marly Marques, Irislene Figueiredo, Izabel Ferreira, Anne Almeida, Siuhelem Rocha, Tayna Ribeiro, Emanuelle Lira, Laila Rowena, Alexandre Trindade, Beбето Muller, Vanessa, Kelry Mazurenga, Valéria Souza e Marcela Sousa.

A Gerência de Malária, em nome da Dra. Mônica Costa, que abriu as portas do laboratório, para que fosse realizado os procedimentos de biologia molecular.

Agradecimento especial ao Professor Doutor Allysson Guimarães, por ajudar na quantificação de RNA das amostras deste trabalho durante o final dos experimentos.

Aos amigos da turma de mestrado e doutorado do PPGMT, pelas ótimas tardes que passamos, ganhando conhecimentos e compartilhando alegrias, dentre eles: Alba

Brandão, Ana Luísa, André Leturiondo, Clyvia Rossi, Elijane Redivo, João Arthur (Tutuca Rockeiro), Jorge Bernal, José Evelio, Katia Couceiro, Karla Petrucelli, Lorena de Souza, Sâmella de Oliveira, Solange Dourado, Thamires Moriz e Thielle Cruz.

Aos meus professores pelo privilégio de ter seus ensinamentos nas disciplinas do PPGMT, aos funcionários da secretaria do PPGMT, em especial a Conceição Tufic e Altariza Freitas por sempre estarem disponíveis em ajudar.

Aos doutores Vanderson Sampaio e Claudia Ríos por contribuírem com suas sugestões na qualificação de mestrado.

Aos voluntários que aceitaram participar deste estudo.

A minha amiga Amanda Rayane, pela admiração, por sempre ter acreditado, apoiado, pela confiança e por nunca ter duvidado de minha capacidade;

A minha amiga Laura Catrine, por ter me indicado como voluntário à FMT-HVD, em 2013, onde desde lá, trilhei até no mestrado, agradeço pelas horas de alegria, conselhos e orações da sua família que eu recebia.

A minha amiga Luciana Diniz, pessoa abençoada na qual tenho profunda admiração, carinho. Uma das minhas melhores companhias nos diversos momentos.

Aos amigos Lucci Valle, Frank Júnior, Felipe Bonfim, Lane Gabrielle, Priscilla Oliveira e Will Santos pelas reuniões alegres e por acreditarem em meu potencial.

Aos meus amigos Itallo Furtado e Arlison pela confiança.

Aos amigos de faculdade Alan, André, Marcelo, Cristian, Ednei, Antônio, Noslen e Rayner.

A minha amiga Ana Cecília, pessoa que acreditou sempre no meu potencial.

A Beniza Siqueira, que nunca deixou de me incentivar.

A Universidade do Estado do Amazonas (UEA), através da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMT) e à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, pela estrutura oferecida.

À Coordenação de Apoio à Pesquisa (CAPES), pelo suporte financeiro através da bolsa de estudo concedida no período de dois anos de mestrado.

E a todas as pessoas, não mencionadas, que direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

A todos, meu muito obrigado!

DECLARAÇÃO DAS AGENCIAS FINANCIADORAS

Os dados dessa pesquisa tiveram o apoio financeiro da Coordenação de Apoio à Pesquisa – CAPES e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM. Esse projeto faz parte de dois projetos maiores, o primeiro, sob título “Resposta imune inata de anofelinos vetores de malária na Amazônia à infecção pelo *Plasmodium*”, coordenado pela Prof. Dr. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra e o segundo sob título “Resposta à infecção por *Plasmodium* em mosquitos do novo mundo” do Programa de apoio à pesquisa – Universal Amazonas, edital número 030/2013, coordenado pelo Prof. Dr. Henrique Manuel Condinho da Silveira.

“ O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar, 1857

RESUMO

Parasitas do gênero *Plasmodium* também infectam outros animais como por exemplo macacos, roedores ou aves, facilitando a utilização de espécies de *Plasmodium* não humanos como modelo para o estudo da interação entre o parasita - hospedeiro. Dos mecanismos de defesa que compõem as barreiras estruturais e imunológicas inatas dos mosquitos, estão os peptídeos antimicrobianos – PAM's, que proporcionam proteção contra organismos invasores. O sistema imune inato do mosquito possui um aprimorado sistema de reconhecimento de patógenos, que é ativado quando o agente invasor entra em contato com o ambiente interno do organismo através da interação entre os padrões moleculares associados aos patógenos e os receptores de reconhecimento padrões do hospedeiro. Estudos sobre as interações entre vetor-parasito, principalmente do mosquito transmissor da malária, tem obtido, elevada atenção, abrindo espaço para a criação de novas estratégias no controle da malária. Este trabalho tem por objetivo analisar a importância dos PAMs na defesa do mosquito *An. aquasalis* em resposta à infecção por *Plasmodium yoelii nigeriensis* e *Plasmodium vivax*. O estudo foi realizado no laboratório de entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado-FMT-HVD, envolveu experimentação animal, inoculando-se *P. yoelii nigeriensis* em camundongos, utilizados para repasto de mosquitos por alimentação direta. No controle utilizou-se camundongos livres de infecção e para os experimentos com *P. vivax*, foi utilizado amostras de sangue, coletadas de pacientes diagnosticados com malária, com prévia autorização dos mesmos, em um tubo heparinizado de 5 ml para alimentação artificial com grupos de 500 mosquitos, divididos para teste e controle. As alterações na transcrição dos genes que codificam os PAM's foram determinadas através de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) do intestino médio dos grupos de mosquitos dissecados às 15, 18 e 24hs após o repasto para *P. yoelii nigeriensis* e 15, 18, 24 e 48hs para *P. vivax*, período correspondente a janela temporal de invasão dos oocinetos no epitélio do intestino médio do mosquito. Os demais mosquitos alimentados foram mantidos até o décimo dia de infecção para dissecação do intestino médio e contagem de oocistos para determinação da taxa e intensidade de infecção. Das 14 infecções realizadas para *P. yoelii nigeriensis*, 6 foram negativas, 3 obtiveram taxas de infecção baixa (4 - 15%) e 5 apresentaram elevadas taxas de infecção (30 - 60%). Quanto a análise de expressão dos PAM's para *P. yoelii nigeriensis*, os genes que codificam o peptídeo gambicina se mantiveram expressos em todos os intervalos nos experimentos com taxas de infecção baixa; não foi observado expressão deste gene nos experimentos com taxas de infecção mais elevadas. Para os experimentos com *P. vivax*, 9 infecções foram realizadas. Destas, 6 apresentaram taxa de infecção entre 1% e 60% e 2 tiveram 100 % de infecção. Todos os genes codificadores de PAM's estiveram expressos durante a infecção por *P. vivax*. Os resultados indicam que os PAMs podem estar favorecendo o sistema imune de *An. aquasalis* no controle à infecção por *P. yoelii nigeriensis* e *P. vivax*. A expressão de todos os peptídeos, se mostraram mais ativas nos intervalos de 15 e 18h. *An aquasalis*, se mostrou um bom modelo de infecção para as duas espécies de parasito.

Palavras Chaves: *Anopheles aquasalis*, mosquitos, peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

Parasites of the genus *Plasmodium* also infect other animals such as monkeys, rodents or birds, facilitating the use of non - human *Plasmodium* species as models to study the interaction between the parasite and the host. Of the defence mechanisms that make up the innate immunological barriers of mosquitoes are the antimicrobial peptides - PAMs, which provide protection against invading organisms. The innate immune system of the mosquito has a pathogen recognition system that is activated when the invading agent comes into contact with the organism through the interaction between molecular patterns associated with pathogens and the host's pattern recognition receptors. Studies on the interactions between vector and parasite, especially of the malaria transmitting mosquito, have received high attention, opening avenues for the creation of new strategies for the control of malaria. This work aims to analyze the importance of the PAMs in the defence of *An. Aquasalis* mosquitoes in response to *Plasmodium yoelii nigeriensis* and *Plasmodium vivax* infections. The study was carried out in the entomology laboratory at the Dr. Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT_HVD). *P. yoelii nigeriensis* was inoculated in mice and used to infect mosquitoes by direct feeding. Infection-free mice were used as control. For the experiments with *P. vivax*, blood samples were collected from patients diagnosed with malaria, who previously gave informed consent. Five ml were collected into a heparinized tube for artificial membrane feeding. Transcriptional alterations of genes coding for PAMs were determined by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) of the midgut of groups of mosquitoes dissected at 15, 18 and 24 h after repacking for *P. yoelii nigeriensis* and 15, 18, 24 and 48hs for *P. vivax*, period corresponding to the temporal window of invasion of the oocinetos in the mosquito midgut epithelium. Mosquitoes were maintained until the tenth day of infection for midgut dissection and oocyst counts to determine the rate and intensity of infection. Of the 14 infections carried out for *P. yoelii nigeriensis*, 6 were negative, 3 were classified as low infection rates (4 - 15%) and 5 as high infection rates (30 - 60%). As for the PAM's expression analysis in response to *P. yoelii nigeriensis*, the genes coding for the gambicin was expressed at all intervals in the experiments with low infection rates, no expression of this gene was observed in the experiments with higher infection rates. For the experiments with *P. vivax*, 9 infections were performed. Of these, 6 had infection rates between 1% and 60% and 2 had 100% infection. All genes encoding PAM's for *P. vivax* were expressed. The results indicate that PAMs may be used by the immune system of *An. aquasalis* to control *P. yoelii* and *P. vivax* infection. The expression of all peptides were more active in the intervals of 15 and 18h. *An aquasalis*, showed to be a good model of infection for the two species of parasite.

Keywords: *Anopheles aquasalis*, mosquitoes, antimicrobial peptides.

RESUMO LEIGO

Os mosquitos podem se defender de organismos causadores de doenças quando o agente invasor entra em contato com seu corpo respondendo através da produção de substâncias chamadas de peptídeos antimicrobianos – PAM's. Estudos sobre as interações entre vetor e parasito, principalmente do mosquito transmissor da malária, tem obtido, muita atenção, na busca de novas estratégias no controle da malária. Este trabalho tem por objetivo analisar a importância dos PAM's na defesa dos mosquitos transmissores de malária, *Anopheles aquasalis*, quando infectados por parasitos de camundongos de nome *Plasmodium yoelii nigeriensis*. No laboratório de entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado-FMT-HVD, realizaram-se testes colocando-se 14 grupos de 250 mosquitos, *Anopheles aquasalis*, para se alimentar em camundongos infectados com *Plasmodium yoelii nigeriensis*. Foram realizadas observações do intestino dos mosquitos após a refeição nos camundongos infectantes em diferentes intervalos de tempo (15hs, 18hs e 24hs). Em 6 grupos não houve infecção, em 3 a infecção foi baixa (4 - 15%) e 5 grupos apresentaram taxas elevadas de infecção (30 - 60%). Os peptídeos antimicrobianos de nome gambicina foram observados em todos os intervalos nos experimentos com taxas de infecção baixa; bem como o peptídeo cecropina às 18hpi. Para os experimentos com *P. vivax*, 9 infecções foram realizadas, destas, 6 apresentaram taxa de infecção entre 1% e 60% e 2 tiveram 100% de infecção. Os resultados indicam que os PAMs podem estar protegendo *An. aquasalis* na infecção por *P. yoelii nigeriensis* e *P. vivax*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países endêmicos para Malária nos anos de 2000-2016.	21
Figura 2 - Mapa com a distribuição da malária no Brasil em 2017.....	22
Figura 3 - Ciclo de vida do mosquito <i>Anopheles</i>	23
Figura 4 - Distribuição do vetor <i>Anopheles</i> no continente americano no ano de 2013.	25
Figura 5 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	26
Figura 6 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro invertebrado.	27
Figura 7 - Fluxograma da metodologia aplicada às alimentações de <i>An. aquasalis</i> com camundongos.....	41
Figura 8 - Fluxograma da metodologia aplicada às alimentações artificiais de <i>An. aquasalis</i> , com membrana.	43
Figura 9 - Distribuição da intensidade de infecção por testes – <i>P. yoelii nigeriensis</i>	49
Figura 10 - Expressão dos peptídeos antimicrobianos no intestino médio de mosquitos com baixas taxas de infecção por <i>P. yoelii nigeriensis</i>	50
Figura 11 - Expressão dos peptídeos antimicrobianos no intestino médio de mosquitos com altas taxas de infecção por <i>P. yoelii nigeriensis</i>	51
Figura 12 - Distribuição da intensidade de infecção por testes – <i>P. vivax</i>	53
Figura 13 -Expressão dos peptídeos antimicrobianos no intestino médio de mosquitos infectados por <i>P. vivax</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da quantidade de mosquitos que foram alimentados, dissecados para biologia molecular e visualização de oocistos.....	47
Tabela 2 - Dados das infecções experimentais com dissecção de intestino para visualização de oocistos para <i>Plasmodium yoelii nigeriensis</i>	48
Tabela 3 - Dados das infecções experimentais com dissecção de intestino para visualização de oocistos para <i>P. vivax</i>	52

LISTA DE ABREVIações, SIMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

% - Percentual

(%G) - Porcentagem de gametocitemia

(%P) - Porcentagem de parasitemia

A. d - Alimentação direta

Ae. - *Aedes*

An. - *Anopheles*

ANOVA - Análise de variância

Att - Attacina

cDNA - DNA complementar

Cec - Cecropina

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA – Comissão de ética ao uso de animais

Def1 – Defensina 1

Def2 – Defensina 2

Def4 – Defensina 4

DEPC - Dietilpirocarbonato

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos fosfatados - “deoxynucleotide triphosphates”

dsRNA - do inglês, double-stranded RNA

E.P - Eritrócitos parasitados

FMT-HVD - Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

g – Grama

Gam - Gambicina

GENT - Gerência de Entomologia

h - Horas

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

IP - Intraperitoneal

iRNA - RNA de interferência

Kg - Kilograma

M.O - Microscopia óptica

mg - Miligrama

min - Minutos

mL – Mililitro

MS – Ministério da Saúde

MP - Matriz Peritrófica

n - Número de uma amostra

ng - Nanogramas

°C - Graus Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

P. - *Plasmodium*

PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato (Phosphate Buffered Saline)

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

P. yoelii nigeriensis - *Plasmodium yoelii nigeriensis* N67

RT PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA- Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

RT-qPCR - Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa.

spp - Espécies

TBE - Tris-Ácido Bórico-EDTA

x - Vezes

µg - Micrograma

µL - Microlitros

µM – Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 A malária	20
1.2 Os vetores	23
1.4 Ciclo de transmissão do <i>Plasmodium</i> no vetor <i>Anopheles</i>	27
1.5 Competência e capacidade vetorial	28
1.6 Modelos de infecção para estudos de interação entre parasitos e hospedeiros .	30
1.7 Resposta imune do mosquito à infecção por <i>Plasmodium</i>	33
1.8 Peptídeos antimicrobianos – PAM's.....	34
2 OBJETIVOS	38
2.1 Geral	38
2.2 Específico	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Modelo de estudo.....	39
3.2 Aspectos éticos	39
3.4 Infecções de mosquitos através de alimentação direta em camundongos e dissecção de estômagos.....	40
3.5 Infecção experimental de mosquitos com <i>Plasmodium vivax</i>	41
3.6 Infecções de mosquitos através de alimentação artificial por membrana	41
3.7 Análise da transcrição dos genes que codificam PAM de <i>Anopheles aquasalis</i> durante a infecção por <i>Plasmodium yoelii nigeriensis</i> e <i>Plasmodium vivax</i>	43
3.8 Extração de RNA.....	43
3.8.1 Tratamento do RNA com DNase.....	44
3.8.2 Síntese de cDNA.....	44
3.8.3 Reação da polimerase de cadeia em tempo real (Real time PCR)	44
3.9 Análise estatística	45
4. RESULTADOS	46
4.1 Caracterização das alterações de transcrição dos genes que codificam os Peptídeos Anti-Microbianos: Cecropina; Defensina 1; Defensina 2; Defensina 4; Attacina e Gambicina durante a invasão do intestino médio pelo oocineto.....	46
4.1.1 Dados gerais do quantitativo de mosquitos utilizados nas infecções	46
4.1.2 Infecções de <i>Anopheles aquasalis</i> com <i>Plasmodium yoelii nigeriensis</i>	46

4.1.3 Infecções de <i>Anopheles aquasalis</i> com <i>Plasmodium vivax</i>	51
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8. ANEXOS	67
8.1 Aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD.....	67
8.2 Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais	73
8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE	74
8.4 Questionário de infecção experimental em anofelinos	76
8.5 Procedimento operacional padronizado para extração de RNA.....	77
8.6 Procedimento operacional padronizado para infecção experimental por alimentação artificial através de membrana por anofelinos.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 A malária

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários heteróxeos pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*, onde são descritas quatro espécies causadoras de infecção em seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium vivax*, além de outras espécies de *Plasmodium*. Estudos mostraram que seres humanos podem ser infectados por transmissão zoonótica por *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium knowlesi* na Ásia, *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium* nas Américas (1). O parasito é transmitido ao homem através da picada das fêmeas infectadas de mosquitos da ordem Díptera, família Culicidae, gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo (2). *P. vivax*, destaca-se no Brasil como o responsável por mais de 80% dos casos de malária nos últimos anos (3, 4).

Considerada uma das principais doenças parasitárias do mundo, acomete grande contingente de pessoas principalmente em países tropicais (5, 6). A nível mundial, estima-se que haja 3,2 milhões de pessoas com risco de contraírem a malária em 91 países endêmicos (Figura 1), havendo 216 milhões de novos casos e 445.000 óbitos por esta doença em 2016 (6).

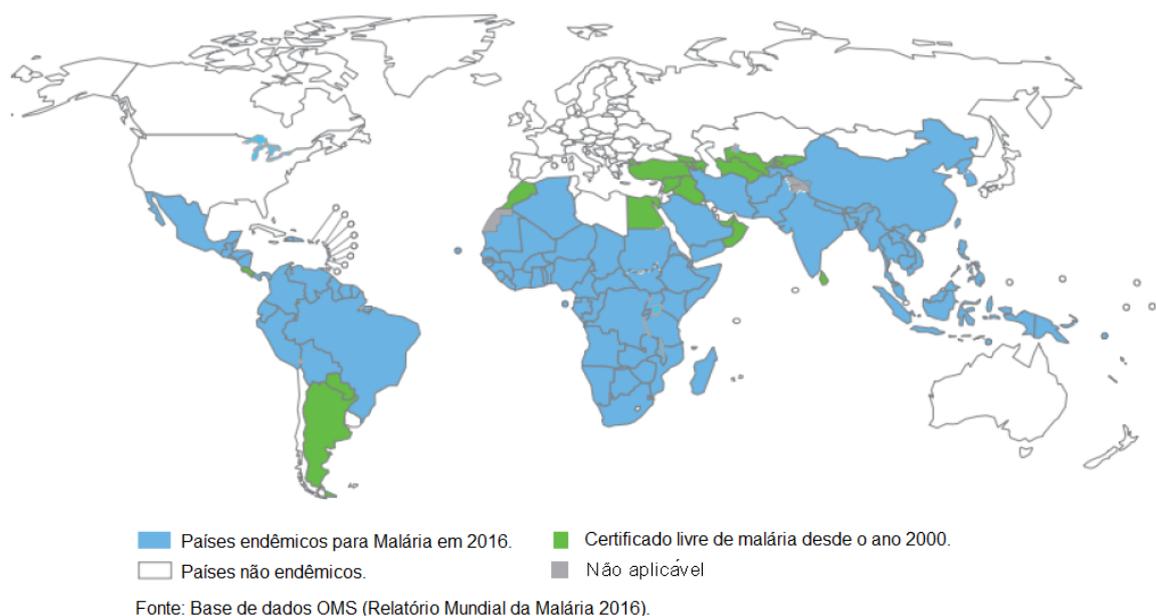
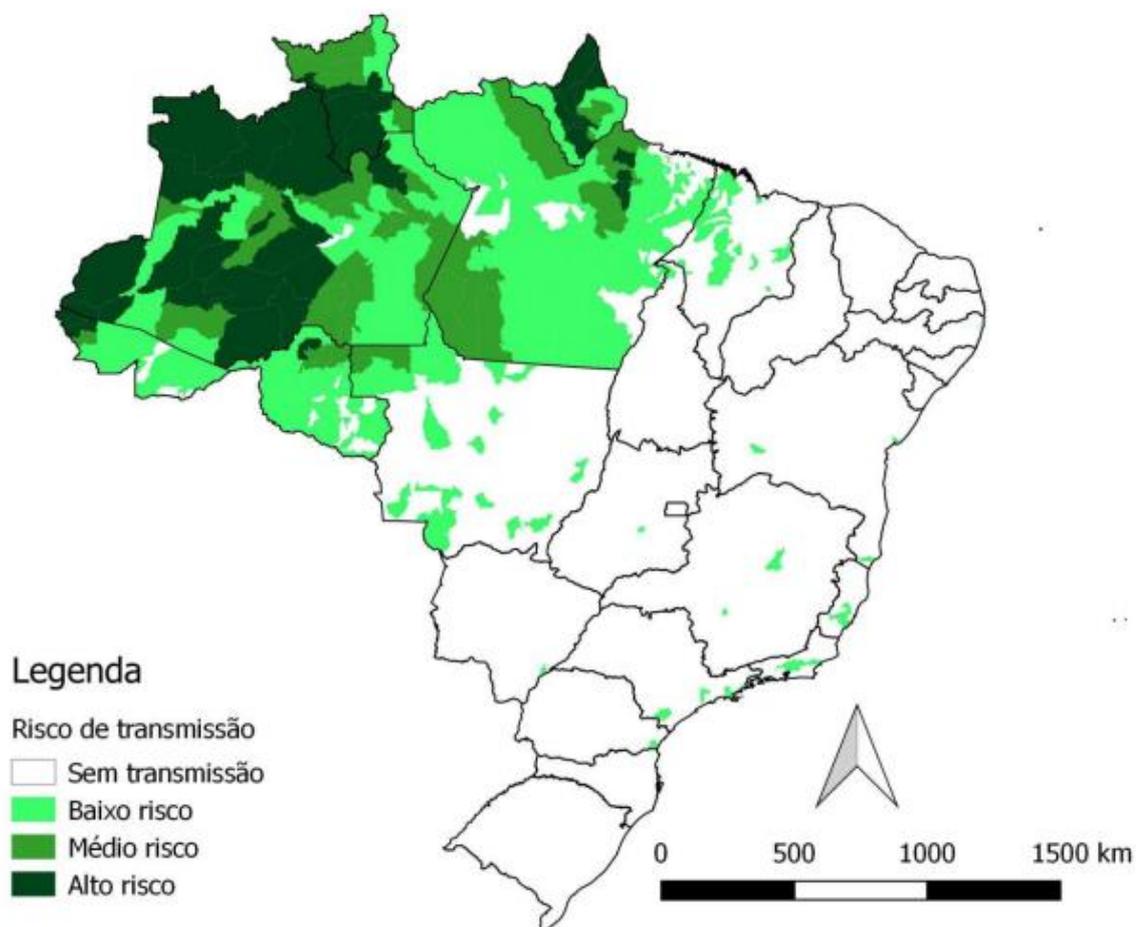


Figura 1 - Países endêmicos para Malária nos anos de 2000-2016.

Na América Latina, durante o ano de 2015, houve 660.000 casos de malária e 500 mortes conforme dados da Organização Pan-Americana da Saúde (7). O Brasil confirmou 129.251 casos em 2016, segundo a Organização Mundial da Saúde; e a tendência era de queda, já que 143.161 casos foram registrados em 2015 (6). Nesse mesmo ano, no Brasil, a Incidência Parasitária Anual de malária por 1.000 habitantes foi de 0,67, com maior concentração na região norte do país, onde ocorrem cerca de 99,5% dos casos da doença. Os Dados do Ministério da Saúde, mostram que ainda que 37% da Incidência Parasitária Anual (IPA) de malária, ocorre no estado do Amazonas e desse quantitativo 25% está concentrado em sua capital, Manaus (5).

Entre os anos de 2002 a 2013, houve uma redução de 75% no número de casos registrados no Brasil e em 2014 na Amazônia brasileira ocorreu o menor número de casos de malária (143.552) registrados nos últimos 35 anos (8). Apesar disso, ainda há evidências de altos riscos de surtos, especialmente nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Mato Grosso e Roraima, além de 209 outros municípios da região amazônica (9), devido a fatores ambientais e sociais, como a migração da população humana, os assentamentos ilegais, habitações precárias, entre outros, que favorecem o contato entre seres humanos e os vetores do agente patogênico (10) (Figura 2).

Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2017.



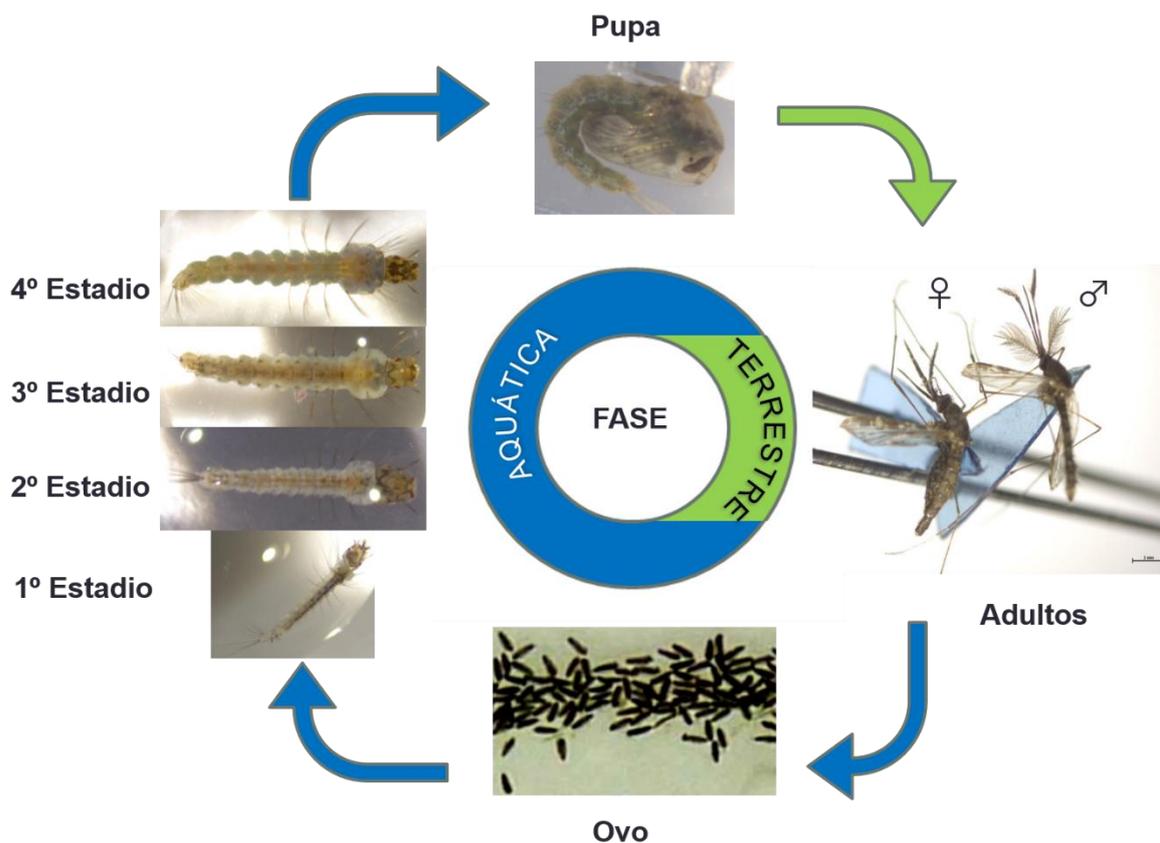
Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Dados preliminares, sujeitos à alteração.

Figura 2 - Mapa com a distribuição da malária no Brasil em 2017.

Para propiciar o controle ou até mesmo a eliminação da malária, são necessárias medidas eficazes combinadas principalmente com a conscientização da população. Entre estas medidas, podem consistir ainda, medidas que já foram aplicadas em locais altamente endêmicos para a malária, como as técnicas utilizadas nos vetores para determinar as taxas de transmissão, em conjunto com a elucidação das diferenças ecológicas, demográficas e socioeconômicas da população relacionada com a transmissão (11) ou técnicas com a utilização de mosquitos transgênicos que controlem a infecção por *Plasmodium* nos mosquitos em locais de intensa transmissão ou mesmo técnicas que utilizem microrganismos como agentes de controle biológico de doenças transmitidas por vetores (12).

1.2 Os vetores

A malária é transmitida por mosquitos, taxonomicamente classificados dentro da Ordem Díptera, Família Culicidae e Gênero *Anopheles*. São insetos com metamorfose completa (holometábolos), ou seja, durante seu desenvolvimento passam pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto (13) (Figura 3).



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 3 - Ciclo de vida do mosquito *Anopheles*.

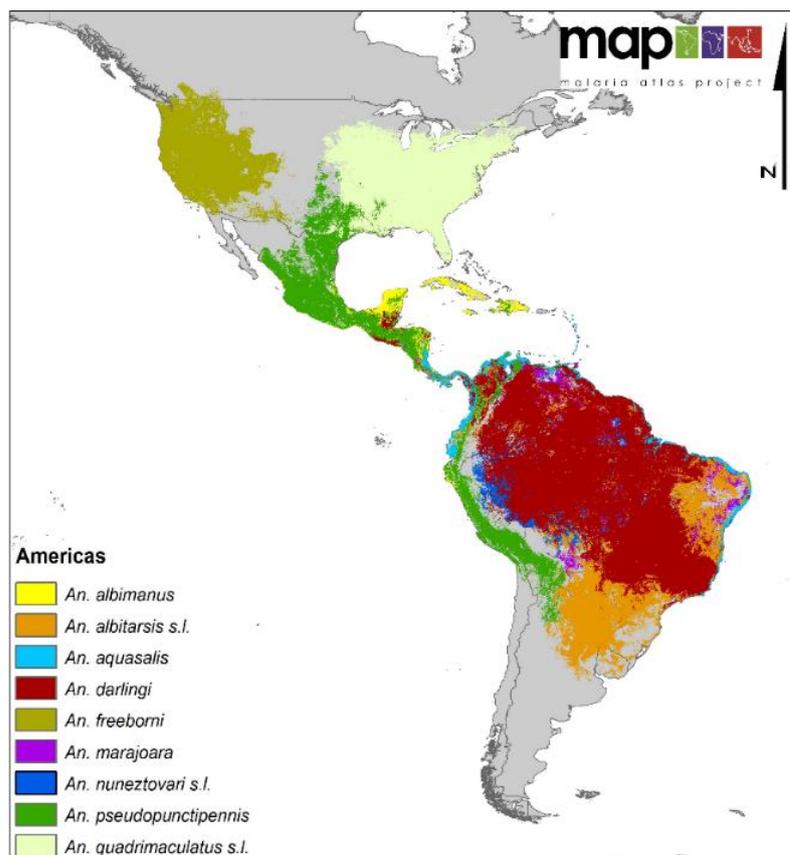
O gênero *Anopheles* é composto por cerca de 450 espécies, 41 estão envolvidas na transmissão de *Plasmodium* ao homem e, dentre elas, nove estão distribuídas nas Américas: *Anopheles albimanus*, *Anopheles albitarsis*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles freeborni*, *Anopheles marajoara*, *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles pseudopunctipennis* e *Anopheles quadrimaculatus* (14) (Figura 4).

As principais espécies transmissoras da malária no Brasil são: *An. darlingi* e *An. aquasalis*, sendo que *An. darlingi* destaca-se tanto na transmissão da doença, por sua distribuição geográfica no território brasileiro, quanto pela sua antropofilia e capacidade de se infectar pelas espécies *P. vivax* e *P. falciparum* (15) .

Na Região Amazônica têm sido registradas aproximadamente 33 espécies de *Anopheles* spp, mas *Anopheles darlingi* é considerado o principal vetor (16).

An. aquasalis é uma espécie distribuída nas regiões litorâneas do Oceano Atlântico, desde a Nicarágua na América Central até o sudeste do Brasil na América do Sul e paralelamente no Equador pelo Oceano Pacífico (12). Assim como o *An. darlingi*, tem atividade crepuscular, além de ser considerado o principal vetor na Venezuela, Trinidad e Tobago, Guiana Francesa, Guiana e em áreas litorâneas do norte e nordeste do Brasil (17). Na Região Amazônica foram realizados estudos com infecções laboratoriais infectados com *P. vivax* com taxas de infecção variando entre 0,26 e 1,28% (16-20).

Em regiões em que a densidade de mosquitos vetores de malária, aumenta, este fator pode estar associado a vários focos de malária em diversos países, principalmente nas regiões costeiras do oceano Atlântico e do Pacífico da América Central para o sul do Brasil (21-24). Entre os fatores que estão associados a transmissão da malária pelo *An. aquasalis* está sua tolerância à água salgada, algo que a favorece e evita competição por comida com outras espécies de *Anopheles*, especialmente na fase larval (25).

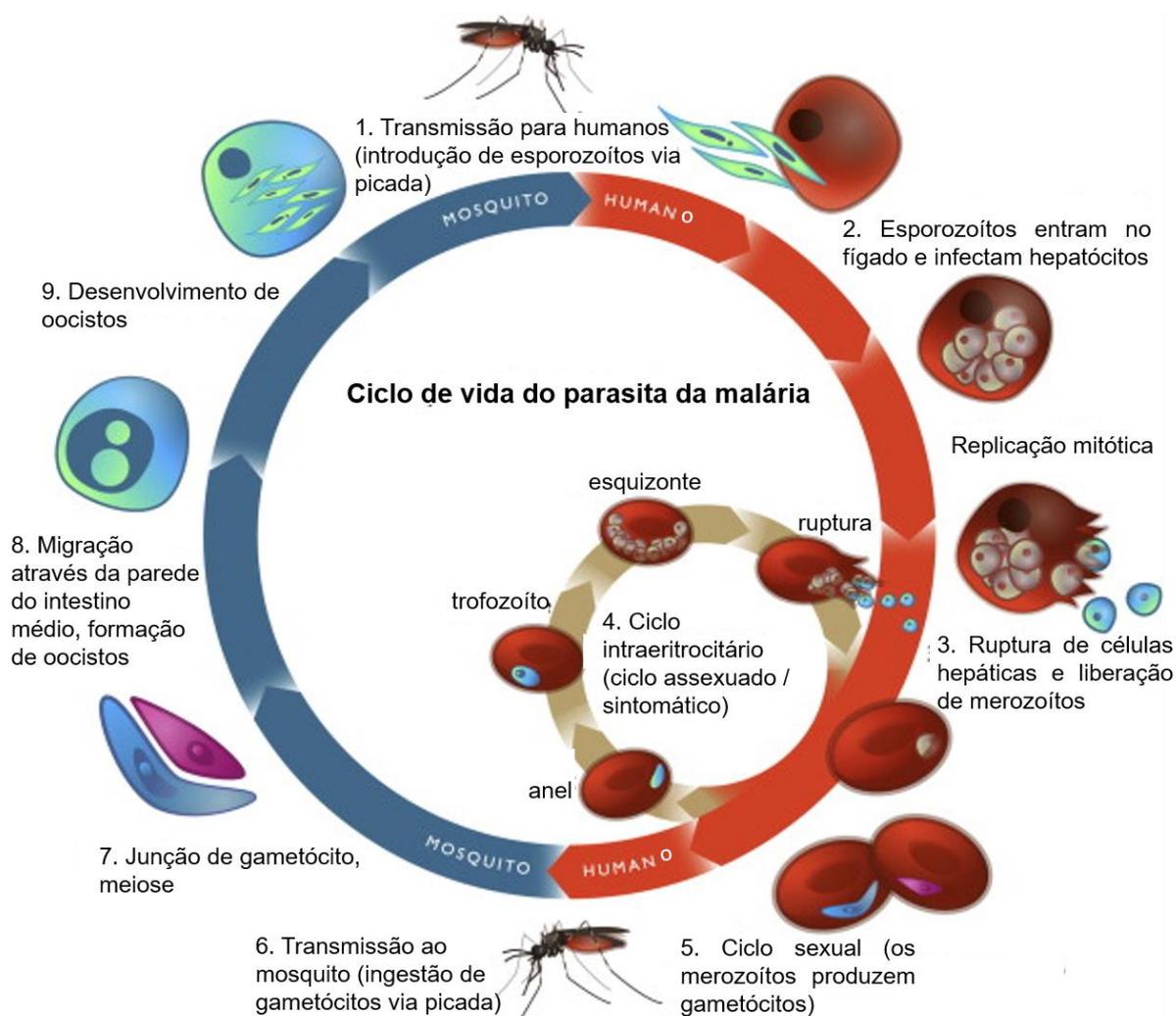


Fonte: Malaria Atlas Project © 2018

Figura 4 - Distribuição do vetor *Anopheles* no continente americano no ano de 2013.

1.3 Ciclo de transmissão do *Plasmodium* no vertebrado

O *Plasmodium* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, para completar o seu ciclo precisa de hospedeiros diferentes: um vertebrado e outro invertebrado; as espécies de *Plasmodium* que causam malária humana, durante o seu desenvolvimento passam por duas fases: uma sexual chamada esporogônica, na qual ocorre a multiplicação do parasito nos mosquitos do gênero *Anopheles*, e outra assexual, ou esquizogônica que ocorre no hospedeiro vertebrado (26) (17) (Figura 5).



Fonte: Adaptado de Klein E.Y. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *International Journal of Antimicrobial Agents* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.007>.

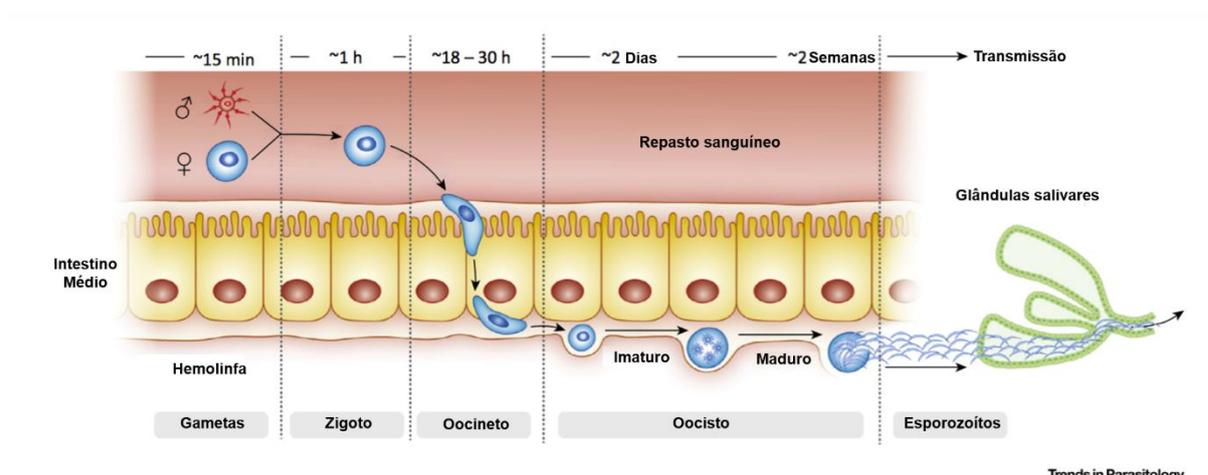
Figura 5 - Ciclo de vida do *Plasmodium*.

A transmissão do *Plasmodium* se inicia durante o repasto sanguíneo, no momento que o mosquito infectado inocula, junto com a saliva, esporozoítos, no hospedeiro humano, consecutivamente, infectam os hepatócitos onde se desenvolvem em esquizontes produzindo milhares de merozoítos que são liberados na corrente sanguínea onde invadem os glóbulos vermelhos; se transformam em trofozoítos, que se desenvolvem em esquizontes. Uma vez maduros, os esquizontes libertam os merozoítos na corrente sanguínea onde irão invadir novos eritrócitos (26). Alguns merozoítos se transformam em gametócitos (forma sexuada do parasita)

femininos ou masculinos e outros continuam invadindo eritrócitos, repetindo o ciclo assexual (27).

1.4 Ciclo de transmissão do *Plasmodium* no vetor *Anopheles*

No vetor, o ciclo de vida do *Plasmodium* se inicia quando a fêmea do mosquito *Anopheles*, através do repasto sanguíneo de um hospedeiro vertebrado infectado, ingere gametócitos (28), que sofrem maturação no lúmen do intestino médio (Figura 6), gerando micro e macrogametas que se fundem para produzir um zigoto diplóide (29). O zigoto maduro irá se diferenciar numa forma móvel o oocineto através de um processo que, dependendo da espécie de *Plasmodium*, pode levar entre 16-24 horas (30, 31). O processo iniciado com a exflagelação dos microgametócitos irá conduzir à formação de microgametas e ocorre principalmente devido a diferenças de temperatura, de pH e a produção de ácido xanturênico pelo mosquito (32).



Fonte: Adaptado de Smith RC, Barillas-Mury C. *Plasmodium* oocysts: overlooked targets of mosquito immunity (2016). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.08.012>.

Figura 6 - Ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado.

O oocineto é móvel e penetrará a matriz peritrófica (MP) e em seguida passará através do epitélio intestinal antes de se transformar num oocisto; a MP é uma camada composta por quitina, proteínas e proteoglicanos que circundam a alimentação ingerida pelo mosquito, sendo uma barreira física para muitos parasitas, uma vez que evita o seu contato com o epitélio intestinal do inseto (33).

Vários estudos têm sugerido que *P. falciparum* e *P. gallinaceum* podem secretar quitinase adicional ao já produzido pelo inseto, processo este que permitiria o parasita realizar três etapas cruciais na infecção do intestino do hospedeiro invertebrado: 1- penetrar através da MP, 2 - escapar da ação mortal das enzimas digestivas e 3 - invadir com sucesso as células epiteliais do intestino (34, 35).

O desenvolvimento dos oocistos dura de 5 a 10 dias, dependendo da espécie do parasita, do vetor e das condições ambientais. Dentro do oocisto, por esporogonia, são formados os esporozoítos que uma vez liberados, circulam na hemolinfa e invadem as glândulas salivares; nas glândulas salivares, os esporozoítos se aglomeram nas cavidades secretoras e, posteriormente, 15 a 20 dias após a infecção, chegam aos ductos salivares, prontos para serem inoculados em um novo hospedeiro no repasto sanguíneo seguinte, reiniciando assim, uma nova fase do ciclo parasitário (12).

1.5 Competência e capacidade vetorial

A importância de uma espécie de mosquito na transmissão de doenças depende da sua capacidade e competência vetorial. A capacidade vetorial está relacionada com a intensidade da transmissão do parasito e é quantificada pela densidade dos vetores, a taxa de infecção, a quantidade de parasitos por inóculo e a longevidade do mosquito. A competência vetorial é a capacidade do mosquito permitir a replicação e transmissão do parasita (17, 36).

A compreensão de como as interações *Anopheles-Plasmodium* cooperam para a competência vetorial do mosquito, tem obtido recentemente, elevada atenção, abrindo espaço para a criação de novas estratégias no controle da malária (37), principalmente após a obtenção do genoma completo do mosquito *An. gambiae*, em 2002 (38), que ajudou no progresso do entendimento da resposta imune deste inseto contra o parasita *Plasmodium* (39). Atualmente, o principal objetivo de um programa de controle da malária, não deve consistir apenas na eliminação do parasita, mas sim em múltiplas estratégias, entre as principais, a interferência na sua transmissão pelos mosquitos vetores (40).

Entre os novos desafios para controlar a malária estão incluídas as estratégias para a interrupção do ciclo de transmissão no mosquito, mas isso requer um melhor entendimento das interações específicas entre os plasmódios humanos e seus vetores naturais (17).

Dentre as estratégias de intervenção de controle dos vetores da malária, foi descoberto o uso da ivermectina, uma droga endectocida eficaz contra uma variada quantidade de anofelinos, metodologia que pode ser adicionado a outras intervenções baseadas em drogas, pois se mostrou útil para atacar vetores de alimentação e descanso ao ar livre, algo que não é possível com as ferramentas atuais de controle de vetores (41).

Técnicas de modificações genéticas têm sido desenvolvidas em estudos com *An. gambiae* e *An. stephensi* (37). Atualmente a ideia de substituir as populações de vetores naturais por outras alteradas geneticamente, capazes de atuarem sobre infecções por *Plasmodium*, recebem particular atenção, para isto, há técnicas padronizadas que propiciam alterações genéticas dos mosquitos; a identificação de moléculas efetoras capazes de atuar sobre os parasitas e a descoberta dos promotores específicos para expressar as moléculas efetoras no tempo e região apropriada nos mosquitos, são práticas que favorecem as alterações genéticas (42). No entanto, a utilização de mosquitos transgênicos está associada a uma diminuição da sua fitness, além de que, seria ainda necessário ultrapassar as limitações associadas ao método para substituir as populações de mosquitos naturais, pelas refratárias à infecção por *Plasmodium* (43).

A identificação de barreiras físicas ou ecológicas ao fluxo gênico pode ajudar a prever a disseminação de genes envolvidos na refratariedade do parasita e / ou resistência a inseticidas, fornecendo assim informações práticas sobre o número de pontos de liberação de mosquitos transgênicos (44). Esses estudos também podem fornecer informações sobre o cenário biogeográfico e as relações filogenéticas entre espécies de *Anopheles*, fundamental para o controle da malária (45, 46).

Grandes avanços na análise genética funcional de anofelinos, veio com o desenvolvimento da transformação germinativa e da tecnologia de RNA de interferência (iRNA), esta última técnica, talvez seja o método mais utilizado, com

objetivo principal de validação rápida dos efeitos gênicos knock-down, no fenótipo vetorial, podendo ser altamente específica (47). Uma vez que se baseia na homologia quase completa para direcionar as moléculas de RNA mensageiras (mRNAs) específicas para degradação, constituindo-se na resposta celular natural à detecção de RNA de cadeia dupla (ds); após a introdução de dsRNA sintético homólogo a um gene alvo, a maquinaria celular processa este molde para direcionar a clivagem de mRNA complementar, reduzindo assim o nível de proteína codificada ao longo do tempo (48).

No entanto, o campo foi revolucionado novamente pela edição precisa do genoma, agora possível através de nucleases específicas; além disso, a edição do genoma, pode oferecer uma potencial modificação populacional de anofelinos, como também, ajuda a fornecer ferramentas complementares para a eliminação da malária em escala local e global (47).

Recentemente têm sido exploradas outras hipóteses associadas à utilização de microorganismos como agentes de controle biológico de doenças transmitidas por vetores, no entanto, a elevada variabilidade no número de oocistos em espécies de mosquitos relativamente próximas indica que os fatores ambientais também podem influenciar. Dentro dos estudos recentes, várias evidências sugerem que a flora bacteriana do mosquito tem influência na sua competência vetorial, no contato direto da alimentação de sangue às infecções microbianas e parasitárias (37). Os genes envolvidos na formação, composição e eficiência da flora bacteriana tornaram-se um foco para estudos que buscam elucidar a diminuição ou até o bloqueio da transmissão de vários patógenos.(49)

1.6 Modelos de infecção para estudos de interação entre parasitos e hospedeiros

Parasitas do gênero *Plasmodium* além de causar infecções em seres humanos, também infectam outros animais como por exemplo macacos, roedores ou aves, facilitando a utilização de espécies de *Plasmodium* não humanos, como modelo para o estudo da interação entre o parasita e o hospedeiro. Os parasitas murinos *P. berghei* (50), *P. yoelii* 17X (51), *P. yoelii nigeriensis* N67 (52) e *Plasmodium chabaudi* (53), adaptados a pequenos roedores laboratoriais, são considerados bons modelos para investigar a malária em mamíferos e também para estudar interações parasitárias com

os mosquitos vetores, tendo sido utilizados para infectar *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. stephensi* (vetores africanos), *An. quadrimaculatus*, *An. aquasalis* (vetores americanos), sendo alta a suscetibilidade destes vetores para a infecção com espécies de parasitas da malária (54-61).

Existem várias vantagens de usar um modelo animal na malária e muitos grupos de pesquisa em todo o mundo usam estes modelos murinos para melhor compreender a interação entre parasitas da malária e os seus vetores. Estes modelos têm sido úteis na avaliação de potenciais intervenções para o controle da malária, e para gerar e testar hipóteses sobre a biologia do parasita e vetor (62, 63).

P. yoelii foi originalmente encontrada e isolada de roedores na África Central. Três subespécies são reconhecidas, nomeadamente *P. yoelii yoelii*, *P. yoelii nigeriensis* e *P. yoelii killicki*, e são amplamente utilizados para estudar as respostas imunitárias do hospedeiro e a base genética de fenótipos parasitários (64).

A susceptibilidade dos mosquitos à invasão pelo *Plasmodium* é um fator determinante para a avaliação do estudo da transmissão vetorial da malária, estando dependente de fatores genéticos, como por exemplo a própria imunidade do parasita, a variação entre cepas da mesma espécie, imunidade do mosquito, do hospedeiro vertebrado, assim como fatores fenotípicos do vetor, como: tamanho do mosquito, digestão sanguínea, além de fatores externos como temperatura, umidade, ação de drogas e inseticidas (65).

Nos mosquitos, ocorrem grandes perdas parasitárias durante os estágios críticos de transição do *Plasmodium* no intestino médio, na migração e alocação nas glândulas salivares (66). As magnitudes dessas perdas variam principalmente com as variadas interações de espécies *Anopheles-Plasmodium* (57). As cepas de mosquitos refratários que bloqueiam completamente o desenvolvimento do parasita, através de uma habilidade aumentada do hospedeiro em reconhecer o parasita vivo ao invés de um encapsulamento passivo do parasita morto ou debilitado, realizando esta ação principalmente, através da lise dos oocinetos, durante a invasão do intestino médio (67) ou pela melanização dos oocistos em desenvolvimento (66). Essas respostas implicam na ativação de mecanismos de defesa, mas os processos moleculares

subjacentes à refratariedade são ainda desconhecidos, podendo ser algo importante para entender as interações entre parasito – vetor (47, 68).

A infecção experimental dos mosquitos vetores de *Plasmodium* foi um passo fundamental para a compreensão do ciclo de vida do *Plasmodium* e o desenvolvimento de mosquitos vetores infecciosos (69). Modelos de infecção experimental são utilizados para entender a biologia da interação entre parasitas e vetores (65).

A maioria dos projetos de investigação usam modelos de laboratório consistindo em parasita humano: *P. falciparum* ou *P. vivax*, parasitas murinos *P. berghei* e *P. yoelii nigeriensis* ou parasita aviário como por exemplo: *P. gallinaceum*, que são espécies de parasitas cultivadas in vitro ou mantidos in vivo, tornando mais fácil o desenvolvimento da investigação experimental. Estes parasitas interagindo com mosquitos *An. gambiae*, *An. aquasalis*, *An. stephensi*, *An. albimanus* e *Ae. aegypti* mostram diferentes sensibilidades à infecção por *Plasmodium spp.* (70).

A infecção dos anofelinos com *Plasmodium* ocorre após a alimentação a partir de sangue infectado com gametócitos do protozoário, podendo ser realizado de duas formas: a direta, através do contato dos mosquitos com a pele do vertebrado e a presença do parasito no sangue; ou por ensaio de alimentação por membrana, alimentando os mosquitos com sangue coletado do paciente com malária e posteriormente realizando o uso de um sistema artificial composto por alimentadores de vidro contendo uma cavidade tubular vedada na parte inferior por uma membrana que além de proteção do sangue, é através da mesma que os mosquitos se alimentarão. Esta membrana pode ser sintética ou pele natural de animais, esta última menos utilizada pelas dificuldades de manuseio e restrições ao uso de animais em experimentação (17). Para esse tipo de alimentação, tradicionalmente têm sido utilizados diversos tipos de membranas sintéticas, uma delas é o uso do Parafilme, um plástico rugoso, estriado e resistente que simula a epiderme do animal vertebrado (71).

Nestes estudos de alimentação infectante por membrana, são utilizados os gametócitos, que durante a execução deste trabalho é importante, ter atenção na execução durante o repasto. Além disso, os gametócitos variam em sua maturidade

(72), razão sexual (73), genética (74) ou multiplicidade de infecção (conceito que relaciona o número de parasitas usados para infectar um determinado número de células hospedeiras) que podem influenciar a infectividade do mosquito (75).

A adição de agentes potencialmente bloqueadores de transmissão ao sangue infeccioso antes da refeição de sangue do mosquito, pode variar, por exemplo, no volume e no tipo de diluente usado na amostra, que podem afetar independentemente a concentração de gametócitos e a intensidade/prevalência de oocistos. Um fator adicional que pode causar variação no resultado do ensaio é o método de diluição da amostra ao realizar a alimentação de mosquitos (76).

1.7 Resposta imune do mosquito à infecção por *Plasmodium*

Ao longo da evolução dos seres vivos, os insetos desenvolveram barreiras físicas e eficientes mecanismos de resistência à patógenos e variações naturais. Os insetos possuem mecanismos de defesa composta por barreiras estruturais e imunológicas inatas (celular ou humoral), que proporcionam proteção contra organismos invasores (69). O conhecimento dos mecanismos moleculares de defesa envolvidos no desenvolvimento dos parasitas nos vetores é uma etapa importante na determinação do processo de interação e competência vetorial (77).

Os bloqueios físicos que evitam a entrada dos parasitas na hemolinfa são compostos pelo exoesqueleto com a função de proteger os órgãos do inseto e a hemolinfa da exposição direta aos microrganismos do meio ambiente, o intestino médio que armazena o sangue ingerido, a matriz peritrófica que é a estrutura quitinosa digestiva do inseto, oferecendo além da proteção do epitélio intestinal do contato direto com o sangue ingerido, proporciona também proteção da flora microbiana que sofre variação de tamanho depois da alimentação sanguínea em alguns insetos hematófagos e o revestimento de quitina da traquéia (12). As rupturas destes bloqueios induzem uma série de reações no hospedeiro e assim o patógeno terá que lidar com uma resposta imunológica mais direcionada e específica (78).

Uma grande variedade de moléculas podem ser produzidas contra agentes patogênicos, tais como bactérias, fungos, vírus e *Plasmodium* spp., sendo secretadas

por órgãos de mosquito e tecidos como o corpo gorduroso, intestino médio e hemócitos (39, 79).

Na última década, foram realizados estudos utilizando análises de proteomas e técnicas de transcriptômica que descreveram como *Plasmodium* é capaz de modular a expressão de genes imunes em *An. gambiae* e *An. stephensi* (80).

Muitos estudos têm produzido evidências sobre o fato da competência vetorial de um vetor ser dependente da ação do sistema imunitário do mosquito durante o processo de infecção com *Plasmodium* spp (79).

Nos mosquitos anofelinos, estes mecanismos se compõem por barreiras físicas estruturais e um sistema de processos imunológicos inatos (celular ou humoral); no seu habitat e durante o repasto sanguíneo, estes são expostos a uma ampla variedade de microrganismos, onde o sistema imune inato monta uma resposta eficiente contra o agente microbiano invasor, sendo capaz de realizar a distinção entre as grandes classes de microrganismos (81).

Os insetos não possuem imunidade adaptativa, porém, estudos recentes vêm abordando a resposta imune tipo “priming” que é análogo à memória imune e permite os insetos acumular uma resistência mais efetiva após o segundo contato com o agente invasor (82, 83). Rodrigues et al. (2010) (83) mostraram um aumento na diversidade e quantidade de hemócitos que propiciou a diminuição da intensidade de infecção em *An. gambiae* infectados com *P. berghei* e *P. falciparum*, quando os mosquitos tinham sido previamente expostos aos parasitos, revelando assim a capacidade do sistema imune dos mosquitos de se adaptar modulando a abundância e a capacidade de resposta dos hemócitos aos parasitas.

1.8 Peptídeos antimicrobianos – PAM's

Os peptídeos antimicrobianos (PAM's) são moléculas constituintes da imunidade inata de organismos multicelulares, sendo expressos de forma constitutiva ou induzida. Apresentam variedade quanto a sequência, estrutura e conformação, geralmente possuindo de 12 a 50 aminoácidos. Muitos possuem seis resíduos de Cisteínas, que são responsáveis pela estabilidade, resistência a degradações decorrentes a temperatura, alteração de pH e ações proteolíticas (84, 85). A maioria

dos PAM's são pequenas biomoléculas anfipáticas, catiônicos a pH fisiológico (86). Defensinas, Attacinas, Gambicinas e Cecropinas têm sido detectadas em insetos (87, 88). A gama de tamanho, composição de aminoácidos e estrutura secundária de tais peptídeos passa de dipeptídeos até polipeptídeos suficientemente grandes para serem considerados como proteínas (78).

Cascatas proteolíticas resultam nas ativações de profenoloxidasas, que regulam a melanização e coagulação na hemolinfa e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são exemplos de mecanismos efetores humorais. As respostas celulares como a fagocitose, encapsulamento e a apoptose são mediadas por hemócitos (89).

O sistema imune inato do mosquito possui um aprimorado sistema de reconhecimento de patógenos, que é ativado quando o agente invasor entra em contato com o ambiente interno do organismo através da interação entre os padrões moleculares associados aos patógenos (PMAPs) e os receptores de reconhecimento padrões (RRPs) do hospedeiro (90). Os PMAPs podem ser componentes das membranas celulares dos patógenos como peptidoglicanos (PGN), lipopolissacarídeos (LPS) ou ácidos nucleicos (82). Os RRP's são peptídeos circulantes ou localizados na superfície das células hospedeiras, como por exemplo as proteínas de adesão a bactérias Gram negativas (GNBP), as proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRP) e as proteínas do tipo fibrinogênio (FREPs) (91-93). A sinalização imunológica é desencadeada após reconhecimento de estruturas microbianas específicas conservadas nos microorganismos, mas ausentes no hospedeiro, cujo reconhecimento é essencial para a ativação da imunidade inata do inseto (94).

A interação entre os PMAPs e RRP's desencadeia a ativação de vias de sinalização que regulam: a expressão de moléculas efetoras antimicrobianas como os peptídeos antimicrobianos (PAM's), que são produzidos principalmente pelo corpo gorduroso, hemócitos e por estruturas que representam barreiras físicas como intestino médio, túbulos de malpighi ou traquéia que atuam na membrana do patógeno provocando lise (94).

A atividade antimalárica de peptídeos sintéticos ou fragmentos de proteínas com alvos específicos em interfaces parasitas / hospedeiros vertebrados ou parasitas / vetores, como por exemplo, fragmentos peptídicos de adesinas que estão envolvidos no processo da invasão das células hospedeiras (95), têm sido descritas. Vários destes PAM demonstraram ter atividades bactericidas e anti-plasmodiais em *An. gambiae* (96, 97).

Attacinas são uma família de seis PAM's ricos em Glicina que pode ser dividida em quatro peptídeos básicos (A-D) e dois peptídeos ácidos (E-F), provavelmente derivados de dois genes de attacina (97, 98). As attacinas inibem a síntese das proteínas da membrana externa de *Escherichia coli* bloqueando a transcrição dos respectivos genes (99), que é presumivelmente alcançado por um mecanismo indireto, uma vez que as attacinas se ligam ao lipolissacarídeo bacteriano, mas não precisam entrar na célula para exercer sua ação, as attacinas tem sido expressas em *Drosophila melanogaster* atuando contra infecções (100, 101).

Cecropina 1 (CEC1) foi testada in vivo, mostrando que a sua expressão em células do intestino médio de *An. gambiae* transgênico reduziu significativamente os números de oocistos de *P. berghei* (102). As cecropinas da mariposa *Hyalophora cecropia*, perturbam o desenvolvimento de esporozoítos nos oocistos, com uma dose letal de 50% entre 0,5 e 1 µg / µL (103). Os derivados sintéticos das cecropinas também foram produzidos e analisados quanto aos seus efeitos contra a malária: o SB-37, altamente semelhante à cecropina B e Shiva-1, com 40% de homologia com a mesma cecropina de *Hyalophora cecropia*, tiveram uma ação lítica significativa sobre as formas sanguíneas de *P. falciparum* (104). O peptídeo Shiva-3 também possui atividade sobre o desenvolvimento de oocinetos de *P. berghei* in vitro e in vivo no intestino médio de *An. albimanus* (105). O gene da cecropina de *An. gambiae* é expressado principalmente no intestino médio do mosquito, em células semelhantes a hemócitos e os seus níveis são significativamente aumentados 2 h após a infecção (106). A atividade da cecropina em *An. gambiae* contra *Plasmodium* foi estudada criando mosquitos transgênicos com expressão de CecA sob o controle do promotor da carboxipeptidase de *Ae. aegypti*. O número de oocistos foi reduzido em 60% quando comparado com os mosquitos não transgênicos (102).

De acordo com a evidência de sua atividade antimicrobiana *in vitro* (107), o silenciamento do gene que codifica a Defensina 1 (DEF1) em *An. gambiae* diminuiu a sobrevivência de mosquitos infectados com bactérias Gram+ (108), e a super expressão endógena da defensina A no corpo gordo de *Ae. aegypti* proporcionou o aumento da sobrevivência após a estimulação com *Enterobacter cloacae* (109). No entanto, a diminuição de DEF1 em *An. gambiae* não afetou o desenvolvimento do parasita no mosquito (108), apesar do efeito anti-plasmodial da defensina exógena relatado em (110).

A Gambicina é um peptídeo expresso predominantemente no intestino médio anterior, tórax e no abdômen do mosquito e é ativo contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e oocinetos de *P. berghei* em *An. gambiae* (107). A expressão de PAM's podem ser reguladas por diferentes vias de sinalização intracelular, como as vias Toll, Imd e JAK/STAT (17).

Uma das medidas que podem ajudar a alcançar o sucesso no controle da infecção seria encontrar novas moléculas ou drogas para bloquear a transmissão da malária, sendo um ponto chave para a interrupção da transmissão da doença. Salienta-se a importância da pesquisa sobre os mecanismos biológicos, fisiológicos, moleculares que estão envolvidos na interação e na imunidade inata dos mosquitos contra o *Plasmodium*, podendo esta informação ser determinante para atingir as novas metas de eliminação da malária a nível global. Neste estudo, as respostas dos anofelinos contra as infecções por *Plasmodium vivax* serão comparadas com a reação dos mosquitos infectados com o parasita de roedores *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a importância dos peptídeos antimicrobianos (PAM) na defesa do mosquito *Anopheles aquasalis* em resposta à infecção por *Plasmodium yoelii nigeriensis* e *Plasmodium vivax*.

2.2 Específico

2.2.1. Caracterizar as alterações de transcrição dos genes que codificam os peptídeos antimicrobianos: Cecropina; Defensina 1, Defensina 2 e Defensina 4; Attacina e Gambicina durante a invasão do intestino médio pelo oocineto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo de estudo

Estudo experimental realizado no Laboratório de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) localizado na cidade de Manaus, Amazonas. Os procedimentos operacionais padronizados para execução de parte da metodologia estão inseridos nos anexos 8.5 e 8.6.

3.2 Aspectos éticos

Esse estudo tem financiamento e faz parte de dois projetos mais amplos intitulados: “Resposta imune inata de anofelinos vetores de malária na Amazônia à infecção por *Plasmodium*” financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) / Programa Ciência sem fronteiras com registro nº 182/2012 e o segundo: Resposta à infecção por *Plasmodium* em mosquitos do novo mundo pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), edital de registro 030/2013 – UNIVERSAL AMAZONAS.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número do parecer 422.286 e também tem aprovação da comissão de Ética ao Uso de Animais – CEUA da FMT-HVD sob o registro 01/2013, para utilização dos animais.

3.3 Infecções experimentais em camundongos com *Plasmodium yoelii nigeriensis*

As infecções experimentais em camundongos do tipo BALB/C (provenientes do biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA), foram realizadas através da inoculação de *Plasmodium yoelii nigeriensis* (N64) (*P. y. nigeriensis*) criopreservados (fornecidos pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical-Universidade Nova de Lisboa), seguindo a metodologia proposta por SILVEIRA et. al. 2007 (69). As fêmeas de camundongos foram separadas em dois grupos: 1) grupo teste: onde duas fêmeas foram infectadas via injeção intraperitoneal com 1×10^6 de *P. y. nigeriensis* (E.P) por camundongo 2) grupo controle, onde foi utilizada duas fêmeas do grupo controle, livre de infecção.

A evolução da infecção de cada camundongo foi avaliada em lâmina com esfregaços sanguíneos, de uma gota de sangue da veia caudal, fixados com metanol durante 30 segundos e corados com Panótico Rápido (LB Produtos). A parasitemia (cálculo da quantidade de eritrócitos infectados pelo parasita dividido pela quantidade de eritrócitos totais) e gametocitemia (cálculo da quantidade de eritrócitos infectados especificamente por gametócitos dividido pela quantidade de eritrócitos infectados) de cada indivíduo foi determinada diariamente durante 3 (três) dias consecutivos, onde foi realizada a contagem de eritrócitos parasitados (contagem de 5.000 eritrócitos) utilizando microscopia óptica (M.O).

Quando a parasitemia atingiu entre 8-15% e foi observada exflagelação dos gametócitos, em sangue á fresco em lâmina, coberta com lamínula, foi realizada então a infecção experimental dos mosquitos.

3.4 Infecções de mosquitos através de alimentação direta em camundongos e dissecação de estômagos

Fêmeas de mosquitos *An. aquasalis* com idade entre 3-5 dias de fase adulta, realizaram o repasto sanguíneo diretamente nos camundongos infectados com *P. y. nigeriensis* (grupo teste) e em camundongos sem infecção para o grupo controle (Figura 7); os camundongos pesando 25g foram previamente anestesiados via intraperitonealmente com a concentração de 0,1 ml retirados de tubos de 1,5 ml alíquotados com a combinação de: Ketamina (Dopalen): 375 µl + Xilazina (Anasedan): 187,5 µl e Soro fisiológico: 937,5 µl, resultando 1,500 µl.

Ao décimo dia após o repasto sanguíneo as fêmeas dos mosquitos foram colocadas em freezer por cerca de 30 segundos a -20°C para imobilização; em seguida foram imersas em solução de etanol a 70% e PBS e colocados em lâminas para dissecação do intestino médio; as lamíνας foram corados com Mercurocromo a 3% e coberto por uma lamínula para visualização e contagem dos oocistos utilizando microscopia óptica.

A taxa de infecção foi medida pela relação entre o número de mosquito infectados / número total de mosquitos dissecados; a intensidade de infecção foi medida pelo número de oocistos por intestino.

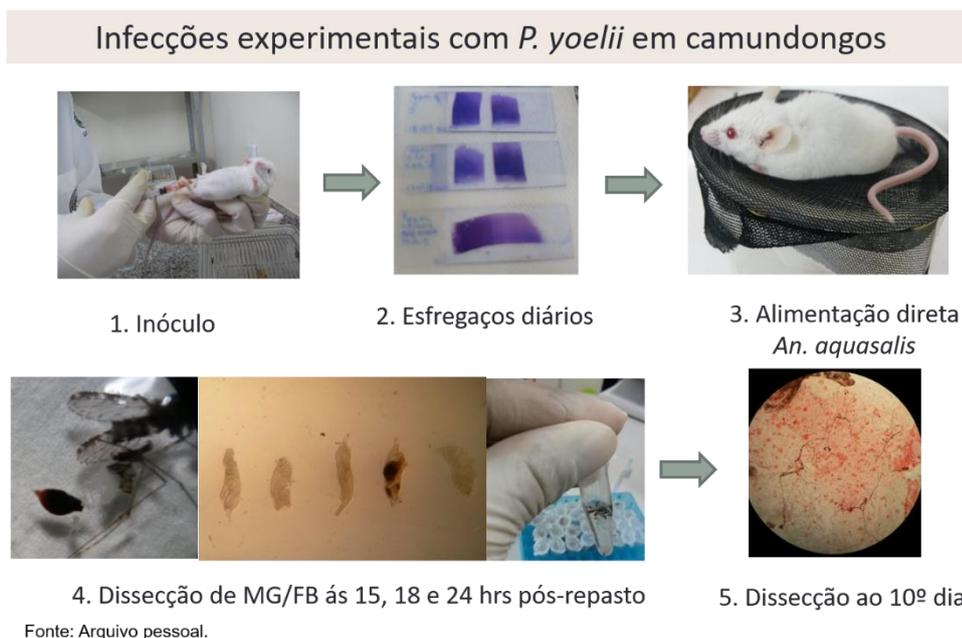


Figura 7 - Fluxograma da metodologia aplicada às alimentações de *An. aquasalis* com camundongos.

3.5 Infecção experimental de mosquitos com *Plasmodium vivax*

Para os experimentos com *Plasmodium vivax* foram recrutados pacientes com diagnóstico positivo para malária pelo método da gota espessa no ambulatório da FMT/HVD, selecionados conforme os seguintes critérios: a) parasitemia igual ou maior que duas cruzes (método de contagem parasitária estabelecida pelo ministério da saúde), b) pacientes que não tinham realizado o uso de antibióticos ou antimaláricos dentro do prazo de 6 meses, c) maiores de idade, d) residentes no Brasil ou oriundos de países estrangeiros, e) aceitaram participar voluntariamente no estudo após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido para doação de sangue, com a coleta aproximada de 5mL do sangue venoso, que foram coletados em tubo heparinizado.

3.6 Infecções de mosquitos através de alimentação artificial por membrana

Para as infecções experimentais com *P. vivax* foi utilizado o método de alimentação artificial por membrana através de alimentadores de vidro revestidos por

uma membrana de Parafilm® (Bemis Company, USA) através da qual os mosquitos alimentam-se. Os alimentadores foram conectados a um sistema de mangueiras látex acopladas a um banho maria através das quais circula água entre 37-39°C para manter o sangue aquecido. As fêmeas adultas foram separadas em dois grupos experimentais com 300 mosquitos fêmeas para teste e controle e a solução de glucose 10% foi retirada 12 horas antes do repasto sanguíneo. O primeiro grupo recebeu sangue total de pacientes com *P. vivax* por um período de 45 a 90 minutos. O segundo grupo, controle, foi tratado de maneira similar, mas com gametócitos inativados, para diminuir as diferenças genéticas e as interferências no sangue, que pode causar distinções químicas e na constituição das amostras controles comparadas com os testes, as amostras de sangue infectadas com *P. vivax* foram aquecidas durante 15 minutos a 43 ° C e posteriormente oferecidas aos mosquitos, como a metodologia descrita em Sangare et al. 2013.

Após a alimentação os mosquitos alimentados foram transferidos para gaiolas identificadas e mantidos com solução açucarada a 10% na sala de infecção do insetário para o desenvolvimento do parasita e acompanhamento da infecção (Figura 8).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8 - Fluxograma da metodologia aplicada às alimentações artificiais de *An. aquasalis*, com membrana.

3.7 Análise da transcrição dos genes que codificam PAM de *Anopheles aquasalis* durante a infecção por *Plasmodium yoelii nigeriensis* e *Plasmodium vivax*.

As alterações na transcrição dos genes que codificam os PAM foram determinadas no intestino médio de mosquitos às 15, 18 e 24h após a refeição infectante (janela temporal onde os oocinetos invadem o epitélio do intestino médio) para *P. yoelii nigeriensis* e às 15, 18, 24 e 48h após a repasto sanguíneo infectante para *P. vivax* e em seguida comparadas com o controle negativo (mosquitos não infectados).

3.8 Extração de RNA

A extração do RNA total das fêmeas de *An. aquasalis* foi realizada através do método TRIZOL® (Invitrogen), utilizando-se inicialmente para cada amostra 100 µl da substância e foi macerado o conteúdo com o auxílio de um pistilo, após maceração, foi adicionado 900µl da mesma substância totalizando 1ml.

As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C; o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 200µl de clorofórmio e misturado, invertendo o tubo por 15 segundos e incubando a temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida a amostra foi centrifugada novamente a 12.000g por 10 min a 4°C para separação de fase.

A porção aquosa foi transferida para um novo tubo e neste adicionado 500µl de isopropanol para precipitação do RNA, incubando em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugando a 12.800 g por 10 min a 4°C. Todo sobrenadante resultante foi retirado e o “pellet” foi lavado utilizando 1 ml de etanol à 75% centrifugando-se a 7.500 g por 5 minutos na temperatura de 4° C. Após a retirada do sobrenadante, foi realizada a lavagem do RNA com etanol a 75% em Água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), num volume idêntico ao de Trizol utilizado no início do processo. Os tubos foram centrifugados a 7500 g, 5 minutos, entre 2 e 8°C, o sobrenadante descartado, o pellet seco à temperatura ambiente e resuspenso em

40µl de H₂O DEPC 0.01%, pipetando a solução várias vezes, em seguida os tubos foram abertos e incubados a uma temperatura entre 55-60°C por 10 min.

A qualidade e concentração de RNA obtido foi determinada num espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000) utilizando 1µl da amostra. Em seguida as amostras foram armazenadas a -80°C.

3.8.1 Tratamento do RNA com DNase

Para o tratamento do RNA será utilizado o kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega Corporation). Um µg de RNA será diluído num volume final de 6 µl, ao qual será adicionado 1µl do tampão 10x, 1µl da enzima DNase, completando a quantidade com um volume de H₂O DEPC até totalizar 10µL e posteriormente foi incubado a 37°C por 15 min. A seguir adiciona-se 1µl de DNase Stop solution para inativação da enzima, incubado a 65°C por 10 min, transferidas para o gelo e imediatamente submetidas à reações posteriores.

3.8.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado diretamente a partir do tubo utilizado na reação anterior, num volume final de 13 µl, contendo aproximadamente 500ng de RNA tratado em 10 µl, 1 µl de água DEPC, incubado a 70 °C por 5 minutos e imediatamente resfriado à temperatura de 4°C por 5 minutos. A esta mistura foi adicionada 6 µl de tampão M-MLV 5X, 5 µl de dNTPs (10µM), 1µl de Inibidor da ribonuclease (RNasin® Ribonuclease Inhibitors - Promega Corporation) e 1µl da enzima M-MLV (Promega Corporation) (200U/µl). Após a homogeneização, a mistura foi incubada a 37°C por 60 minutos, inativada a uma temperatura de 65°C por 15 minutos e acondicionado a - 20°C até o momento de sua utilização para a PCR em Tempo Real.

3.8.3 Reação da polimerase de cadeia em tempo real (Real time PCR)

A determinação da expressão dos genes escolhidos foi realizada através de reações em triplicatas nas placas de 96 poços (Applied Biosystems). As reações de qPCR serão feitas num volume final de 15µl, 0,35µl de cada um dos iniciadores (10µM), 3µl de cDNA e 7,5µl do SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Os

iniciadores específicos dos genes de interesse foram, Cecropina; Defensina 1, Defensina 2 e Defensina 4; Attacina e Gambicina; como controle interno foram usados os iniciadores do gene S7. Como controle negativo foi utilizado poços sem amostra, mas com mistura de reações.

O ensaio de Real-Time PCR foi realizado no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 1 ciclo de 50°C por 2 min, 1 ciclo de 95°C por 10 min, 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 minuto.

Para a análise da expressão gênica empregando a técnica de Real-Time PCR será utilizado o método de Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (111).

3.9 Análise estatística

Os resultados relativos às taxas de infecção e contagem de oocistos foram analisados estatisticamente de forma a comparar os diferentes grupos de tratamento em relação ao grupo controle. Sendo realizada a comparação das taxas de infecção dos mosquitos através do teste de Fisher, bem como a intensidade de infecção, ou número de oocistos por estômago nas fêmeas infectadas, através de um teste de Mann-Whitney. A aplicação destes testes estatísticos permitiu determinar a existência ou não de diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Para a análise da expressão gênica, todas as comparações testadas, foram comparadas com os seus devidos controles, utilizando o teste de Mann-Whitney. Quando o modelo paramétrico não foi adequado, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das alterações de transcrição dos genes que codificam os Peptídeos Anti-Microbianos: Cecropina; Defensina 1; Defensina 2; Defensina 4; Attacina e Gambicina durante a invasão do intestino médio pelo oocineto.

4.1.1 Dados gerais do quantitativo de mosquitos utilizados nas infecções

Foram utilizadas 10.161 fêmeas de *An. aquasalis* nos testes de infecção experimental. Destas, 5.161 (50,8%) foram utilizados nos testes com o parasita murino *P. yoelii nigeriensis* e 5.000 (49,2%) nos testes com *P. vivax*. Do total, 3.164 (31,1%) mosquitos não se alimentaram (1.447 - *P. yoelii nigeriensis* e 1.717 - *P. vivax*).

Os 6.997 (68,9%) mosquitos que se alimentaram (3.714 - *P. yoelii* e 3.283 - *P. vivax*), 2.611 (37,3%) não conseguiu sobreviver (1.140 - *P. yoelii* e 1.271 - *P. vivax*) até o dia de dissecação de intestinos para confirmação e contagem de oocistos. Os 4.386 restantes foram utilizados nos seguintes procedimentos (Tabela 1):

- a) 3.490 mosquitos (49,9%) foram dissecados para análise molecular (2.050 - 58,7% - *P. yoelii* e 1.440 - 41,3% - *P. vivax*) nos devidos intervalos de tempo, após a alimentação de sangue;
- b) 1.096 mosquitos (15,6%) foram dissecados (524 - 47,9% - *P. yoelii* e 572 - 52,1% - *P. vivax*) para verificação de oocistos ao 10º dia para *P. yoelii* ou ao 7º dia para *P. vivax*.

4.1.2 Infecções de *Anopheles aquasalis* com *Plasmodium yoelii nigeriensis*

Das 3.714 (72%) fêmeas de *A. aquasalis* que se alimentaram com *P. yoelii* (teste: 2.072 - 55,8% e controle: 1.642 - 44,2%), 2.050 (55,2 %) foram dissecadas e armazenadas para a análises molecular (teste: 1090 - 53,1% e controle: 960 - 46,9%); 524 anofelinos foram dissecados ao 10º dia para a determinação da taxa e intensidade de infecção (teste: 266 - 50,8% e controle: 258 - 49,2%), equivalente a 14,1 %. Um total de 1.140 (30,7%) fêmeas não sobreviveu durante os 10 dias de infecção (teste: 716 - 62,8% e controle: 424 - 37,2%) (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 - Descrição da quantidade de mosquitos que foram alimentados, dissecados para biologia molecular e visualização de oocistos.

<i>Anopheles aquasalis</i>	<i>P. yoelii nigeriensis</i>			<i>P. vivax</i>			Total
	Teste	Controle	Total	Teste	Controle	Total	<i>Py + Pv</i>
Utilizados	2.886 (55,9%)	2.275 (44,1%)	5.161 (50,8%)	2.500 (50%)	2.500 (50%)	5.000 (49,2%)	10.161
Não alimentados	814 (28,2%)	633 (27,8%)	1.447 (28%)	887 (35,5%)	830 (33,2%)	1.717 (34,3%)	3.164 (31,1%)
Alimentados	2.072 (71,8%)	1.642 (77,2%)	3.714 (72%)	1.613 (64,5%)	1.670 (66,8%)	3.283 (65,7%)	6.997 (68,9%)
Dissecados para extração de RNA (todos os intervalos)	1.090 (52,6%)	960 (58,4%)	2.050 (55,2%)	720 (43,1%)	720 (43,1%)	1.440 (43,9)	3.490 (49,9%)
Dissecados para verificação de oocistos	266 (12,8%)	258 (15,7%)	524 (14,1%)	259 (16%)	313 (18,8%)	572 (17,4%)	1.096 (15,6%)
Mortalidade dentro do período da infecção até o dia da verificação de oocistos	716 (34,6%)	424 (25,9%)	1.140 (30,7%)	634 (39,3%)	637 (38,1%)	1.271 (38,7%)	2.411 (34,5%)

A parasitemia observada nos testes variou entre 3,16% e 17,65% e a taxa de gametocitemia ficou entre 1,40% e 6,91%. Nas análises de expressão dos PAM's fêmeas de 9 experimentos, apresentaram infecção, observando-se oocistos na dissecação ao 10º dia após o repasto. Destes, 3 (33,3%) experimentos (1, 4 e 9) apresentaram taxa de infecção entre 4-14,3% e 6 (66,7%) experimentos (11, 13, 14, 15, 23 e 24) apresentaram taxa de infecção entre 34,8-60% (Tabela 2).

A quantidade máxima de oocistos observada em um teste foi de 25 oocistos e o número máximo de oocistos visualizados em um mosquito foi 14 oocistos. Quanto à intensidade sem contar os experimentos com zeros, observou-se que a maioria apresentou a mediana de 1 oocisto e a mediana máxima foi de 4,5 (Figura 9).

Tabela 2 - Dados das infecções experimentais com dissecação de intestino para visualização de oocistos para *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

G	PC	GC	MA	MD	No. MPO	Tot. O. Ob.	II	Taxa (%)
1	15,57	1,44	199	50	6	8	1,33	12
2	12,56	4,11	204	50	2	2	1	4
3	9,48	2,06	199	50	0	0	0	0
4	6,65	2,4	220	21	3	5	1,66	14,3
5	17,65	1,4	181	20	7	25	3,57	35
6	17,65	1,4	277	5	2	9	4,5	40
7	13,32	2,29	159	23	8	14	1,75	34,8
8	6,89	2,07	177	6	3	4	1,33	50
9	9,71	1,79	101	21	0	0	0	0
10	3,92	2,42	219	10	6	20	3,33	60
11	3,16	6,91	136	10	5	19	3,8	50
Total			2.072	266	42	106		

G=grupo; PC=parasitemia do camundongo; Gametocitemia do camundongo; MA = Mosquitos Alimentados; MD = Mosquitos Dissecados; No. OM = Número de mosquitos positivos oocistos; Tot. O. Ob. = Total de oocistos observados; II = Intensidade de infecção; Taxa (%) = Taxa de Infecção.

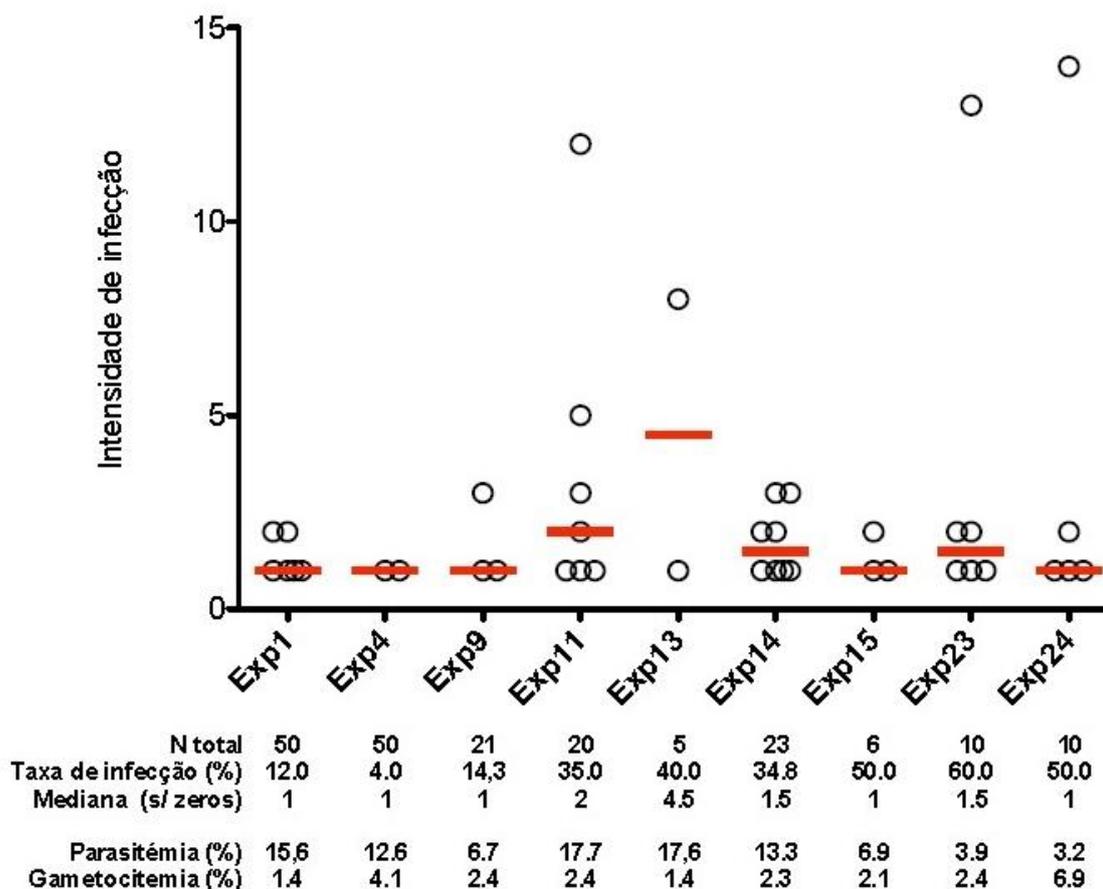


Figura 9 - Distribuição da intensidade de infecção por testes – *P. yoelii nigeriensis*.

Quando observada a produção de PAM's em resposta à infecção, os dados mostram que há alterações no sentido da regulação da expressão destes peptídeos em função da taxa de infecção, tendo sido agrupados em dois conjuntos de dados por *P. yoelii nigeriensis*: (I) taxa de infecção baixa (número médio de oocistos, <15) (Figura 10), e (II) taxa de infecção elevada (números médios de oocistos, >15) (Figura 11).

Os níveis de expressão dos genes que codificam os PAM's, no grupo de mosquitos com taxa de infecção baixa tiveram o pico de expressão da cecropina às 18h. Quando a taxa de infecção era baixa a gambicina (todos os intervalos), a cecropina (18h), a defensina 2 (24h) e defensina 4 (18h) estavam sob-reguladas enquanto que a attacina em todos os seus intervalos, cecropina (15h), defensina 1 (18 e 24h), defensina 4 (15 e 24h) estavam sub-reguladas (Figura 10).

Dentro do grupo de mosquitos que apresentou as taxas de infecções baixas, o gene que codifica a gambicina apresentou regulação positiva, controlando a infecção

por *Plasmodium yoelii nigeriensis*. Dentro deste mesmo grupo de mosquitos infectados a attacina apresentou sua regulação negativa ao longo do intervalo de tempo (Figura 10). Estes genes se apresentaram de maneira inversa para o grupo de mosquitos com elevada taxa de infecção onde a atividade diminuiu para gambicina e aumentou para a attacina (Figura 11).

Para o grupo de mosquitos com baixa taxa de infecção às 18 horas houve um pico positivo, para a cecropina e negativo para a defensina 1. Inversamente para a taxa de infecção elevada, a defensina 1 teve um pico de regulação positiva às 18 horas.

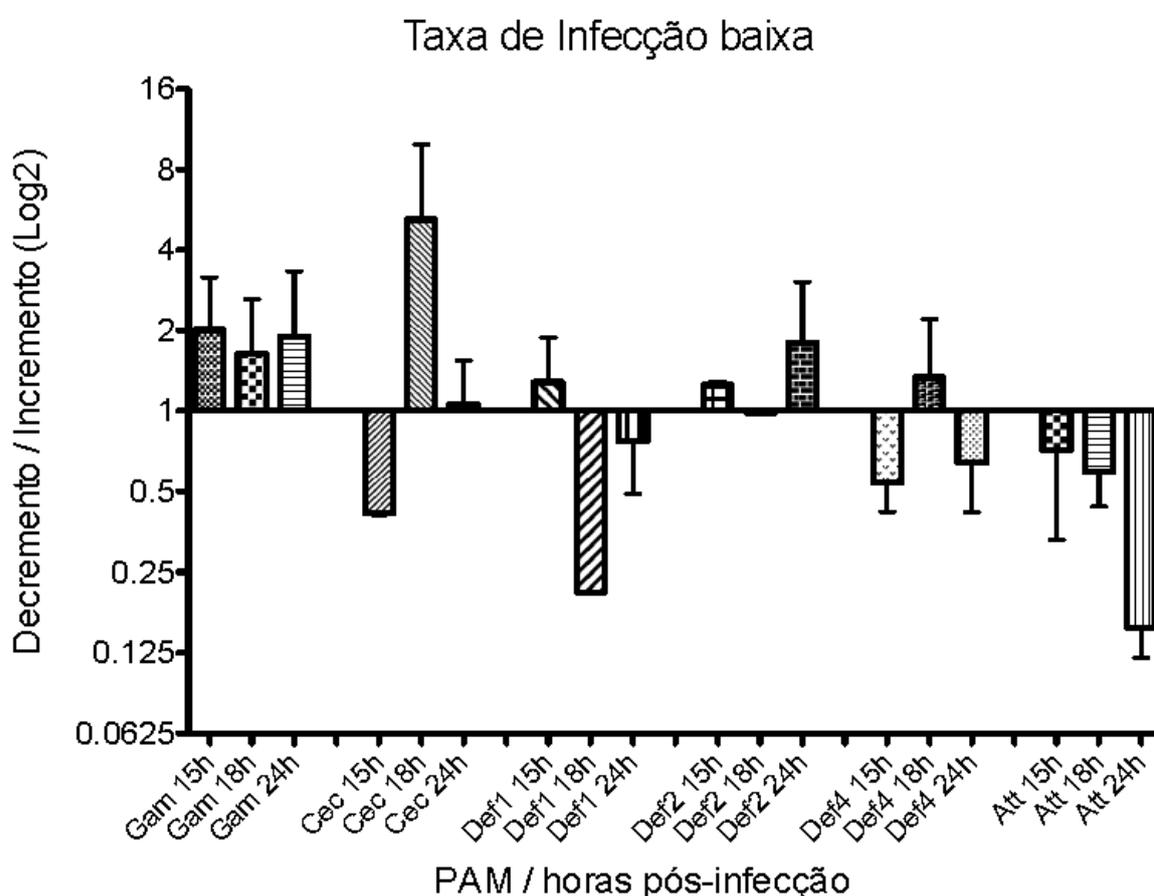


Figura 10 - Expressão dos peptídeos antimicrobianos no intestino médio de mosquitos com baixas taxas de infecção por *P. yoelii nigeriensis*. No eixo X as horas pós-infecção, eixo Y o valor Logarítmico do incremento/decremento (Log2 Fold Difference) da expressão dos 6 genes em resposta à infecção. Não houve diferenças significativas em todas as comparações testadas, utilizando o teste de Mann-Whitney.

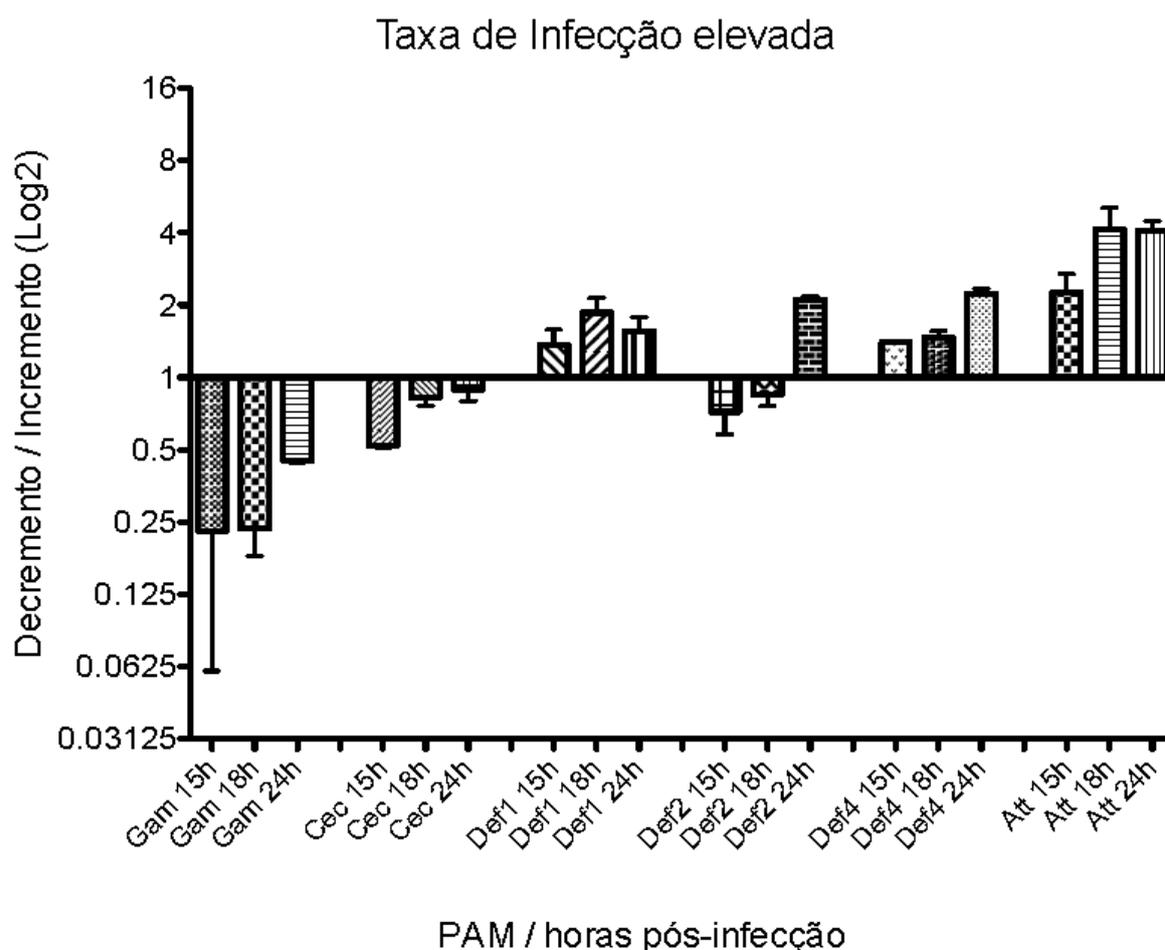


Figura 11 - Expressão dos peptídeos antimicrobianos no intestino médio de mosquitos com altas taxas de infecção por *P. yoelii nigeriensis*. No eixo X as horas pós-infecção, eixo Y o valor Logarítmico do incremento/decremento (Log₂ Fold Difference) da expressão dos 6 genes em resposta à infecção. Não houve diferenças significativas em todas as comparações testadas, utilizando o teste de Mann-Whitney.

4.1.3 Infecções de *Anopheles aquasalis* com *Plasmodium vivax*

Das 3.283 (65,7 %) fêmeas de *An. aquasalis* que se alimentaram de sangue infectado com *P. vivax* (teste: 1.613 – 49,2% e controle: 1.670 - 50,8%), 1.440 (43,9%) foram dissecadas e armazenados para a análises molecular (720 para ambos grupos, teste e controle), 572 (17,4%) foram dissecados (teste: 259 – 45,3% e controle: 313 – 54,7%) para a determinação da taxa e intensidade de infecção e 1.271 (38,7%) fêmeas não sobreviveram entre o repasto e a dissecção ao 7º dia pós alimentação (teste: 634 – 49,9% e controle: 637 – 50,1%). (Tabela 1).

A taxa de gametocitemia ficou entre 1,02% e 6,91%. A soma total de oocistos observados ao 7º dia foi de 2.997 em 125 mosquitos infectados. A quantidade máxima observada em um teste foi de 1.398 oocistos e o máximo visualizados em um intestino dissecado foi 176 oocistos, conforme demonstrado na Tabela 3. Quanto à intensidade de oocistos sem contar os experimentos com zeros, observou-se que a mediana variou entre 3 e 110 (Figura 12).

Entre os 9 testes realizados, 1 experimento (11,1%) apresentou taxa de infecção igual a 0 (alimentação 13) e por isso não foi utilizado para os experimentos de expressão de genes; 6 experimentos (66,7%) apresentaram taxa de infecção entre 1% e 60% (alimentações 4, 7, 11, 12, 14 e 15) e 2 experimentos (22,2%) apresentaram taxa de infecção máxima (100 %) (alimentações 2 e 3), (Figura 12).

Tabela 3 - Dados das infecções experimentais com dissecção de intestino para visualização de oocistos para *P. vivax*.

G	G	MA	MD	No. MPO	Tot. O. Ob.	II	Taxa (%)
2	2,00	302	15	15	1398	1,33	100
3	6,09	128	9	9	303	1	100
4	6,01	298	25	14	93	0	56
7	1,00	154	8	3	10	1,66	37,5
11	5,70	103	21	12	191	3,57	57,1
12	3,20	188	47	13	144	4,5	27,1
13	2,43	127	33	0	0	1,75	0,0
14	4,60	170	66	38	620	1,33	56,7
15	5,30	143	35	21	238	0	60
		1.613	259	125	2997		

G=grupo; Gametocitemia; MA = Mosquitos Alimentados; MD = Mosquitos Dissecados; No. MPO = Número de mosquitos positivos oocistos; Tot. O. Ob. = Total de oocistos observados; II = Intensidade de infecção; Taxa (%) = Taxa de Infecção.

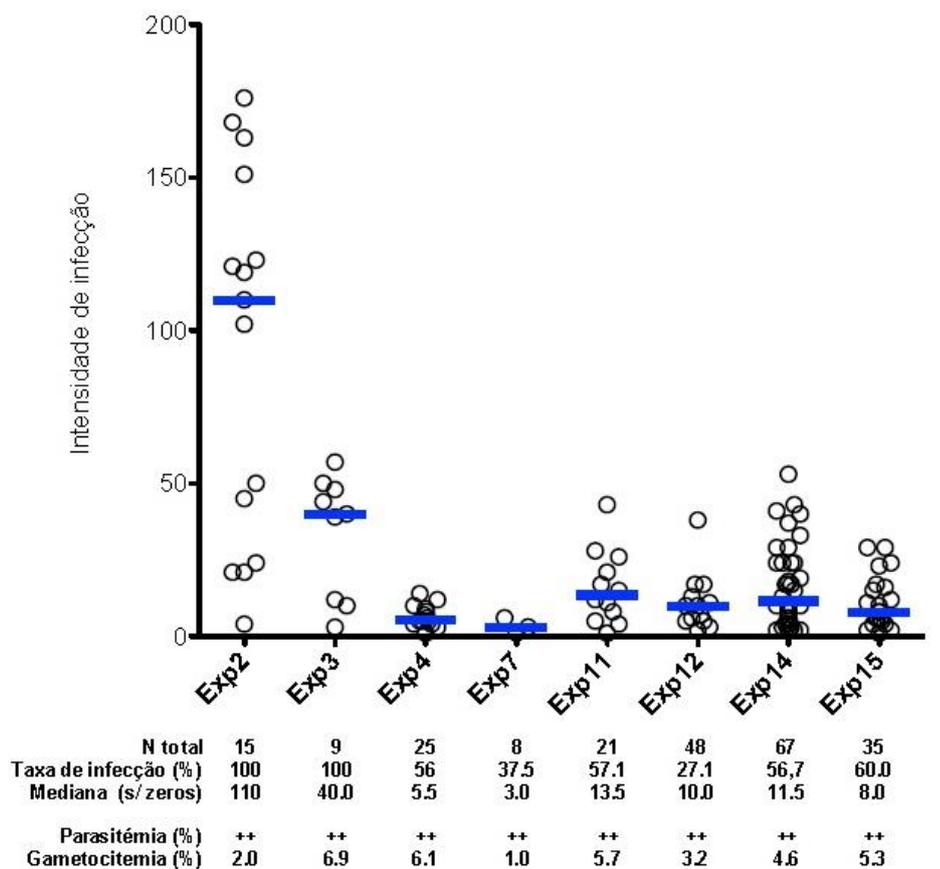


Figura 12 - Distribuição da intensidade de infecção por testes – *P. vivax*.

Quando observada a produção de PAM's em resposta à infecção por *P. vivax* (Figura 13), os dados mostram que as alterações na expressão dos peptídeos: attacina, cecropina, gambicina, defensina 2 e defensina 4 em função da taxa de infecção dos experimentos comparando com os controles não variam muito entre si. A ação dos peptídeos antimicrobianos para *P. vivax*, talvez não foi efetiva na redução da infecção, pois das nove infecções realizadas, 66,7% apresentaram na dissecação de oocistos ao oitavo dia, depois do repasto, taxas de infecções acima de 50%.

A expressão de todos os peptídeos, nos intervalos de 15 e 18h, se mostraram mais ativos em relação aos demais períodos estudados, com ênfase ao intervalo de 18h que apresentou pico de expressão na maioria dos peptídeos: cecropina, gambicina e defensina 2; nestes peptídeos, após o crescimento de expressão atingir o pico às 18h, as expressões diminuía gradativamente com o decorrer do tempo. Para os demais peptídeos estudados, attacina e defensina 4, as expressões iniciavam altas e também diminuía de forma decrescente no decorrer dos intervalos, ambos

peptídeos, tiveram a maior expressão no primeiro intervalo avaliado, às 15h; neste intervalo a attacina, mostrou de forma individual, maior pico, em comparação com os demais intervalos.

Os peptídeos gambicina e defensina 4, foram expressos em todos os intervalos estudados. Attacina e cecropina foram expressos em três intervalos (15h, 18h e 24h). Defensina 2 foi o único peptídeo expresso em dois intervalos (15h e 18h).

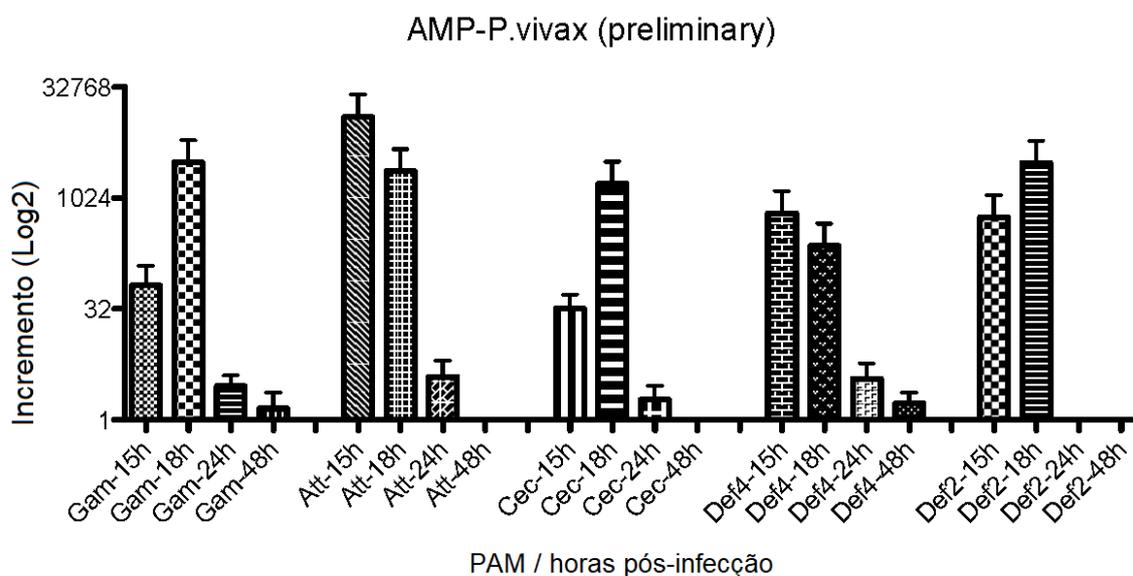


Figura 13 -Expressão dos peptídeos antimicrobianos no intestino médio de mosquitos infectados por *P. vivax*. No eixo X as horas pós-infecção, eixo Y o valor Logarítmico do decremento (Log2 Fold Difference) da expressão dos 5 genes em resposta à infecção por *P. vivax*. Não houve diferenças significativas em todas as comparações testadas, utilizando o teste de Mann-Whitney.

5. DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das alterações de transcrição dos genes que codificam os PAM's: Cecropina; Defensina 1; Defensina 2; Defensina 4; Attacina e Gambicina durante a invasão do intestino médio pelo oocineto

No presente estudo, notou-se que a intensidade de infecção (sem contar os experimentos com zeros) variou entre 3 e 110 oocistos para *P. vivax*, enquanto que para os experimentos com *P. yoelii nigeriensis* a mediana permaneceu abaixo de 5 (1 - 4,5). A baixa taxa de infecção pode não estar associada à taxa de gametócitos e a parasitemia, para infecções com *P. yoelii nigeriensis* e *An. aquasalis*.

Anopheles aquasalis foi susceptível a *P. vivax* apresentando infecções de taxas elevadas (27 -100%), em comparação com as infecções com *P. yoelii nigeriensis* (4 - 60%), fator que pode estar atribuído à refratariedade do mosquito ao parasita. Orfano et al 2016, em um estudo com *P. yoelii nigeriensis*, mostrou que *An. aquasalis* foi menos susceptível à infecção por esse parasita e no presente estudo observou-se que a infecção de *An. aquasalis* com *P. yoelii nigeriensis* apresentou uma dinâmica com aumento e diminuição dos PAM's de acordo com as taxas altas e baixas de infecção.

Os resultados mostraram que as infecções com *An. aquasalis* x *P. vivax* apresentaram alta infectividade, reforçando os resultados do trabalho de Ríos-Velásquez et al. 2013, onde a espécie *An. aquasalis* mostrou uma alta suscetibilidade ao *P. vivax*, confirmando que *An. aquasalis* é um bom modelo experimental para realização de estudos sobre interação parasito–hospedeiro em vetores do Novo Mundo. O intestino médio dos anofelinos é o principal local de contato e interação com o *Plasmodium*. As estratégias de controle da malária, baseadas na expressão transgênica dos fatores anti-plasmodiais, que visam controlar as ações do parasita no mosquito, exigem genes efetores, como também promotores específicos de tecidos e fases digestivas.

Os resultados deste trabalho mostraram que a defensina 2, no intervalo de 24 horas após o repasto infectante, com baixas taxas de infecção para *P. yoelii nigeriensis*, se apresentou pouco expressa, comparado com a gambicina e a cecropina, porém também atuante no controle da infecção, colaborando com Blandin

et al 2002, que em seu estudo, delimitou fenotipicamente, a função *in vivo* da defensina, em *An. gambiae* contra diferentes tipos de infecções sem tratamento, estando este peptídeo principalmente, presente no intestino médio anterior de mosquitos, mostrando que ela é induzida e pode até desempenhar um papel importante na resistência, dentro do período de 24 horas após a ingestão de sangue infectado e 36 horas depois, onde têm sido também detectadas na hemolinfa.

Os genes que codificam a cecropina foram os que, comparado com os demais do grupo, apresentaram o maior pico de expressão nas baixas taxas de infecção por *P. yoelii nigeriensis*, como mostrado por Vizioli et al., 2000, que os níveis de RNA da cecropina estão significativamente elevados dentro de 2 horas de infecção. Os níveis de RNA continuam a aumentar, embora moderadamente, entre 2 e 24 horas após a infecção; também foram monitoradas as atividades deste peptídeo, durante os diferentes estágios de desenvolvimento, constatando que um baixo nível de RNA de cecropina é detectável em pupas jovens e fêmeas adultas de 4 dias de idade. Sugerindo assim que a atividade deste peptídeo se torna mais efetiva no combate à infecção nos primeiros dias de emergência do anofelino, quando as fêmeas necessitam fazer o repasto.

Nos experimentos com baixa taxa de infecção para *P. yoelii* e para os experimentos com *P. vivax*, os genes que codificam o peptídeo da gambicina se mantiveram expresso em todos os intervalos, confirmando o que foi descrito no trabalho de Warr et al., 2007 e Vizioli et al. 2001, onde houve expressão altamente enriquecida de gambicina. Indicando que a mesma, possa estar favorecendo o sistema imune do inseto no controle da infecção por *Plasmodium*.

A gambicina é um peptídeo que contém oito resíduos de cisteína que formam quatro pontes dissulfeto intramoleculares, está presente no intestino dissecado e na carcaça, nos hemócitos e em seu meio condicionado, funcionando como um peptídeo antimicrobiano sistêmico; expressa nas partes abdominais-torácicas que contenham gordura corporal e no intestino médio, como é característico dos genes peptídeos antimicrobianos dos anofelinos, ocorrendo expressão principalmente no intestino anterior (69). Se forem secretados para o lúmen do intestino, podem representar uma resposta imune local rápida contra patógenos presentes no repasto sanguíneo. A secreção no intestino anterior talvez possa estar favorecendo a ação e neutralização

do patógeno no alimento ingerido antes que ele entre na parte posterior principal, protegendo assim a flora simbiótica posterior, que pode ser importante para a digestão corroborando com os estudos realizados por Vizioli et al. 2001.

A produção, a secreção contínua de gambicina ativa nas linhas celulares imunocompetentes e a sua rápida regulação transcricional da infecção, indicam que a gambicina é um componente das proteínas de fase aguda do sistema imunitário inato do mosquito (91), contribuindo para a redução dos oocinetos durante as primeiras horas de infecção; também deve ser analisado, se esta atividade tem capacidade de ser potencializada por componentes adicionais do lúmen do intestino médio ou do citoplasma epitelial. Segundo Vizioli et al. 2001, a falta de similaridade com outras sequências nas bases de dados, sugere que a gambicina possa ter evoluído especificamente contra *Plasmodium*, mas esta possibilidade ainda precisa ser examinada através de ensaios antiparasitários combinatórios in vitro ou também in vivo por silenciamento de genes.

Neste trabalho buscou-se dados sobre estratégias potenciais de controle e a importância de compreender todos os componentes e interações que compõem o sistema imunológico inato do mosquito, com base na própria defesa do mosquito contra o parasita, tornando assim mais um aliado contra a malária.

Nesse contexto, acredita-se que a criação de um método que controle ou mesmo elimine os estágios do parasita ainda no epitélio do intestino médio do inseto vetor, possa ser mais efetivo no combate ao parasita, sendo importante, portanto, a combinação de técnicas moleculares que tenham como alvo a investigação sobre a defesa do vetor no momento em que o parasita concentra grande atividade celular para manter sua sobrevivência e nesse sentido, a busca de conhecimentos sobre esses mecanismos de defesa podem apresentar informações sobre a competência vetorial dos mosquitos e demonstrar como interromper a transmissão da doença, por manipulação genética da escala e do momento da resposta imune (82).

Estudos futuros poderão determinar melhor os níveis de atividade dos PAM's nos distintos intervalos de tempo em *An. aquasalis* contra as diferentes fases do *Plasmodium*, bem como possíveis efeitos sinérgicos entre a defensina, cecropina, gambicina e possivelmente outros peptídeos endógenos em variadas espécies de

Anopheles, salientando-se que é muito importante, continuar a buscar informações sobre a interação vetor-parasito visando entendimento sobre a ativação imunológica e identificação de sinergias e antagonismos com a resposta montada contra patógenos humanos (82).

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi mostrado que:

Na infecção de *An. aquasalis* pelos dois parasitas estudados, houve regulação da expressão da gambicina em todos os intervalos, estudados;

A invasão do intestino médio de *An. aquasalis* por parasitas *P. yoelii nigeriensis*, induz rapidamente a expressão de genes que codificam a gambicina e a cecropina, sugerindo que o sistema imune dos mosquitos está agindo efetivamente no controle da infecção;

Nos experimentos com infecção por *P. vivax*, foi demonstrado que os PAM's podem estar atuando de forma conjunta para reduzir a infecção por este parasita;

Anopheles aquasalis se mostrou um bom modelo de infecção com *P. vivax* em comparação com *P. yoelii nigeriensis*.

A expressão de todos os peptídeos, se mostraram mais ativas nos intervalos de 15 e 18h, em relação aos demais períodos estudados;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarenga DAM, Culleton R, Pina-Costa A, Rodrigues DF, Bianco C, Silva S, et al. An assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. Scientific reports. 2018;8(1):86.
2. Martins-Campos KM, Pinheiro WD, Vitor-Silva S, Siqueira AM, Melo GC, Rodrigues IC, et al. Integrated vector management targeting Anopheles darlingi populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon. Malaria journal. 2012;11(1):351.
3. Costa ASL, Santos VC, Amorim PCV, Santos JE, Pinto AYdN. Triple infection by Trypanosoma cruzi, Plasmodium vivax and P. falciparum: case report. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2012;48(6):421-5.
4. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. Malaria journal. 2010;9(1):115.
5. Saúde SdVe, editor Boletim epidemiológico 2015.
6. Organization WH. World malaria report 2017: World Health Organization; 2017. 196 p.
7. PAHO. OPAS/OMS premia Costa Rica, El Salvador e Suriname por reduzir drasticamente casos e mortes por malária nos últimos 15 anos: 4 de novembro de 2016; 2016 [cited 2017 21 de agosto]. Available from: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5286:opas-oms-premia-costa-rica-el-salvador-e-suriname-por-reduzir-drasticamente-casos-e-mortes-por-malaria-nos-ultimos-15-anos&Itemid=812.
8. Saúde SdVeSMd. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. In: Saúde Md, editor. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015. Brasília, DF 2015. p. 1 - 6.
9. Saúde Md. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. . In: Saúde Md, editor. Brasília, DF. 2014. p. 1 - 16.
10. Tadei WP, Dutary Thatcher B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2000;42(2):87-94.
11. Kelly-Hope LA, McKenzie FE. The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. Malaria journal. 2009;8(1):19.
12. Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2015;110(1):23-47.
13. Forattini OP. Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.; 2002. 800 p.
14. Rios-Velasquez CM, Martins-Campos KM, Simoes RC, Izzo T, Santos EV, Pessoa FA. Experimental Plasmodium vivax infection of key Anopheles species from the Brazilian Amazon. Malar J. 2013;12.
15. Sampaio VdS, Rivas GBdS, Kobylinski K, Pinilla YT, Pimenta PFP, Lima JBP, et al. What does not kill it makes it weaker: effects of sub-lethal concentrations of ivermectin on the locomotor activity of Anopheles aquasalis. Parasites & Vectors. 2017;10(1):623.
16. Deane L, Deane MP. Notas sobre a distribuição ea biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil: Revista do Serviço Especial de Saúde Pública; 1948.

17. Ríos-Velásquez CM. Suscetibilidade e resposta imune de mosquitos *Anopheles* (Diptera: Culicidae) da Região Amazônica Brasileira quando infectados experimentalmente por *Plasmodium vivax* 2014.
18. Póvoa MM, Conn JE, Schlichting CD, Amaral JCOF, Segura MNO, Da Silva AN, et al. Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. *Journal of medical entomology*. 2003;40(4):379-86.
19. Da Silva AN, Dos Santos CC, Lacerda RN, Santa Rosa EP, De Souza RT, Galiza D, et al. Laboratory colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belém, Pará, Brazil. *Journal of medical entomology*. 2006;43(1):107-9.
20. Galvao AA, Damasceno R, Marques AP. Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica em Belém do Pará. *Arq Hig Saúde Pública*. 1942;12:51-111.
21. Deane LM. Malaria vectors in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1986;81:5-14.
22. Laubach H, Validum L, Bonilla J, Agar A, Cummings R, Mitchell C, et al. Identification of *Anopheles aquasalis* as a possible vector of malaria in Guyana, South America. *The West Indian medical journal*. 2001;50(4):319-21.
23. Manguin S, Carnevale P, Mouchet J, Coosemans M, Julvez J, Richard-Lenoble D, et al. Biodiversity of malaria in the world. 2008.
24. Berti J, Zimmerman R, Amarista J. Adult abundance, biting behavior and parity of *Anopheles aquasalis*, Curry 1932 in two malarious areas of Sucre State, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1993;88(3):363-9.
25. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & vectors*. 2010;3(1):72.
26. Tadei WP, Thatcher BD, Santos J, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;59(2):325-35.
27. Consoli RA, Oliveira RLd. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil: Editora Fiocruz; 1994.
28. Smith RC, Vega-Rodríguez J, Jacobs-Lorena M. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):644-61.
29. Sinden R. *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia*. 1999;41(1-3):139-48.
30. Ghosh A, Edwards M, Jacobs-Lorena M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitology Today*. 2000;16(5):196-201.
31. Dinglasan R, Devenport M, Florens L, Johnson J, McHugh C, Donnelly-Doman M, et al. The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2009;39(2):125-34.
32. Billker O, Shaw M, Margos G, Sinden R. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. *Parasitology*. 1997;115(01):1-7.
33. Baia-da-Silva DC, Alvarez LCS, Lizcano OV, Costa FTM, Lopes SCP, Orfanó AS, et al. The role of the peritrophic matrix and red blood cell concentration in *Plasmodium vivax* infection of *Anopheles aquasalis*. *Parasites & vectors*. 2018;11(1):148.
34. Dessens JT, Beetsma AL, Dimopoulos G, Wengelnik K, Crisanti A, Kafatos FC, et al. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *The EMBO Journal*. 1999;18(22):6221-7.

35. Vinetz JM, Dave SK, Specht CA, Brameld KA, Xu B, Hayward R, et al. The chitinase PfCht1 from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* lacks proenzyme and chitin-binding domains and displays unique substrate preferences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(24):14061-6.
36. Cohuet A, Harris C, Robert V, Fontenille D. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? *Trends in Parasitology*. 2010;26(3):130-6.
37. Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, et al. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002742.
38. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 2002;298(5591):129-49.
39. Cirimotich CM, Dong Y, Garver LS, Sim S, Dimopoulos G. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Developmental & Comparative Immunology*. 2010;34(4):387-95.
40. Riehle MM, Xu J, Lazzaro BP, Rottschaefer SM, Coulibaly B, Sacko M, et al. *Anopheles gambiae* APL1 is a family of variable LRR proteins required for Rel1-mediated protection from the malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *PLoS One*. 2008;3(11):e3672.
41. Sampaio VS, Beltrán TP, Kobylinski KC, Melo GC, Lima JBP, Silva SGM, et al. Filling gaps on ivermectin knowledge: effects on the survival and reproduction of *Anopheles aquasalis*, a Latin American malaria vector. *Malaria Journal*. 2016;15(1):491.
42. Riehle MA, Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2005;35(7):699-707.
43. Simões ML, Caragata EP, Dimopoulos G. Diverse Host and Restriction Factors Regulate Mosquito–Pathogen Interactions. *Trends in Parasitology*. 2018.
44. McKeon SN. Population genetics and ecology of regional malaria vectors in Amazonian Brazil: State University of New York at Albany; 2013.
45. Bourke BP, Foster PG, Bergo ES, Calado DC, Sallum MAM. Phylogenetic relationships among species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera, Culicidae) based on nuclear and mitochondrial gene sequences. *Acta tropica*. 2010;114(2):88-96.
46. Dixit J, Srivastava H, Singh O, Saksena D, Das A. Multilocus nuclear DNA markers and genetic parameters in an Indian *Anopheles minimus* population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011;11(3):572-9.
47. Adolphi A, Lycett GJ. Opening the toolkit for genetic analysis and control of *Anopheles* mosquito vectors. *Current Opinion in Insect Science*. 2018.
48. Catteruccia F, Levashina EA. RNAi in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Therapeutic Applications of RNAi*: Springer; 2009. p. 63-75.
49. Warr E, Aguilar R, Dong Y, Mahairaki V, Dimopoulos G. Spatial and sex-specific dissection of the *Anopheles gambiae* midgut transcriptome. *BMC Genomics*. 2007;8(1):37.
50. Vincke I. Natural history of *Plasmodium berghei*. *Indian journal of malariology*. 1954;8(4):245-56.
51. Landau I, R K. Note préliminaire sur le cycle évolutif des deux *Plasmodium* du rongeur *Thamnomys rutilans* de la République Centrafricaine. *COMPTE RENDUS HEBDOMADAIRES DES SEANCES DE L ACADEMIE DES SCIENCES SERIE D*. 1966;262(10):1113-&.

52. Killick-Kendrick R. Parasitic protozoa of the blood of rodents: I: The life-cycle and zoogeography of *Plasmodium berghei nigeriensis* subsp. nov. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 1973;67(3):261-77.
53. Landau I. Description of *Plasmodium chabaudi*, a Parasite of African Rodents. *Compte Rendu de l'Academie des Sciences*. 1965;260:3758-61.
54. Alavi Y, Arai M, Mendoza J, Tufet-Bayona M, Sinha R, Fowler K, et al. The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *International journal for parasitology*. 2003;33(9):933-43.
55. Akaki M, Dvorak JA. A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites. *Journal of experimental biology*. 2005;208(16):3211-8.
56. Vaughan JA, Narum D, Azad AF. *Plasmodium berghei* ookinete densities in three anopheline species. *The Journal of parasitology*. 1991:758-61.
57. Sinden RE, Butcher GA, Beetsma A. Maintenance of the *Plasmodium berghei* life cycle. *Malaria Methods and Protocols: Methods and Protocols*. 2002:25-40.
58. Frischknecht F, Martin B, Thiery I, Bourgouin C, Menard R. Using green fluorescent malaria parasites to screen for permissive vector mosquitoes. *Malaria journal*. 2006;5(1):23.
59. Hume JC, Tunnicliff M, Ranford-Cartwright LC, Day KP. Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*. 2007;6(1):139.
60. Lo TM, Coetzee M. Marked biological differences between insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles funestus* infected with the murine parasite *Plasmodium berghei*. *Parasites & vectors*. 2013;6(1):184.
61. Xu J, Hillyer JF, Coulibaly B, Sacko M, Dao A, Niaré O, et al. Wild *Anopheles funestus* mosquito genotypes are permissive for infection with the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *PloS one*. 2013;8(4):e61181.
62. Killick-Kendrick R. *Taxonomy, zoogeography and evolution*. London: Academic Press; 1978. 432 pages p.
63. Jaramillo-Gutierrez G, Rodrigues J, Ndikuyeze G, Povelones M, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. Mosquito immune responses and compatibility between *Plasmodium* parasites and anopheline mosquitoes. *BMC microbiology*. 2009;9(1):154.
64. Somboon P, Prapanthadara L-a. Trypsin and aminopeptidase activities in blood-fed females *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) of differing susceptibility to *Plasmodium yoelii nigeriensis*. 2002.
65. Orfanó AdS. Abordagens distintas à Interação entre *Anopheles* spp. e *Plasmodium* spp: estabelecendo um modelo murino de laboratório, estudando o escape dos esporozoítos e a microbiota 2016.
66. Dimopoulos G. Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions. *Cellular microbiology*. 2003;5(1):3-14.
67. Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Santillan F, Chavez B, Nettel JA, Hernandez-Avila JE, et al. *Plasmodium vivax*: ookinete destruction and oocyst development arrest are responsible for *Anopheles albimanus* resistance to circumsporozoite phenotype VK247 parasites. *Experimental parasitology*. 2001;98(3):152-61.
68. Serrano-Pinto V, Acosta-Pérez M, Luviano-Bazán D, Hurtado-Sil G, Batista CV, Martínez-Barnetche J, et al. Differential expression of proteins in the midgut of

- Anopheles albimanus infected with Plasmodium berghei. Insect biochemistry and molecular biology. 2010;40(10):752-8.
69. Silveira H, Ramos S, Abrantes P, Lopes LF, do Rosario VE, Abrahamsen MS. Effect of chloroquine on gene expression of Plasmodium yoelii nigeriensis during its sporogonic development in the mosquito vector. Malaria journal. 2007;6(1):84.
70. Boëte C. Malaria parasites in mosquitoes: laboratory models, evolutionary temptation and the real world. Trends in parasitology. 2005;21(10):445-7.
71. Ahdika A, Lusiyanana N, Kurniawan M. Anticoagulants effect on pre-adult growth of Aedes aegypti using artificial membrane feeding with stochastic approach. Model Assisted Statistics and Applications. 2016;11(4):339-48.
72. Lensen A, Bril A, Van De Vegte M, Van Gemert G, Eling W, Sauerwein R. Plasmodium falciparum: infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes. Experimental parasitology. 1999;91(1):101-3.
73. Mitri C, Thiery I, Bourgouin C, Paul R. Density-dependent impact of the human malaria parasite Plasmodium falciparum gametocyte sex ratio on mosquito infection rates. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 2009;276(1673):3721-6.
74. Harris C, Lambrechts L, Rousset F, Abate L, Nsango SE, Fontenille D, et al. Polymorphisms in Anopheles gambiae immune genes associated with natural resistance to Plasmodium falciparum. PLoS pathogens. 2010;6(9):e1001112.
75. Nsango SE, Abate L, Thoma M, Pompon J, Fraiture M, Rademacher A, et al. Genetic clonality of Plasmodium falciparum affects the outcome of infection in Anopheles gambiae. International journal for parasitology. 2012;42(6):589-95.
76. Da DF, Churcher TS, Yerbanga RS, Yaméogo B, Sangaré I, Ouedraogo JB, et al. Experimental study of the relationship between Plasmodium gametocyte density and infection success in mosquitoes; implications for the evaluation of malaria transmission-reducing interventions. Experimental parasitology. 2015;149:74-83.
77. Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, et al. Natural microbe-mediated refractoriness to Plasmodium infection in Anopheles gambiae. Science. 2011;332(6031):855-8.
78. Vale N, Aguiar L, Gomes P. Antimicrobial peptides: a new class of antimalarial drugs? Front Pharmacol. 2014;5:275.
79. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+ CD4+ regulatory T cells. International immunology. 2004;16(11):1643-56.
80. Baton LA, Robertson A, Warr E, Strand MR, Dimopoulos G. Genome-wide transcriptomic profiling of Anopheles gambiae hemocytes reveals pathogen-specific signatures upon bacterial challenge and Plasmodium berghei infection. BMC genomics. 2009;10(1):257.
81. Sim S, Jupatanakul N, Dimopoulos G. Mosquito immunity against arboviruses. Viruses. 2014;6(11):4479-504.
82. Silveira H, Gabriel A, Ramos S, Palma J, Felix R, Custodio A, et al. CpG-containing oligodeoxynucleotides increases resistance of Anopheles mosquitoes to Plasmodium infection. Insect Biochem Mol Biol. 2012;42(10):758-65.
83. Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in Anopheles gambiae mosquitoes. Science. 2010;329(5997):1353-5.
84. Auvynet C, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. The FEBS journal. 2009;276(22):6497-508.

85. da Silva FP, Machado MCC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*. 2012;36(2):308-14.
86. Boman H. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of internal medicine*. 2003;254(3):197-215.
87. Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog*. 2006;2(6):e52.
88. Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, et al. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *science*. 2007;316(5832):1738-43.
89. Lemaître B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:697-743.
90. Salgueiro P, Lopes AS, Mendes C, Charlwood JD, Arez AP, Pinto J, et al. Molecular evolution and population genetics of a Gram-negative binding protein gene in the malaria vector *Anopheles gambiae* (sensu lato). *Parasites & vectors*. 2016;9(1):515.
91. Barillas-Mury C, Wizel B, Han YS. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2000;30(6):429-42.
92. Dimopoulos G, Christophides GK, Meister S, Schultz J, White KP, Barillas-Mury C, et al. Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(13):8814-9.
93. Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*. 2002;298(5591):159-65.
94. Levashina EA. Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2004;34(7):673-8.
95. Malpede BM, Tolia NH. Malaria adhesins: structure and function. *Cellular microbiology*. 2014;16(5):621-31.
96. Blackman MJ. Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. *Cellular microbiology*. 2004;6(10):893-903.
97. Wegscheid-Gerlach C, Gerber H-D, Diederich WE. Proteases of *Plasmodium falciparum* as potential drug targets and inhibitors thereof. *Current topics in medicinal chemistry*. 2010;10(3):346-67.
98. Yi H-Y, Chowdhury M, Huang Y-D, Yu X-Q. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014;98(13):5807-22.
99. Carlsson A, Engström P, Palva ET, Bennich H. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *omp* gene transcription. *Infection and Immunity*. 1991;59(9):3040-5.
100. Soumya M, Reddy H, Nageswari G, Venkatappa B. Silkworm (*Bombyx mori*) and its constituents: A fascinating insect in science and research. 2017.
101. Carlsson A, Nyström T, de Cock H, Bennich H. Attacin-an insect immune protein-binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. *Microbiology*. 1998;144(8):2179-88.
102. Kim W, Koo H, Richman AM, Seeley D, Vizioli J, Klocko AD, et al. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles*

- gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *Journal of medical entomology*. 2004;41(3):447-55.
103. Gwadz R, Kaslow D, Lee J-Y, Maloy W, Zasloff M, Miller L. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infection and Immunity*. 1989;57(9):2628-33.
104. Jaynes JM, Burton CA, Barr SB, Jeffers GW, Julian GR, White KL, et al. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *The FASEB Journal*. 1988;2(13):2878-83.
105. Rodriguez M, Zamudio F, Torres JA, Gonzalezceron L, Possani LD, Rodriguez MH. Effect of a cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *Experimental parasitology*. 1995;80(4):596-604.
106. Vizioli J, Bulet P, Charlet M, Lowenberger C, Blass C, Müller HM, et al. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect molecular biology*. 2000;9(1):75-84.
107. Vizioli J, Bulet P, Hoffmann JA, Kafatos FC, Müller H-M, Dimopoulos G. Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(22):12630-5.
108. Blandin S, Moita LF, Köcher T, Wilm M, Kafatos FC, Levashina EA. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO reports*. 2002;3(9):852-6.
109. Kokoza V, Ahmed A, Shin SW, Okafor N, Zou Z, Raikhel AS. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(18):8111-6.
110. Shahabuddin M, Fields I, Bulet P, Hoffmann JA, Miller LH. *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. *Experimental parasitology*. 1998;89(1):103-12.
111. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):611-22.

8. ANEXOS

8.1 Aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resposta imune inata de Anofelíneos vetores de malária na Amazônia à infecção pelo Plasmodium.

Pesquisador: MARIA DAS GRAÇAS VALE BARBOSA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20267013.8.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 422.289

Data da Relatoria: 11/10/2013

Apresentação do Projeto:

A eliminação efetiva da malária só será possível se forem aplicadas medidas integradas para esse objetivo incluindo o controle vetorial. Historicamente, as doenças transmitidas por vetores foram controladas não só através do controle direto da doença nos seres humanos, mas principalmente através do vector. Associado a este facto poderá estar a capacidade dos mosquitos transmissores da malária terem mais sucesso em conter a infecção do que os seres humanos - em áreas hiperendêmicas onde a prevalência pode chegar a 91%, as taxas de infecção dos mosquitos é uma ordem de magnitude menor. Evidências experimentais demonstram que o mosquito pode desencadear mecanismos eficazes para interromper o ciclo de vida do parasita. Neste sentido, o conhecimento do sistema imunitário do mosquito proporcionará uma ferramenta poderosa para bloquear a transmissão da malária. Mesmo assim, a imunidade natural não é suficiente para suprimir totalmente a infecção. Se a imunidade do mosquito puder ser estimulada de modo a que os níveis de infecção por Plasmodium fiquem abaixo do limiar de transmissão, isto representaria uma maneira nova e eficaz para controlar/eliminar a malária.

Trata-se de protocolo referente ao Projeto de Pesquisa intitulado "Resposta imune inata

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 422.289

de Anofelíneos vetores de malária na Amazônia à infecção pelo Plasmodium", cuja pesquisadora responsável é a Dra. Maria das Graças Vale Barbosa e compo a equipe de pesquisadores Henrique Manuel Condinho da Silveira. O estudo é nacional, unicêntrico e se enquadra no Grupo III, portanto, não se refere à Áreas Temáticas Especiais e nem devendo ser apreciado pela CONEP. O estudo é prospectivo e analítico, a partir de infecções experimentais em vetores transmissores de malária por alimentação indireta com utilização de sangue de doentes com Plasmodium vivax patente de esfregaço sanguíneo atendidos no ambulatório da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado que consentam participar do Projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Compreender as interações entre o parasita e o seu vetor a fim de desenvolver ferramentas inovadoras para o controle da malária.

Objetivo Secundário:

1) testar o efeito das moléculas imuno-estimuladoras sobre a resposta a P. vivax, P. falciparum e plasmódios murinos em infecções experimentais de A. aquasalis e Anopheles darlingi; 2) identificar os mecanismos associados à resposta imunitária protetora do mosquito à infecção por Plasmodium; 3) estudar o papel da transglutaminase na infecção por P. vivax do mosquito.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Apenas os inerentes à colheita de sangue venoso efetuada por pessoal especializado.

Benefícios:

O principal benefício do paciente em participar deste estudo é o recebimento de mais informações sobre a transmissão da malária, para melhorar o seu diagnóstico e tratamento. O projeto irá contribuir para o avanço da ciência em geral, e em particular para o aumento do conhecimento das interações dos vetores da malária na Amazônia, enquanto busca novas formas para o controle da malária na região e no mundo.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 422.289

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta é relevante e dentro do contexto, é plenamente factível, portanto, devidamente instruído, está apto para análise.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo deste estudo traz a documentação seguinte: 1. folha de rosto; 2. projeto de pesquisa; 3. termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE); 4. termo de assentimento; 5. questionário de infecção experimental de anofelinos; 6. plano de trabalho do programa de pesquisador visitante especial - chamada pública número 61/2011; 7. projeto original. 8. cronograma; 9. orçamento estimado em R\$ 150.000,00. A folha de rosto consta preenchimentos dos seus campos e assinaturas por quem de direito, porém no campo 12 falta informação.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PENDÊNCIA 4. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) se apresenta explicativo, mas necessitando de readequações/inclusão para atender o item II, II.5 e II.23 da Resolução no. 466/2012, do CNS.

b) no TCLE é informado que "O volume de sangue é pequeno". Solicita-se informar a quantidade de material biológico (sangue) que será retirada.

Resposta da pesquisadora: Foi corrigido termo para 5 ml de sangue, equivalente a uma colher de sopa.

Análise: no TCLE está informando "O quantidade de sangue é pequena e não representa risco para a saúde, (10ml - igual a duas colheres de sopa cheias). A informação difere da mencionada na folha resposta. Diante disso, solicita-se correção. PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.

Resposta da pesquisadora: A quantidade correta é 5 ml de sangue, como consta no TCLE e no projeto.

Análise: a informação foi corrigida no TCLE para 5 ml de sangue. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 422.289

e) no TCLE, página 1 consta a informação "Entre em contato com os pesquisadores responsáveis do estudo em caso de hematomas ou infecções no local da inserção da agulha". Solicita-se citar os pesquisadores, local, dias da semana e horários de atendimento.

Resposta da pesquisadora: Foi acrescentado no item Contatos no TCLE os dias horários e os telefones celular e convencional para contato com os pesquisadores.

Análise: no TCLE a resposta foi readequada para o atendimento na FMT-HVD, porém é mencionado "... pelo telefone (92) 2127-3516 (qualquer dia e horário)"; esse número funciona na Entomologia da FMT-HVD. Diante disso solicita-se esclarecimento se o atendimento será em todos os dias da semana e durante 24h00. PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.

Resposta da pesquisadora: Como já foi esclarecido antes, os pesquisadores não estarão nas comunidades, foi um equívoco de digitação, todo contato será feito nas dependências da FMT-HVD, já detalhados os locais. Foi acrescentado no item Contatos no TCLE os dias horários e os telefones celular e convencional para contato com o pesquisador já nominado, inclusive celular para ligar a quaisquer hora.

Análise: a informação foi corrigida no TCLE conforme resposta da pesquisadora. PENDÊNCIA ATENDIDA.

h) ainda na página 2 do TCLE, consta a informação " Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores nas Comunidades citadas acima ou na Fundação de Medicina Tropical para que eles possam tirar sua dúvida. Solicita-se informar aos participantes da pesquisa quais são os pesquisadores, em qual local em cada uma das Comunidades e na FMT-HVD, dias da semana e horários que os pesquisadores possam ser encontrados.

Resposta da pesquisadora: Foi acrescentado no item Contatos no TCLE os dias horários e os telefones celular e convencional para contato com os pesquisadores já nominados.

Análise: no TCLE não foi informado os locais nas Comunidades, os nomes dos pesquisadores presentes nas referidas comunidades, assim como os dias e horários que possam ser encontrados

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 422.289

pelo participante da pesquisa em caso de necessidade. Diante disso, PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.

Resposta da pesquisadora: os pesquisadores não estarão nas comunidades, foi um equívoco de digitação, todo contato será feito nas dependências da FMT-HVD.

Análise: considerando-se o esclarecimento por parte da pesquisadora e a correção da informação no TCLE, PENDÊNCIA ATENDIDA.

PENDÊNCIA 6. Não se identificou as anuências do Ambulatório de DIP e das Gerência de Entomologia e de Malária da FMT-HVD. Solicita-se a inclusão desses documentos (anuências).

Resposta da pesquisadora: Foram anexadas as anuências de ambas as gerências.

Análise: entre os documentos anexos, não se identificou as anuências. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

Resposta da pesquisadora: Foram anexadas as anuências de ambas as gerências.

Análise: identificou-se anexadas as anuências da Gerência de Malária e da Gerência de Entomologia, faltando a anuência do Ambulatório de DIP. Entretanto, para que a pesquisa não tenha seu início atrasado e consequentemente tenha comprometida a execução de suas etapas, recomenda-se que a anuência do Ambulatório de DIP seja enviada ao CEP através de notificação.

PENDÊNCIA (NOVA)7. No cronograma de atividades a pesquisa teria início em 01/10/2013. Solicita-se esclarecimento. Para atender o item XI, XI.2 "a" da Resolução no. 466/2012, CONEP.

Análise: a pesquisadora não respondeu na folha resposta, porém observou-se que a informação foi readequada no cronograma de atividades para "início em 15/10/2013".

Diante do exposto, o voto dessa relatoria é pela APROVAÇÃO deste protocolo.

S.M.J. É o parecer.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 422.289

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

MANAUS, 11 de Outubro de 2013

Assinado por:
Prof. Dr. Marilaine Martins
Comitê de Ética em Pesquisa
FMT-HVD
Marilaine Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

8.2 Licença da Comissão de Ética no Uso de Animais

**CEUA****FMT-HVD**

Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA AO USO DE ANIMAIS - CEUA**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: "Resposta imune inata de Anofelíneos vetores de malária na Amazônia à infecção pelo Plasmodium".

Pesquisador: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Área Temática: Ciências Biológicas/Entomologia e Malacologia de Parasitos e vetores

Versão: Original

Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE):

Instituição Proponente: FMT-HVD

Patrocinador Principal: CAPES/CNPq

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 001/2014

Data da Relatoria: 11 de março de 2014

Apresentação do Projeto: O experimento/aula/treinamento será desenvolvido nas dependências da FMT-HVD.

Objetivo da Pesquisa: Compreender as interações entre o parasita e o seu vetor a fim de desenvolver ferramentas para o controle da malária.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos baixos, apenas os inerentes à colheita de sangue venoso a ser efetuada por pessoal especializado com material descartável.

Benefícios: O principal benefício do paciente em participar deste estudo é o recebimento de mais informações sobre a transmissão da malária, para melhorar o seu diagnóstico e tratamento. O projeto irá contribuir para o avanço da ciência em geral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação do CIUCA: Não

Considerações Finais a critério do CEUA:

Manaus, 11 de março de 2014



 Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra
 Coordenadora do Departamento de Pesquisa
 FMT - HVD

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
 AV. PEDRO TEIXEIRA, 25 - BAIRRO D. PEDRO I - CEP 69.040-000 - MANAUS-AMAZONAS-BRASIL
 FONE (0XX92) 2127-3402 - PABX (0XX92) 2127-3555 Ramal 3402
 E-mail: fmt@fmt.am.gov.br - Homepage: www.fmt.am.gov.br

8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE



Resposta imune inata de Anofelinos vetores de malária na Amazônia à infecção pelo *Plasmodium*.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) está estudando a o mosquito que transmite a malária às pessoas que moram em áreas onde existe a doença. Os pesquisadores querem entender melhor como o parasita da malária interage com o mosquito e deste modo é transmitido dos mosquitos às pessoas. Quando um mosquito pica uma pessoa com malária os parasitas que estão no sangue desta pessoa passam para o mosquito, e dessa forma o mosquito se torna capaz de passar a malária para outras pessoas, espalhando a doença. Para nos ajudar a entender melhor esse processo, precisamos estudar cerca de 200 pessoas com malária de todas as idades para saber se o sangue coletado delas vai infectar o mosquito no laboratório e como o mosquito reage a esta infecção impedindo a sua transmissão. Por isso pedimos que você participe deste estudo.

Este é um estudo sobre transmissão da malária, que deve durar por volta de 3 (três) anos. Você não vai precisar fazer nada de especial para participar do projeto. Você vai fazer os exames e vai receber o tratamento gratuito de malária se tiver a doença seguindo o protocolo do Ministério da Saúde na Fundação de Medicina Tropical. Dessa forma, se você apresentar um resultado positivo na gota espessa receberá o tratamento, como já é feito na rotina. Mesmo se você tiver um resultado negativo, você também terá acesso a esta informação.

Se você aceitar participar do estudo, será colhida uma amostra de sangue do dedo para realizar uma lâmina para o diagnóstico de malária, e também será colhida uma amostra de sangue da veia do braço para alimentar os mosquitos no laboratório, tanto de pessoas com sintomas quanto de pessoas sem sintomas da malária.

Para coletar a amostra de sangue do dedo e da veia do braço, você poderá sentir um pouco de dor, mas que deve parar dentro de alguns minutos. Se a limpeza do dedo ou do braço não for correta, pode haver uma infecção, mas isto é muito raro e se acontecer será acompanhada por nossa equipe de trabalho. O volume de sangue coletado é pequeno e não representa risco para a saúde, mesmo das crianças. Após a agulha ser retirada, o sangramento será contido com uma pequena bandagem (do tipo band-aid). Se a agulha atravessar o vaso, há um risco de sangramento local que pode resultar num pequeno (1 cm) hematoma. Entre em contato com os responsáveis do estudo em caso de hematomas ou infecções no local da inserção da agulha. Nestes casos, se necessário, você receberá tratamento. A coleta de sangue será feita por pessoa com treinamento e experiência, inclusive com crianças, para diminuir qualquer desconforto. A participação neste estudo não levará a riscos futuros para a saúde. Se ocorrer qualquer dano ou prejuízo à sua saúde em decorrência deste projeto, você terá direito à indenização.

Se você concordar, o restante desse material que não foi utilizado nos exames será armazenado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, na Gerência de Malária, num freezer a -80°C , para estudos futuros sobre a malária. As amostras permanecerão armazenadas por 5 anos. Depois desse período, as amostras não poderão mais ser utilizadas e serão descartadas. Lembramos que estas amostras armazenadas só serão utilizadas no futuro se você concordar e caso o projeto seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional ou, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Portanto, nós queremos sua permissão para testar seu sangue para malária e guardar o sangue que sobrar para poder fazer algum outro estudo no futuro, relacionado à malária. O material deverá ficar guardado sem nenhuma identificação pessoal na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (Hospital Tropical), em Manaus, sob a responsabilidade do Dra. Maria das Graças vale Barbosa. Todo o material será guardado com um código, sem colocar seu nome. Seu nome nunca será usado em público. Se em qualquer momento você quiser sua amostra seja retirada do nosso repositório, seu pedido será atendido.

O principal benefício em participar desse estudo é o recebimento de mais informações sobre a transmissão da malária, para melhorar o seu diagnóstico e tratamento, além de buscar novas formas para o controle dessa doença. Com o diagnóstico e melhor entendimento de como a doença é transmitida, é possível que haja uma diminuição do número de casos de malária

em nossa região. Entretanto, você não receberá nenhum incentivo financeiro. Se tiver algum prejuízo em participar desta pesquisa, converse com um de nossos pesquisadores para que ele possa lhe ajudar. Se em qualquer momento você quiser se retirar do estudo, você poderá fazer isso, e mesmo assim terá direito ao diagnóstico e ao tratamento da malária. Participando do estudo você não precisará gastar nada com transporte e alimentação, pois todos os procedimentos do estudo, como a coleta das amostras biológicas, serão feitas na sua casa, em visitas realizadas pela equipe de pesquisa ou caso não more na comunidade do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara poderá se encaminhar a Fundação. Você não terá nenhum custo e não receberá qualquer vantagem financeira.

Contatos

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores nas Comunidades citadas acima ou na Fundação de Medicina Tropical para que eles possam tirar sua dúvida. Você poderá também fazer contato com o Dra. Maria das Graças Vale Barbosa, responsável pelo projeto, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 9114 7633 (qualquer dia e horário). O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado também poderá prestar esclarecimentos ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 2127 3572 (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas). Este TCLE foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Eu,, entendi tudo sobre o estudo de "Resposta imune inata de Anofelíneos vetores de malária na Amazônia à infecção pelo *Plasmodium*" e autorizo a minha participação no estudo e que o material coletado pela equipe da pesquisa (sangue) fique armazenado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para que o mesmo seja utilizado em possíveis estudos futuros.

Quando os novos estudos forem realizados com o meu sangue:

- () Quero ser avisado.
 () Não preciso ser avisado.

Nome do menor (se o consentimento for para um menor)

.....

Assinatura do voluntário (ou responsável)

..... Data: / /

Endereço:

Telefone: (....)-.....

Polegar direito

Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário

.....

Data: / /

8.5 Procedimento operacional padronizado para extração de RNA.



Procedimento Operacional Padrão Centro de Entomologia

Projeto: Resposta imune inata de Anofelinos vetores de malária na Amazônia à infecção pelo *Plasmodium*.

Título: Extração de RNA

Elaborado por: Ana Custódio e Rosa Amélia

Revisado por: Henrique Silveira

1. Instruções para esterelização e manuseio dos materiais

- O saco de ponteiras e de microtubos deve ser aberto exclusivamente para manipulação de RNA e identificados.
- Autoclavar as ponteiras com filtro e mante-las estéreis até o momento de uso
- Tratar as setas utilizadas para macerar com DEPC (ver procedimento abaixo). Após o autoclave, retirar as setas com luvas e colocar dentro de tubos falcon de 50ml (saco com tubos apenas utilizados para RNA e nunca manipulá-los sem luvas). Secar em estufa.

- Tratamento para eliminar Rnases:

- Material de vidro:

180°C por 4 horas

- Tratamento com DEPC :

Em um frasco de vidro, incubar as setas com 0,1% DEPC overnight em temperatura ambiente e em seguida autoclavar.

(500ul de DEPC para 500ml de água destilada ou MilliQ)

- Todo o material a ser utilizado na extração deve manipulado utilizando luvas e deve estar identificado para uso de "RNA"
- Utilizar o RNAzap para limpeza da bancada e do material a ser utilizado.
- Ligar as estufas antes de iniciar a extração, uma a 37°C e outra a 55 - 60°C.

2. Extração de RNA com TriReagent

2.1 Preparação das amostras:

- Retirar as amostras do congelador (-20°) e deixar em temperatura ambiente (o RNAlater deve estar transparente, sem cristais)
- Centrifugar o material em RNAlater por 1 minuto.
- Retirar todo o RNAlater

NOTA: o material (intestino e corpo gordo) nem sempre fica no fundo do tubo, devendo ter cuidado ao retirar o sobrenadante para não pipetar as amostras junto).

2.2 Homogeneização

Homogeneizar as amostras de tecido em 1 ml de TriReagent. O volume da amostra não deve exceder 10% do volume de Trizol usado na homogeneização.

Destruir os tecidos com as setas e 100ul Trizol. Depois juntar os restantes 900ul Trizol.

2.3 Separação de fases

- Incubar as amostras homogeneizadas durante 5 minutos entre 15 e 30 °C (RT) para permitir a dissociação completa dos complexos nucleoproteicos.
- Adicionar 0.2 ml de clorofórmio por cada ml de Trizol utilizado.
- Tapar bem os tubos e agitar vigorosamente (vortex) durante 15 segundos.
- Incubar entre 15 e 30 °C (RT), 2 a 3 minutos.

- Centrifugar a 12 000 g, 15 minutos, entre 2 e 8 °C.
- Após a centrifugação, a mistura apresenta uma fase inferior avermelhada fenólica, uma interfase e uma fase superior incolor aquosa. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. O volume da fase aquosa é cerca de 60 % do volume de Trizol utilizado na homogeneização.

2.4 Precipitação do RNA

- Transferir a fase aquosa para um novo tubo (*cuidado, retirar SÓ a fase aquosa, se for difícil, retirar o máximo possível sem trazer a interfase, é preferível desperdiçar alguma fase aquosa do que trazer a interfase*) e guardar a fase orgânica para eventual extração protéica ou de DNA (a 4°C).
- Precipitar o RNA da fase aquosa através da adição de isopropanol. Utilizar 0.5 ml de isopropanol por cada ml de "Trizol" usado inicialmente.
- *Misturar* (invertendo os tubos por 30 segundos)
- Incubar as amostras entre 15 a 30 °C (RT) durante 10 minutos.
- Centrifugar a 12 000g por 10 minutos, entre 2 e 8 °C (*marcar o lado do tubo que fica para fora*).

Nota: O precipitado (*pellet*) de RNA, muitas vezes invisível antes da centrifugação, forma um precipitado semelhante a gel na parede e fundo do tubo.

2.5 Lavagem do RNA

- Remover o sobrenadante.
- Lavar o RNA uma vez com etanol a 75% em água DEPC (*só pôr o etanol 75% e depois vortexar*), adicionando pelo menos 1 ml de etanol para cada ml de Trizol utilizado na homogeneização.
- Inverter os tubos delicadamente
- Centrifugar a 7500 g, 5 minutos, entre 2 e 8 °C.

2.6 Redissolução do RNA

- Retirar o máximo do sobrenadante
- Fazer um quickspin e retirar todo o resto do sobrenadante sem trazer o pellet.
- Deixar os tubos abertos (5 a 10 min.) para secagem do pellet de RNA.

Nota: Não secar através de centrifugação em vácuo! Não deixar secar totalmente o pellet, pois a sua solubilidade irá decrescer significativamente. As amostras dissolvidas parcialmente têm um *ratio* ($A_{260/280}$) < 1.6.

- Dissolver o RNA em água DEPC 0.01% (ou RNA Storage Solution) utilizando 40ul e pipetando a solução várias vezes.
- Incubar por 10 minutos entre 55 e 60 °C (estufa).
- Determinar a concentração da solução obtida no Nanodrop (utilizar 1ul da amostra).

3. Inativação do DNA

Fazer as contas para se utilizar 1,5ug-2ug RNA, volume final de reação 10uL

Adicionar x uL RNA

1uL RQ1 Dnase tampão (DNase e DNase buffers- caixa que diz "RNA" 2ª gaveta -20°C PCR)

1uL RQ1 Dnase

Completar com H2O DEPC até 10uL.

Incubar 30' a 37°C // 4°C pausa

Inativar a Dnase, adicionando 1uL Dnase stop solution

Incubar 10' a 65°C // 4°C pausa

4. Síntese de cDNA (seguir o protocolo do kit)

5. Síntese de cDNA alternativa

Adicionar 5uL oligodts + 3uL H2O (o que falta para no final se obter 30uL cDNA)

Incubar 5' a 70°C // 4°C pausa

Adicionar 6uL Buffer MMLV

5uL dNTPs

0,63 Rnasin (caixa que diz "RNA" 2ª gaveta -20°C PCR)

1uL MMLV

Incubar 1 hora 37°C // 15' a 65°C // 4°C pausa

Extração do DNA

Retirar toda a fase aquosa que contém RNA e descartar. Remover, com cuidado, a fase intermédia, esbranquiçada, que contém o DNA para um novo tubo.

Adicionar 300uL de ETOH absoluto, misturar por inversão e deixar repousar 5' a RT.

Centrifugar 5' a 2000g e a 4°C. Descartar o SN e guardar o pellet.

Adicionar 1mL de citrato de sódio 0,1M com 10% de ETOH e dissolver o pellet com a pipeta. Colocar as amostras num agitador orbital durante 30' – 2hrs. Centrifugar 5' a 2000g e a 4°C. Descartar o SN e lavar novamente com o citrato de sódio.

Adicionar 1mL de ETOH 80%, vortexar ligeiramente e centrifugar 5' a 2000g e a 4°C. Descartar o SN e deixar secar o pellet a RT (ou 3' estufa a 60°C).

Adicionar 30uL de H₂O nuclease-free e dissolver o pellet. Medir no nanodrop a concentração. Guardar a -20°C.

3.2. Extração das Proteínas *MW (guanidin-HCl) = 95.53

À fase orgânica avermelhada que sobrou, adicionar 1mL isopropanol, misturar por inversão e deixar repousar 10' a RT. Centrifugar 10' a 12000g, 4°C. Descartar o SN e lavar o pellet 3 vezes:

Adicionar 1mL de 0,3M "guanidin-HCl" em 95% de ETOH. Misturar por inversão e deixar repousar 20' a RT. Centrifugar 5' a 7500g, 4°C. Descartar o SN. (**)

(**)Note: Protein samples suspended in 0.3 M guanidine hydrochloride/95% ethanol solution or 100% ethanol can be stored for 1 month at 2–8 °C or 1 year at –20 °C.

Adicionar 1mL de ETOH absoluto e vortexar o pellet. Repousar 20' a RT. Centrifugar 5' a 7500g, 4°C. Descartar o SN e secar o pellet o speed vacum por 10'.

Dissolver o pellet em 30uL de SDS 1% e centrifugar 1000g 10' 4°C. Retirar o SN para um novo tubo e guardar a -20°C. Quantificar pelo método de Bradford.

8.6 Procedimento operacional padronizado para infecção experimental por alimentação artificial através de membrana por anofelinos



Anexo 8.6 Procedimento Operacional Padrão

Centro de Entomologia

Projeto: Resposta imune inata de Anofelinos vetores de malária na Amazônia à infecção pelo *Plasmodium*.

Título: Infecção Experimental em Anofelinos

Elaborado por: Keillen Monick e Rosa Amélia

Revisado por: Henrique Silveira

1. Procedimentos

1.1 Recursos necessários

1.1.1 Condições Gerais do Experimento

- O experimento de infecção experimental deverá ocorrer a 37°C.
- Pode-se utilizar membrana sintética (Ex.: parafilme).
- O tubo com sangue e parasitos deverá permanecer em temperatura de 37°C

1.1.2 Materiais

1. Caixa de Isopor
2. Tubo com Heparina - 10ml para a coleta de sangue
3. Sangue (com parasitos)
4. Pipetas Pasteur (Plástico ou vidro)
5. Micropipetas
6. Ponteiras (1000ul e 200ul)
7. Alimentadores artificiais
8. Parafilme (membrana sintética)
9. Papel toalha
10. Microtubos
11. Gaiolas com mosquitos Anopheles (ente 100 e 150 cada)

1.1.3 Equipamentos

1. Banho Maria – Mantido a 37°C para o sangue parasitado.

Nota: No caso de inativar gametócitos, deve-se utilizar outro banho maria (geralmente o da sala 07) a uma temperatura de 43°C.

1.2 Insetos

- Separar (cerca de 100 ou 150 fêmeas) fêmeas de mosquitos com idade de 3 a 5 dias, mantidas apenas com solução açucarada a 10% (**retira-se o açúcar mais ou menos 24 horas antes da alimentação**);
- Acondicionar as fêmeas em potes ou copos apropriados para a infecção experimental.

Nota: A quantidade de mosquitos utilizada no grupo teste deverá ser a mesma a ser utilizada no grupo controle.

1.3 Sangue

1.3.1 Sangue Humano

Ao início do dia em que se fará a infecção deve-se entrar em contato com a pessoa responsável na gerência de Malária para avisar que neste dia irá precisar de amostras de sangue dos pacientes.

Ao chegar o paciente o mesmo será convidado a participar do estudo e após a assinatura do TCLE, poderá ser realizada a coleta do sangue.

O transporte do tubo com a amostra de sangue deverá ser feito utilizando uma caixa de isopor pequena. Ao chegar na Entomologia a amostra de sangue é dividida em outro tubo heparinizado, uma parte segue para o banho maria a 37°C (grupo teste importante controlar a temperatura) e a segunda segue para o banho maria a 43°C por 15 minutos (importante controlar a temperatura), para inativação dos gametócitos, esta segunda amostra será utilizada como controle.

1.4 Membrana

1.4.1 Parafilme

- O parafilme deverá ser cortado em tamanho de 5cmX5cm e esticado de modo que cubra a superfície do alimentador que deverá se manter fixo em cima das gaiolas para que o mosquito possa realizar o repasto sanguíneo.

1.5 Alimentação Artificial

- O sistema de infecção experimental consiste em um Banho Maria a 37°C e um sistema de circulação de água ligado ao alimentador artificial.
- O sangue contendo os parasitos é colocado no alimentador artificial previamente montado com a membrana de parafilme e então colocado sobre o pote que contém os insetos.
- O tempo mínimo da infecção experimental é de 30 minutos (máximo por duas horas). Após este período, as gaiolas de mosquitos são acondicionadas nas estantes da sala de infecção e mantidos com solução açucarada a 10% (se for o caso utilizar solução açucarada + PABA).
- Após 24 horas, os mosquitos alimentados deverão ser separados dos alimentandos, os alimentados deverão permanecer na sala de infecção até o momento da dissecação.

Obs: para não ser preciso manusear as fêmeas que se alimentaram apenas serão retiradas as fêmeas que não se alimentaram (importante para o momento de dissecação, não interferindo nos resultados de taxa de infecção). SÓ SE NÃO FOR PRECISO DETERMINAR TAXAS DE INFECÇÃO.

1.6 Biossegurança

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança, obrigatoriamente em salas com cortinas de ar ligadas.

.2. REFERÊNCIAS

1. Adegas MG, Barroso-Krause C, Lima JBP, Valle D. Parâmetros de biossegurança para Insetários e infectórios de vetores (Aplicação e adaptação das normas gerais para laboratórios definidas pela Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz). 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Diretoria do Instituto Oswaldo Cruz, 64pp, 2005. v. 1. 64pp.
2. Filho BP, Lemos FJ, Secundino NF, Páscoa V, Pereira ST, Pimenta PF. 2002. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*. a chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochem Mol Biol.* 32(12):1723-9.
3. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL. 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med.* 16;188(10):1941-53.

4. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO de Infecção Experimental de Anofelinos. Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/Fiocruz), Minas Gerais.