

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL DO *Aedes aegypti* NO
DESENVOLVIMENTO ESPOROGÔNICO DO *Plasmodium gallinaceum*

Por

Alessandra da Silva Orfanó

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2012

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL DO *Aedes aegypti* NO
DESENVOLVIMENTO ESPOROGÔNICO DO *Plasmodium gallinaceum*

Por

Alessandra da Silva Orfanó

Dissertação apresentada com vistas à obtenção
do Título de Mestre em Ciências na área de
Concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Belo Horizonte
Fevereiro/ 2012

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

O67a Orfanó, Alessandra da Silva.
2012

Avaliação do papel da microbiota intestinal do *Aedes aegypti* no desenvolvimento esporogônico do *Plasmodium gallinaceum* / Alessandra da Silva Orfanó. – Belo Horizonte, 2012.

xvii, 62 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 70 – 79

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Malária/transmissão 2. *Aedes*/parasitologia 3. Infecção/imunologia I. Título. II. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL DO *Aedes aegypti* NO
DESENVOLVIMENTO ESPOROGÔNICO DO *Plasmodium gallinaceum*

Por

Alessandra da Silva Orfanó

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Presidente)
Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira
Prof. Dr. Francisco José Alves Lemos
Suplente: Prof. Dr. Breno de Melo Silva

Dissertação defendida e aprovada em: 17/02/2012

*"Antes que você possa alcançar o topo de uma árvore
e entender os brotos e as flores,
você terá de ir fundo nas raízes,
porque o segredo está lá.
E, quanto mais fundo vão as raízes,
mais alto vai à árvore".*

Nietzsche

*"A dificuldade em se vencer um desafio vem
da maneira que você olha para ele. Olhe
sempre com olhos de um gigante."*

Yuri Lacerda

Agradecimentos

Nesse momento, tenho uma ou não mais que duas páginas para tentar expressar o meu muito obrigado às pessoas que me ajudaram a construir esses últimos dois anos da minha vida profissional.

Às vezes sinto que esses dois anos foram cinco, pelo conhecimento adquirido, amadurecimento com as dificuldades, experiências vividas, desafios, alegrias. E o que mais aprendi é que ciência é paciência e isso para mim foi uma tarefa árdua, afinal pedir a alguém que anda/corre de um lado para o outro como se o mundo fosse acabar entender o significado de “esperar” não é tão fácil assim.

Em primeiro lugar queria agradecer a Deus, não por clichê, de jeito nenhum. Não preciso explicar toda a história da criação para que você, leitor, entenda que, sem Deus, eu não estaria aqui. Mas meu agradecimento vai além desse simples fato. Quando eu não acreditava mais em mim, Ele continuou acreditando. E olha que eu dei milhões de motivos para que Ele desistisse de mim, mas Ele continuou. Obrigada, Deus.

À família, coisa mais importante que podemos ter e que são os responsáveis pelo que eu sou hoje! Pai, mãe, irmão obrigada pelo apoio, incentivo, brigas, puxões de orelha, alegrias, por tentarem entender as minhas horas na frente do computador e a minha ausência e por sempre me mostrarem que vale a pena insistir no que acreditamos! Vocês não sabem o quanto são importantes!

À minha vovó coruja que sempre torceu por mim em todas as etapas da minha vida!

Ao meu orientador, Dr. Paulo Pimenta, por todo incentivo, confiança, por todas as oportunidades, conversas, discussões, pela liberdade que me deu no desenvolvimento desse trabalho, pela paciência com a minha teimosia, pela incansável disposição em ajudar, por acreditar em mim e me ensinar a ser uma cientista (acho que estou no caminho certo), só tenho a dizer obrigada mais uma vez! Minha admiração e respeito.

À Dr^a Nágila Secundino, por toda a ajuda, disponibilidade e boa vontade quando a solicitei.

À Dr^a Ana Paula Duarte por me ensinar os primeiros experimentos de biologia molecular e me fazer acreditar que çmisturar “aguinhas” significa muito mais que o simples ato.

À Marcelé Rocha, “tchuca” que me ensinou a trabalhar com malária aviária e me deu todas as dicas para uma boa infecção, além de todas as discussões sobre experimentos e amizade.

À Dr^a Vanessa Freitas, Vanessão, Vanessapédia, pela ajuda nas dissecções, por sempre ler e corrigir projetos e relatórios, pela amizade e conselhos.

Ao Bruno Guedes, marmota que me ajudou em tantos experimentos e sempre com boa vontade.

À Dr^a Helena Rocha, ou melhor, Heleninha, por toda a ajuda nos experimentos de padronização do Real-time.

Ao Flávio Júnior, meu companheiro de modelo de estudo, por sempre me tirar do sufoco quando precisava de alguma ave infectada e por todas as nossas descontraídas conversas.

À Junara Coelho pela amizade e grande ajuda quando solicitada.

À Roberta Félix, Jequeline e Marcílio pelo suporte e por estarem sempre de prontidão a me ajudar e ouvir todas as minhas reclamações.

Ao meu grande amigo Luís Eduardo Martinez, que junto comigo forma o Time Malária, e apesar do pouco tempo já faz parte da minha vida, obrigada por todas as discussões científicas, incentivo, por me mostrar que sou capaz, por todos os conselhos e pelos momentos divertidos!

À Carol Cunha, linda que me diverte tanto, que entrou nessa jornada comigo e me permitiu dividir cada alegria e cada angústia nesses anos, obrigada por deixar compartilhar as emoções, que foram muitas não é mesmo, afinal a vida sem essas tais emoções não teria graça e que venha tantas mais no doutorado, é muito bom saber que posso contar com você!

À sociedade do Anel (Ana Paula, Carol Cunha, Bruno, Fernanda, Izabela, Junara, Marcelle, Paula, Rafa, Vanessa) e todos os agregados pelos ótimos momentos no CDF e em outras ocasiões, vocês fizeram tudo caminhar mais fácil!

A todos os colegas que pertencem ou já pertenceram ao Laboratório de Entomologia Médica (Ana Bahia, Ana Carolina, Ana Cristina, Ana Flávia, Ana Paula, Andrezza, Bárbara, Belinha, Breno, Bruna, Bruno, Caroline, Carol Cunha, Carol Dantas, Cláudia, Cris, Dani Zile, Erika, Felipe, Fernanda Gambogi, Fernanda Rezende, Grace, Gustavo Martins, Gustavo Freitas, Helena, Igor Castro, Igor Soares, Izabela Barros, Izabela Ibrahim, Janes, Jequeline, Juliana, Junara, Klívia, Kênia, Lili, Luís Eduardo, Luciana, Luiza, Maira, Marcelle, Marcílio, Maria Angélica, Neide, Paula, Pollyana, Sabrina, Rafael Gonçalves, Rafael Pimenta, Rafael Ramiro, Roberta e Tati) pela convivência durante esses anos.

As amigas da PUC Juliana, Ana Flávia, Fernanda, Klívia, Layla e Camilinha por fazerem parte da minha vida.

À toda turma de mestrado de 2010 pelo convívio durante esse tempo, e a todos os alunos do curso pelas horas de descontração com os nossos Encontrões!

À plataforma de sequenciamento de DNA (PDTIS –FIOCRUZ).

Ao Jaci, Moisés, Thiago e a todo o pessoal do biotério pelas horas de trabalho disponibilizadas para que esse estudo pudesse ser realizado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ), além das secretárias Andréia e Cristiane pela oportunidade e auxílio recebido.

Ao Dr. Breno de Mello Silva, Dr. Francisco José Alves Lemos e Dr. Luciano Andrade Moreira por aceitarem participar da banca examinadora.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz pelo apoio estrutural e financeiro.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas e símbolos	xiv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
1. Introdução	18
1.1 Aspectos gerais da biologia do <i>Aedes aegypti</i>	18
1.2 Aspectos gerais da Malária.....	19
1.3 Ciclo da Malária.....	21
1.4 Malária experimental	23
1.5 Aparelho digestivo dos mosquitos.....	23
1.6 Sistema imune em mosquitos.....	25
1.6.1 Peptídeos Antimicrobianos (AMPs).....	28
1.7 Bactérias simbiotes.....	29
2 Objetivos	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 Materiais e Métodos.....	32
3.1 Manutenção da cepa <i>P. gallinaceum</i>	32
3.2 Obtenção e manutenção dos mosquitos	32
3.3 Tratamento dos mosquitos com antibiótico	33
3.4 Infecção dos mosquitos.....	33
3.5 Dissecção dos intestinos dos mosquitos.....	33
3.6 Análise estatística	34
3.7 Plaqueamento das amostras	34
3.8 Isolamento e estocagem das bactérias intestinais de <i>A. aegypti</i>	34
3.9 Extração de DNA genômico.....	35
3.10 Amplificação do gene 16S DNAr	35

3.11 Eletroforese de DNA.....	36
3.12 Purificação dos produtos da PCR.....	36
3.13 Reação de sequenciamento do gene 16S.....	36
3.14 Alinhamento das sequências	37
3.15 Análises da expressão gênica do mosquito	37
3.16 Extração de RNA	38
3.17 Tratamento do RNA com DNase	38
3.18 Síntese de cDNA	39
3.19 Reação da polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) utilizando o método comparativo.....	39
3.20 Reação da polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) utilizando o método da curva padrão	40
4 Resultados.....	42
4.1 Crescimento bacteriano diferencial após o plaqueamento dos intestinos	42
4.2 Isolamento e identificação das bactérias presentes no intestino de <i>A. aegypti</i>	45
4.3 Efeito do tratamento com antibióticos na infecção por <i>P. gallinaceum</i>	48
4.4 Quantificação do DNA bacteriano Total	53
4.5 Análises da expressão dos genes de peptídeos antimicrobianos no <i>A. aegypti</i>	54
5 Discussão.....	61
5.1 Isolamento e identificação da microbiota intestinal de <i>A. aegypti</i>	61
5.2 Análise do impacto da administração de antibióticos na infecção de <i>A. aegypti</i> por <i>P. gallinaceum</i>	63
5.3 Análise do perfil de expressão de AMPs	66
6 Conclusões	69

Lista de figuras

Figura 1: Áreas de risco de malária no mundo em 2009. Fonte: WHO (2010).....	20
Figura 2: Distribuição geográfica de casos confirmados de malária por 1000 hab. em 2009. Fonte: WHO (2010)	20
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp. Fonte: Su et al (2007).....	22
Figura 4: Esquema da anatomia interna dos mosquitos. Fonte: modificado de Jobling (1987).	24
Figura 5: Desenho esquemático da resposta imune em insetos. Fonte: Beckage (2008).	26
Figura 6: Perda de parasitos ao longo da infecção no inseto e hospedeiro vertebrado. Fonte: Amino (não publicado). (mz: meozoíto; tz: trofozoíto; ez: esquizonte; gcm: gametócito masculino; gcf: gametócito feminino; zg: zigoto; ook: oocineto; ooc: oocisto; sz int: esporozoítos no intestino; sz gs: esporozoíto na glândula salivar; mz hep: merozoítos no hepatócito; *: tubo digestivo; #: glândula salivar; ^ : eritrócitos).....	27
Figura 7: Crescimento bacteriano após a incubação do macerado de intestinos. (A) Crescimento de bactérias no intestino não tratado concentrado. (B) Crescimento de bactérias no intestino não tratado diluído 10X. (C) Crescimento de bactérias no intestino tratado com gentamicina concentrado. (D) Crescimento de bactérias no intestino tratado com gentamicina diluído 10X. (E) Crescimento de bactérias no intestino não tratado concentrado (1X). (F) Crescimento de bactérias no intestino tratado com tetraciclina concentrado (1X). (G) Crescimento de bactérias no intestino não tratado diluído 10X. (H) Crescimento de bactérias no intestino tratado com tetraciclina diluído 10X.....	43
Figura 8: Crescimento bacteriano após a incubação do macerado de intestinos. (A) Crescimento de bactérias no intestino tratado com espectinomicina concentrado (1X). (B) Crescimento de bactérias no intestino tratado com espectinomicina diluído 10X. (C) Crescimento de bactérias no intestino tratado com carbenicilina concentrado (1X). (D) Crescimento de bactérias no intestino tratado com carbenicilina diluído 10X. (E) Crescimento de bactérias no intestino tratado com canamicina concentrado (1X). (F) Crescimento de bactérias no intestino tratado com canamicina diluído 10X.	44
Figura 9: Visualização da banda de 1500pb do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos do intestino de <i>A. aegypti</i>	45
Figura 10: Porcentagem dos isolados bacterianos classificados em filos.	46

Figura 11: Efeito do tratamento com gentamicina na infecção do <i>A. aegypti</i> por <i>P. gallinaceum</i> . Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito.....	49
Figura 12: Efeito do tratamento com espectinomicina na infecção do <i>A. aegypti</i> por <i>P. gallinaceum</i> . Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito.....	49
Figura 13: Efeito do tratamento com tetraciclina na infecção do <i>A. aegypti</i> por <i>P. gallinaceum</i> . Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito.....	50
Figura 14: Efeito do tratamento com canamicina na infecção do <i>A. aegypti</i> por <i>P. gallinaceum</i> . Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito. (***) = $P < 0,0001$).	51
Figura 15: Efeito do tratamento com carbenicilina na infecção do <i>A. aegypti</i> por <i>P. gallinaceum</i> . Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito. (***) = $P < 0,0001$).	51
Figura 16: Efeito do tratamento com mistura de carbenicilina e canamicina na infecção do <i>A. aegypti</i> por <i>P. gallinaceum</i> . Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito.....	52
Figura 17: Quantidade total de DNA bacteriano no intestino dos insetos. O teste Mann Whitney foi utilizado (* = $P > 0,05$).....	53
Figura 18: Níveis de mRNA de defensina em mosquitos inteiros alimentados com açúcar tratados (KNSF, CBSF) e não tratados (SF-Ctr). $P = 0,01$ quando testado por One-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey.	54
Figura 19: Perfil de expressão de defensina em insetos inteiros infectados (BFI-Ctr, KNBFI) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***) = $p < 0,001$)....	55
Figura 20: Perfil de expressão de defensina em insetos não infectados (BF-Ctr, KNBF) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***) = $p < 0,001$)....	56
Figura 21: Níveis de mRNA de gambicina em mosquitos inteiros alimentados com açúcar tratados (KNSF, CBSF) e não tratados(SF-Ctr). Teste One-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey. (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,03$; *** = $P < 0,0001$).....	56
Figura 22: Perfil de expressão gambicina em insetos inteiros infectados (BFI-Ctr, KNBFI) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***) = $p < 0,001$)....	57
Figura 23: Perfil de expressão de gambicina em insetos não infectados (BF-Ctr, KNBF) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (* = $P < 0,05$; *** = $p < 0,001$).	58
Figura 24: Perfil de expressão defensina em insetos inteiros infectados (BFI-Ctr, CBBFI) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***) = $p < 0,001$).	59

Figura 25: Perfil de expressão de gambicina em insetos não infectados (BF-Ctr, KNBF) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***= $p < 0,001$).59

Figura 26: Perfil de expressão gambicina em insetos inteiros infectados (BFI-Ctr, CBBFI) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (*= $P < 0,05$; ***= $p < 0,001$). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 27: Perfil de expressão de gambicina em insetos não infectados (BF-Ctr, KNBF) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***= $p < 0,001$). . **Erro! Indicador não definido.**

Lista de tabelas

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR em tempo Real.	39
Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR em tempo Real..	41
Tabela 3: Estimativa das UFCs do intestino de <i>A. aegypti</i> antes e após o tratamento com antibióticos.....	42
Tabela 4: Identificação dos isolados bacterianos de acordo com o banco de dados GenBank.	47

Lista de abreviaturas e símbolos

- AMP = peptídeos antimicrobianos (*antimicrobial peptides*)
- BF-Ctr = controle alimentado com sangue (*normal blood fed control group*)
- BFI = alimentado com sangue infectado (*blood fed infected group*)
- CBSF= tratado com carbenicilina alimentado com açúcar (*carbenicilin treated sugar fed group*)
- CBBF= tratado com carbenicilina alimentado com sangue (*carbenicilin treated normal blood fed group*)
- CBBFI= tratado com carbenicilina alimentado com sangue infectado (*carbenicilin treated blood fed infected group*)
- Ct = limiar do ciclo (*cycle threshold*)
- cDNA = DNA complementar
- DEPC = Dietil-pirocarbonato
- DNA = ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- DNAr = ácido desoxirribonucleico ribossomal (*ribosomal deoxyribonucleic acid*)
- dNTP = desoxirribonucleotídeos fosfatados (*deoxynucleotide triphosphates*)
- EDTA = ácido etileno diamono tetracético
- Est = estimado
- G = constante gravitacional
- GNBP = proteínas que se ligam a bactérias Gram-negativas (*Gram-negative bacteria-binding proteins*)
- HCl = ácido clorídrico
- Imd = deficiência immune (*Immune Deficiency*)
- KNSF= tratado com canamicina alimentado com açúcar (*kanamicin treated sugar fed group*)
- KNBF= tratado com canamicina alimentado com sangue (*kanamicin treated normal blood fed group*)
- KNBFI= tratado com canamicina alimentado com sangue infectado (*kanamicin treated blood fed infected group*)
- LPS = lipopolisacáride (*Lipopolysaccharide*)
- MgCl₂ = cloreto de magnésio
- MgSO₄ = sulfato de magnésio

ml = mililitro

mM = milimolar

M-MLV = vírus da leucemia de murinos Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus*)

nM = nanomolar

PAMP = padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern*)

Pb = pares de base

PBS = Tampão fosfato salina (*Phosphate buffer saline*)

PCA = ágar padrão para contagem (*Plate count agar*)

PCR = reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PGRP = proteínas que reconhecem peptidoglicanos (*peptidoglycan recognition proteins*)

pH = Potencial de Hidrogênio

pmol = picomol

PRR = receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptor*)

qPCR = PCR quantitativo (*quantitative pcr*)

RNA = ácido desoxirribonucléico (*ribonucleic acid*)

Rpm = rotações por minuto

SF-Ctr = controle não tratado alimentado com açúcar (*sugar fed non-treated control group*)

TBE = tampão Tris-Borato-EDTA

UFC = unidades formadoras de colônia (*colony forming units*)

V = volts

v/v = volume por volume

°C = graus Celsius

Δ Ct = variação do limiar do ciclo

μ g = microlitro

Resumo

A malária é responsável por cerca de 350 a 500 milhões de casos clínicos anuais, permanecendo como um dos maiores problemas de saúde mundial. Estudos sobre a influência da microbiota intestinal do vetor no desenvolvimento do ciclo de vida dos parasitos vêm sendo desenvolvidos. Em mosquitos, as pesquisas vêm mostrando que infecções por bactérias do intestino podem inibir o desenvolvimento esporogônico dos parasitos da malária. No presente trabalho, o papel da microbiota intestinal do *Aedes aegypti* infectado com *Plasmodium gallinaceum* foi avaliado. Os insetos foram submetidos a cinco diferentes antibióticos (canamicina, carbenicilina, espectinomicina, gentamicina e tetraciclina). Somente canamicina e carbenicilina tiveram efeito sob a infecção com o parasito. Para esses dois antibióticos e o controle, técnicas de cultivo bacteriano de isolamento e sequenciamento do DNA ribossomal 16S foram feitas. *Asaia bogorensis*, *Asaia krungthepensis*, *Asaia siamensis*, *Bacillus licheniformis* e *Chryseobacterium meningosepticum* foram identificadas para o grupo controle. No grupo tratado com carbenicilina foram identificadas *Chryseobacterium meningosepticum* e uma bactéria da família *Microbacteriaceae*, e para o grupo com canamicina *Microbacterium lacticum*. Este trabalho sugere que a interação entre espécies de *Asaia* e *C. meningosepticum* são relevantes na resistência/suscetibilidade do *A. aegypti* ao *P. gallinaceum*. Para observar o efeito do tratamento com os dois antibióticos que mostraram efeito na infecção na expressão de peptídeos antimicrobianos, os níveis de gambicina e defensina foram medidos utilizando-se a técnica de *Real-time* PCR. Os níveis de defensina se mostraram super-expressos quando os mosquitos foram submetidos aos tratamentos com canamicina e carbenicilina, enquanto gambicina se mostrou super-expressa nos mosquitos tratados com canamicina e sub-expressa naqueles com carbenicilina. A expressão desses dois AMPs também foi medida quando esses grupos de insetos se alimentaram com sangue e com sangue infectado. Nossos resultados mostraram que a expressão de defensina e gambicina no grupo tratado com carbenicilina alimentado com sangue apresentou um aumento de 24h para 36h, e uma queda no grupo controle alimentado com sangue. Insetos tratados com canamicina infectados aumentaram a expressão de defensina 24h e 36h após a alimentação, diminuídas nos tratados com carbenicilina. É observada uma inibição do mRNA de gambicina no grupo carbenicilina infectado sugerindo assim que a ativação desse peptídeo não ocorre somente pelo parasita e necessita da ação da microbiota. Estes resultados indicam que as bactérias associadas ao intestino do *A. aegypti* tem um papel importante na infecção e resposta imune ao parasito.

Abstract

Malaria is responsible for about 350 to 500 million clinical cases annually, remaining as one of the largest health problems worldwide. Studies on the influence of the vector gut microbiota in the life cycle of the parasites are being performed. In mosquitoes, studies have shown that infection with midgut microbiota may inhibit the sporogonic development of malaria parasites. Here, the role of intestinal microbiota of *Aedes aegypti* infected with *Plasmodium gallinaceum* was assessed. The insects were subjected to five different antibiotics (kanamycin, carbenicillin, spectinomycin, gentamicin and tetracycline). Only kanamycin and carbenicillin had effect over the infection process. The response of treated groups and control was analyzed by: bacterial culture techniques of isolation and sequencing of 16S ribosomal DNA. *Asaia bogorensis*, *Asaia krungthepensis*, *Asaia siamensis*, *Bacillus licheniformis* and *Chryseobacterium meningosepticum* were identified for the control group. In the carbenicillin treated group *Chryseobacterium meningosepticum* and *Microbacteriaceae* family bacterium were identified. In the kanamycin treated group *Lacticum microbacterium* was found. This work suggests that the interaction between *C. meningosepticum* and *Asaia* species is relevant in the resistance/susceptibility balance in the *A. aegypti*/*P. gallinaceum* model. To observe the effect of treatment over the expression of antimicrobial peptides, gambicin and defensin levels were measured by Real-time PCR. Levels of defensin proved to be up-regulated when the mosquitoes were subjected to treatment with kanamycin and carbenicillin. Gambicin levels were be up-regulated in mosquitoes treated with kanamycin and down-regulated in those treated with carbenicillin. The expression of these two AMPs was also measured when these groups of insects were fed with blood and infected blood. Our results showed that the expression of defensin and gambicin in carbenicillin treated blood fed group increased between 24 to 36 hours, and decreased in the blood fed control group. Infected insects treated with kanamycin increased the expression of defensin between 24 to 36 hours after feeding, while it decreased in those treated with carbenicillin. An inhibition in the expression of gambicin in the infected group treated with carbenicillin was observed, suggesting that activation of these peptides does not occur only by the parasite, or microbial action, but by both. These results indicate that the microbiota associated with *A. aegypti* has an important role in infection and immune response to the parasite.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da biologia do *Aedes aegypti*

Os mosquitos são insetos dípteros, da Subordem Nematocera, da família Culicidae, da subfamília Culicinae. São conhecidos também como pernilongos, muriçocas e carapanãs. A subfamília Culicinae é a maior da família Culicidae e o gênero *Aedes* é o principal representante dessa subfamília, sendo o *Aedes aegypti* um vetor de grande importância na transmissão de dengue e febre amarela (Consoli & Oliveira, 1994; Foratini, 2002).

Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e na grande maioria são hematófagos, enquanto as fases imaturas são de vida livre, vivendo no ambiente aquático. Seu ciclo biológico compreende as fases de ovo, larvas, pupa e adulto. Na fase de pupa, ocorre a metamorfose no mosquito, e durante essa fase, o inseto não se alimenta, e se transforma no adulto, o qual por sua vez possui aparelho bucal picador-sugador, tem asas, pernas e genitálias completamente formadas (Consoli & Oliveira, 1994; Foratini, 2002). Seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como os olhos, as antenas e os palpos. No tórax estão os apêndices especializados na locomoção, como as pernas e as asas. O abdome inclui a maior parte dos órgãos internos do aparelho reprodutor, digestivo e excretor (Consoli & Oliveira, 1994).

A grande maioria dos mosquitos depende da ingestão de carboidratos, usualmente provenientes de seivas, flores e frutos. Somente as fêmeas dos mosquitos são hematófagas e o repasto sanguíneo está relacionado ao desenvolvimento dos ovos (Consoli & Oliveira, 1994). No momento do repasto sanguíneo, o mosquito injeta sua saliva no vertebrado, a qual pode conter patógenos.

Em 1881, Carlos Finlay, um médico cubano, identificou o *Aedes aegypti* como vetor de febre amarela. Atualmente, sabe-se que os insetos são capazes de transmitir uma ampla variedade de patógenos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Dengue e malária são consideradas as mais importantes causas de morbidade e mortalidade no mundo transmitidas por insetos (Tolle *et al.*, 2009, WHO, 2010).

1.2 Aspectos gerais da Malária

O termo malária, proveniente da expressão “mau ar”, teve sua origem na Itália, onde se acreditava que a causa da doença era os vapores vindos dos pântanos. A doença também é conhecida como paludismo, impaludismo, sezão, tremedeira e febre palustre (Garnham, 1966; Sherman, 1998a; Neves *et al.*, 2000). Os sintomas clássicos da malária são febre intensa, calafrios e sudorese. Os calafrios são frequentemente acompanhados por dor de cabeça, náuseas e fadiga. Nos casos mais graves, os pacientes podem apresentar complicações respiratórias e neurológicas, bem como intensa anemia e insuficiência renal. Os casos de malária cerebral são complicações raras observadas principalmente em crianças (Neves *et al.*, 2000; Augustine *et al.*, 2009).

Em relação às doenças infecciosas transmitidas por insetos, a malária é responsável por cerca de 350 a 500 milhões de casos clínicos anuais, permanecendo como um dos maiores problemas de saúde mundial, afetando a saúde e a economia, principalmente nas comunidades mais pobres do globo. Cerca de metade da população mundial está sob risco de contrair a doença, sobretudo crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas. Apesar do sucesso da erradicação da doença em diversos países, em 2009, a malária esteve presente em 108 países e territórios e estima-se que 655.000 pessoas morreram de malária em 2010 (Figura 1) (WHO, 2011), no entanto, um recente trabalho, (Murray *et al.*, 2012) demonstrou que esse número poderia ser pelo menos o dobro do estimado pela WHO.

No Brasil, a malária é um grave problema de saúde pública, e a predominância dos casos ocorre na área da Amazônia Legal, e segundo o Ministério da Saúde, em 2009, aproximadamente 97% dos casos de malária se concentraram nos sete estados da região amazônica: Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima (Figura 2) (MS, 2011).

Os agentes etiológicos da malária são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Em humanos, a doença pode ser causada por cinco espécies: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium knowlesi*. Os protozoários do gênero *Plasmodium* são transmitidos ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, família *Culicidae* (Consoli & Oliveira, 1998).

Dentre as espécies de *Plasmodium* que causam malária em humanos *P. falciparum* é o responsável pela doença mais severa, devido a sua capacidade de aderir ao epitélio dos capilares, podendo ocasionar falha renal aguda, malária cerebral e edema pulmonar. *P. vivax* é menos letal

1.3 Ciclo da Malária

O ciclo de vida do *Plasmodium* (Figura 3) é constituído por uma fase sexual exógena (esporogônica), na qual ocorre a multiplicação dos parasitos no mosquito e uma fase assexuada endógena (esquizogônica), onde ocorre a multiplicação no hospedeiro vertebrado em células parenquimatosas do fígado (esquizogonia hepática) ou nos eritrócitos (esquizogonia eritrocitária) (Sinnis & Coppi, 2007). Essa dinâmica do ciclo demonstra sua grande complexidade que está relacionada à habilidade do parasito em alterar suas características celulares e moleculares e em desenvolver-se nos ambientes intra e extracelular, tanto do hospedeiro vertebrado quanto do mosquito vetor.

Quando as fêmeas de mosquitos *Anopheles* picam um hospedeiro infectado elas ingerem, juntamente com o sangue, as formas gametocíticas do parasito. No lúmen do intestino, essas formas sofrem maturação e originam micro e macrogametócitos que, após a fecundação, formarão um zigoto diplóide (Sinden, 1999). O zigoto amadurece e diferencia-se em oocineto, uma forma móvel do parasito. Dependendo das espécies de *Plasmodium*, esse processo pode durar de 16 a 24 horas (Ghosh *et al.*, 2000; Dinglasan *et al.*, 2009). O oocineto atravessa a matriz peritrófica do intestino e atinge a parede do epitélio intestinal onde se transforma em oocisto. Para atravessar o epitélio, estudos demonstraram que dependendo do modelo utilizado, *A. aegypti* com *Plasmodium gallinaceum* ou *Anopheles stephensi* com *P. berghei*, esse processo de invasão ocorre de forma diferenciada (Shahabuddin & Pimenta 1998, Kumar *et al.*, 2004) e pode ou não induzir a expressão de óxido nítrico sintase (NOS) (Gupta *et al.*, 2005). Após 10 a 15 dias de incubação ocorre o rompimento do oocisto e a liberação de esporozoítos na hemolinfa (Hillyer *et al.*, 2007). Esses esporozoítos invadem a glândula salivar (Pimenta *et al.*, 1994) e podem ser transmitidos a um hospedeiro vertebrado pela picada do vetor. Após um repasto sanguíneo infectante, os esporozoítos liberados pelo mosquito alcançam a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, migram para células do fígado e atingem os hepatócitos, dando início assim ao ciclo exoeritrocítico (Meis & Verhave, 1988; Amino *et al.*, 2006). Uma vez dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após várias divisões por esquizogonia, formam os esquizontes. Krotoski e colaboradores (1982) descreveram que em *P. vivax* alguns esporozoítos podem permanecer latentes no hepatócito e eles seriam responsáveis pelos episódios de recaída tardia da doença. Essas formas latentes, denominadas hipnozoítos, são resistentes aos fármacos utilizados (Wells *et al.*, 2010) e representam um fator agravante no

controle da doença. No momento em que os esquizontes amadurecem, eles se rompem e liberam milhares de merozoítos, formas invasivas que parasitam as hemácias circulantes. Eles também podem ser encontrados em vesículas denominadas merossomos, capazes de transportar centenas de merozoítos para a corrente sanguínea e de protegê-los do ataque das células de Kupfer do fígado (Sturm *et al.*, 2006). Estudos recentes têm mostrado que em mamíferos roedores infectados com *Plasmodium berghei* aproximadamente 10% dos parasitos permanecem ativos na pele e são capazes de formar merossomos (Gueirard *et al.*, 2010). Após invadirem as hemácias, os merozoítos se desenvolvem em trofozoítos e estes dão origem a esquizontes por meio de múltiplas divisões nucleares. Novos merozoítos são formados no interior dos esquizontes e são liberados pela ruptura destes, dando início a uma nova etapa de invasões de eritrócitos e completando-se o ciclo assexuado do parasito (Miller *et al.*, 2002). Alguns merozoítos sanguíneos passam por um desenvolvimento diferencial resultando na formação de células sexuais especializadas, os gametócitos masculino (microgametócito) e o feminino (macrogametócito), que ao serem ingeridos pelos mosquitos seguirão seu desenvolvimento sexuado no vetor (Deepak *et al.*, 2004).

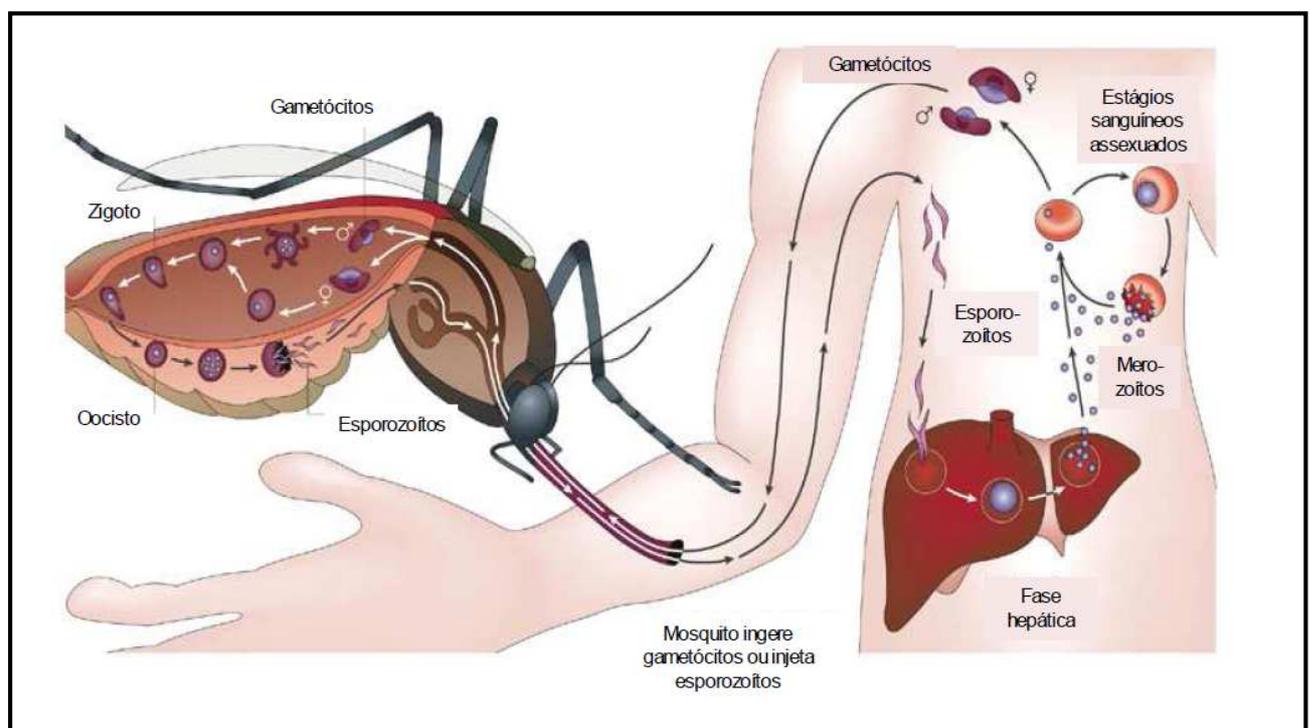


Figura 3: Ciclo de vida do Plasmodium spp. Fonte: Su *et al* (2007).

1.4 Malária experimental

A susceptibilidade dos mosquitos à invasão pelo *Plasmodium* é um fator determinante na eficiência dos vetores na transmissão da malária. Sabe-se que algumas espécies de mosquitos podem se infectar com a malária enquanto outros não, e que, dentro da mesma população de mosquitos, alguns são mais susceptíveis do que outros. Essa susceptibilidade depende de fatores genéticos como variação entre espécies e cepas da mesma espécie, fenotípicos tais como: tamanho do mosquito, digestão sanguínea e nutrição e fatores externos como, por exemplo: temperatura, umidade, inseticida e drogas (Ichimori, 1989).

A malária animal tem sido usada como modelo para estudos em laboratório. Contudo, para isso é necessário que se encontrem bons vetores experimentais para o parasito. Dessa forma, o *A. aegypti* é uma espécie utilizada na transmissão e manutenção do *P. gallinaceum* em laboratório, com um índice de susceptibilidade próximo a 100% (Ludsdem & Bertram, 1940; Eyles, 1951), resultando em um excelente sistema de interação parasita-hospedeiro para estudos de malária.

1.5 Aparelho digestivo dos mosquitos

O intestino dos mosquitos além de digerir e absorver nutrientes também atua como entrada de patógenos, sendo, portanto, o primeiro local de contato entre esses e o vetor. Composto por uma monocamada de células epiteliais que forma um tubo se estendendo da parte anterior até a porção posterior. É comumente dividido em 3 regiões: intestino anterior, médio e posterior (Figura 4).

O intestino anterior está envolvido principalmente com a ingestão, condução e armazenamento do alimento. O intestino médio é o local onde o sangue fica estocado e onde ocorre todo o processo digestivo. O intestino posterior é responsável por uma parte da absorção dos nutrientes e pela excreção das dejeções da alimentação (Graf *et al.*, 1986; Billingsley & Lehane, 1996).

No intestino médio, após a ingestão de sangue, as fêmeas de mosquitos darão início a vários eventos fisiológicos que resultarão na maturação dos ovócitos e posterior oviposição (Telang *et al.*, 2006). Essa ingestão de sangue torna o intestino um ambiente altamente nutritivo e propício ao crescimento de patógenos, sendo esse, portanto, o local de maior

vulnerabilidade dos vetores, uma vez que é desprovido de quitina devido a sua origem endodérmica possibilitando a invasão desses patógenos nas células epiteliais.

Para minimizar essa falta de quitina, os mosquitos após o estímulo da alimentação sanguínea, sintetizam a formação de uma matriz acelular constituída de quitina, proteínas e proteoglicanos que envolve o bolo de sangue ingerido, conhecida como matriz peritrófica (Ghosh *et al.*, 2000; Filho *et al.*, 2002; Devenport, Fujioka & Jacobs-Lorena, 2004).

Importantes fatores como fonte sanguínea, pH, situação nutricional e hormonal do hospedeiro (Nguu *et al.*, 1996; Feder *et al.*, 1997; Sinden & Billingsley, 2001), ação de enzimas digestivas (Kaplan *et al.*, 2001), receptores de superfície presentes no intestino (Wilkins & Billingsley, 2001), presença de bactérias simbiotes (Dale & Welburn, 2001) e a ativação de genes do sistema imune e peptídeos antimicrobianos (Dimopoulos *et al.*, 1998; Lehane *et al.*, 2003), podem influenciar a entrada de patógenos no aparelho digestivo.

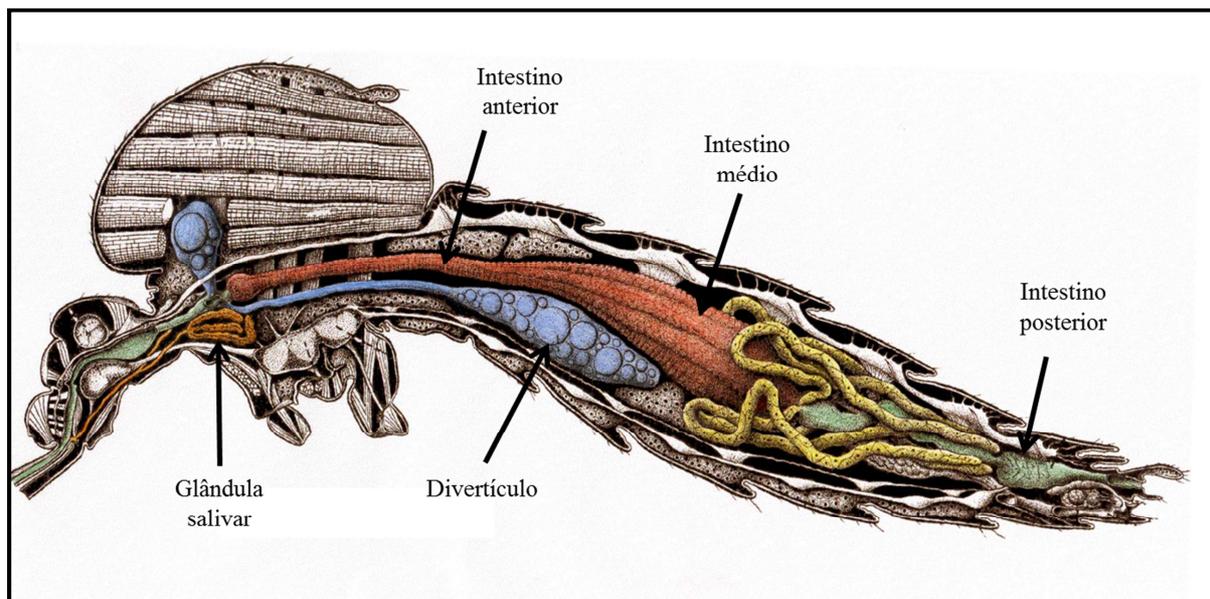


Figura 4: Esquema da anatomia interna dos mosquitos. Fonte: modificado de Jobling (1987).

1.6 Sistema imune em mosquitos

Os insetos são expostos a uma grande variedade de agentes infecciosos no ambiente em que vivem. Com o intuito de diminuir o risco de infecção a diferentes patógenos, os insetos, desenvolveram barreiras físicas e um mecanismo de defesa celular e humoral bem eficientes.

A primeira linha de defesa contra microrganismos são as barreiras físicas compostas pelo exoesqueleto, matriz peritrófica do intestino e um revestimento quitinoso da traquéia. O exoesqueleto protege os órgãos do inseto e a hemolinfa da exposição direta aos microrganismos do ambiente (Söderhäll and Cerenius, 1998; Theopold *et al.*, 2002). A matriz peritrófica é uma estrutura quitinosa que facilita a digestão além de proteger o epitélio intestinal do contato direto com o sangue e a flora microbiana que pode aumentar em até 16 vezes depois da alimentação sanguínea em alguns insetos hematófagos (DeMaio *et al.*, 1996; Pimenta *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 2001; Secundino *et al.*, 2005). Parasitas da malária desenvolveram um mecanismo específico de secreção de quitinase para atravessar a matriz peritrófica antes da invasão do epitélio intestinal do mosquito (Shahabuddin *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 2001).

Quando o patógeno escapa das barreiras físicas ele se depara ainda com um robusto sistema imune que apresenta uma capacidade de defesa humoral e celular direcionada a alvos específicos de uma variedade de micro-organismos e macroparasitas (Figura 5) (Richman & Kafatos, 1995). Respostas celulares como fagocitose, encapsulação celular e indução de apoptose também podem ser iniciadas através de interações inseto-patógeno, como ocorre na resposta imune humoral e ainda, uma reação de profenoloxidasas que depositam melanina em volta dos microrganismos (Horton & Ratcliffe, 2001; Kumar *et al.*, 2004; Michael & Kafatos, 2005; Molina-Cruz *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2010).

A imunidade humoral dos mosquitos pode ser dividida em quatro etapas: reconhecimento de moléculas não-próprias através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs); modulação, que leva à amplificação e distribuição do sinal de reconhecimento; ativação de um conjunto de moléculas efetoras (AMPs) e cascatas de coagulação; e reabastecimento das moléculas de imunidade pela ativação das vias de transdução de sinal como *Toll* e *Imd* (Michael & Kafatos, 2005; Christophides *et al.*, 2002).

PRRs reconhecem e se ligam a PAMPs. Os PAMPs são compartilhados por vários microrganismos, são essenciais para a fisiologia do micróbio e ausentes na maioria dos organismos superiores. Como exemplo de PAMPs tem-se peptidoglicanos,

lipopolissacarídeos (LPS), que são componentes das paredes e membranas de bactérias. Os PPRs mais bem estudados são as proteínas que reconhecem peptidoglicanos (PGRPs) e proteínas que se ligam a bactérias Gram negativas (GNBPs), eles podem estar ligados às células ou circulantes na hemolinfa (Osta *et al.*, 2004).

O reconhecimento do não próprio ativa a cascata proteolítica de serino proteases que amplificam o sinal e acionam a resposta efetora. Os componentes chave dessa cascata são serino proteases com domínio CLIPs, que ativam as vias de sinalização que levam à síntese de AMPs.

O tecido epitelial protege o inseto contra infecções atuando tanto como barreira física quanto por meio de sua competência imunológica produzindo componentes de defesa. A invasão do epitélio intestinal pelos oocinetos aumenta a expressão de muitos genes de imunidade (Dimopoulos *et al.*, 1997; 1998; Luckhart *et al.*, 1998, Bahia *et al.*, 2011). A glândula salivar juntamente com o corpo gorduroso é outro importante órgão imune que é capaz de produzir diferentes peptídeos de imunidade (Dimopoulos *et al.*, 1997; 1998; Richman *et al.*, 1997).

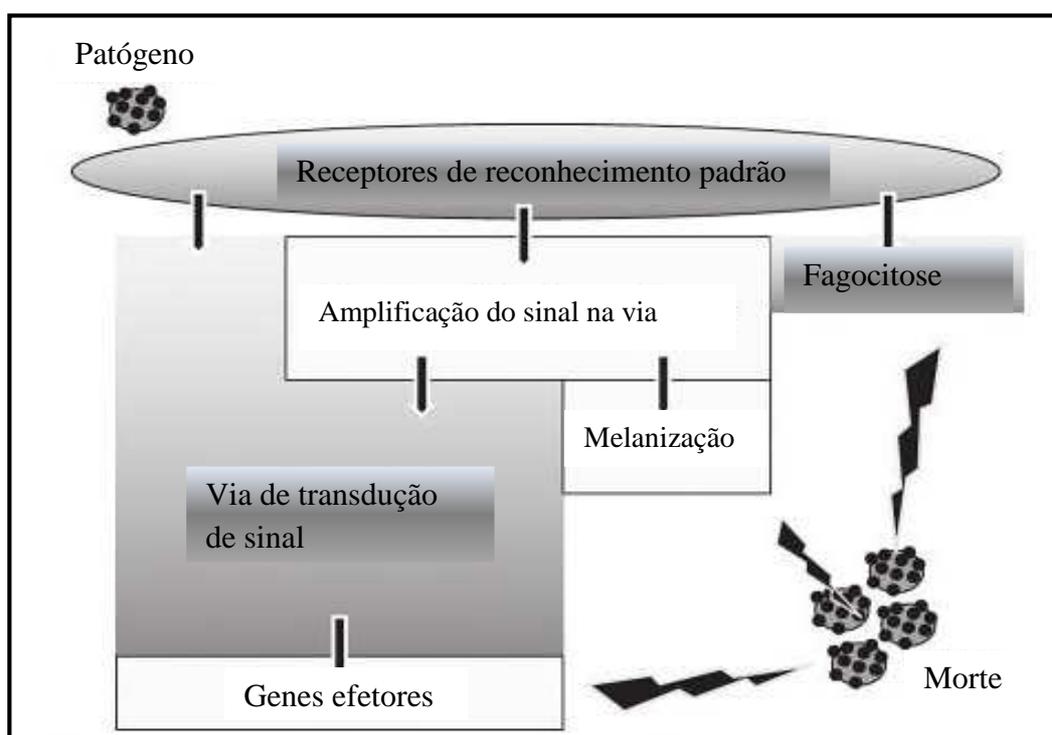


Figura 5: Desenho esquemático da resposta imune em insetos. Fonte: Beckage (2008).

Durante o desenvolvimento esporogônico, no caso do *Plasmodium*, um grande número de parasitos morre. Apenas um pequeno número de gametócitos que são ingeridos se

desenvolverá em oocinetos e desses, somente uma fração atingirá o estágio de oocisto (Figura 6). Nos estágios tardios de infecção, mais de 80% dos esporozoítos da hemocele são rapidamente eliminados (Korochkina *et al.*, 2006; Hillyer *et al.*, 2007). A magnitude dessa perda pode diferir entre infecções com diferentes parasitos e mosquitos (Beier, 1998; Ghosh *et al.*, 2000; Dimopoulos *et al.*, 2002b). A eliminação do *Plasmodium* no mosquito está relacionada ao sistema imune inato que é crucial para o sucesso na transmissão da malária (Luckhart *et al.*, 1998; Lowenberger *et al.*, 1999).

A reação humoral melhor caracterizada nos insetos é a produção de AMPs. Em geral, são pequenos, catiônicos e estruturalmente diversos, são secretados na hemolinfa após a invasão de um patógeno (Bulet *et al.*, 1999).

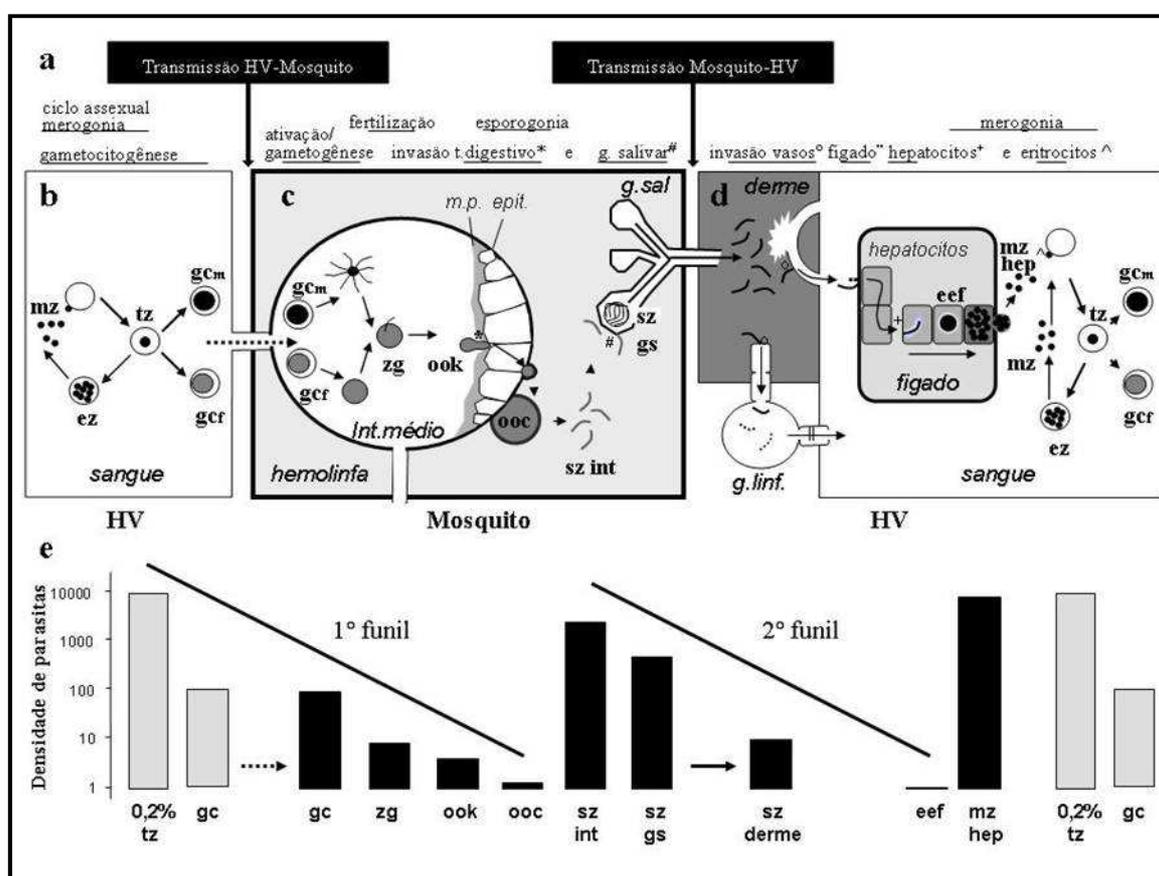


Figura 6: Perda de parasitos ao longo da infecção no inseto e hospedeiro vertebrado. Fonte: Amino (não publicado). (mz: meozoíto; tz: trofozoíto; ez: esquizonte; gcm: gametócito masculino; gcf: gametócito feminino; zg: zigoto; ook: oocineto; ooc: oocisto; sz int: esporozoítos no intestino; sz gs: esporozoíto na glândula salivar; mz hep: merozoítos no hepatócito; *: tubo digestivo; #: glândula salivar; ^: eritrócitos).

1.6.1 Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)

São principalmente produzidos pelo corpo gorduroso, hemócitos e por estruturas que representam barreiras físicas como intestino médio, túbulos de malpighi, traquéia e glândula salivar (Tzou *et al.*, 2000; Levashina 2004). Podem ser detectados na hemolinfa do inseto entre 2-4 horas após uma lesão séptica (Meister *et al.*, 1997). A produção de um AMP é quase 130 vezes mais rápida que IgM (imunoglobulina M) em vertebrados (Boman, 1991), a primeira a aparecer, e cerca de 3 vezes mais rápida que a reprodução de bactérias. Um inseto produz aproximadamente 10-15 AMPs (Hoffmann *et al.*, 1993), cada peptídeo exibindo um espectro de ação diferente (Bulet *et al.*, 1999). No entanto, em geral, os AMPs atuam na membrana do patógeno por permeabilização ou formando canais dependente de voltagem (Bulet *et al.*, 1999).

Existem sete distintas famílias de AMPs identificadas em *Drosophila*, com diferentes alvos específicos (Hetru *et al.*, 2003). Defensinas (Dimarcq *et al.*, 1994) que são a família mais generalizada de AMPs em insetos e outros invertebrados atuando principalmente contra bactérias Gram-positivas, enquanto Cecropinas (Kylsten *et al.* 1990), apesar de apresentarem um espectro mais amplo, são mais eficazes contra bactérias Gram-negativas. Outras famílias incluem Drosomicina (Fehlbaum *et al.*, 1994), Drosocina (Bulet *et al.*, 1993), Atacina (Asling *et al.*, 1995), Dipterocina (Wicker *et al.*, 1990), e Metchnikowina (Levashina *et al.*, 1995) com o último sendo o único antifúngico. Esses AMPs são ativados por duas importantes vias *Toll* e *Imd*.

A Defensina foi o primeiro imunopeptídeo isolado de *A. aegypti* (Chalk *et al.*, 1995a; Chalk *et al.*, 1995b; Lowenberger *et al.*, 1995). Ela também já foi isolada de linhagens celulares de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Gao *et al.*, 1999) e do mosquito *A. gambiae* (Dimopoulos *et al.*, 1997; 1998; Richman *et al.*, 1996). Seu espectro de atividade em mosquitos é dado primeiramente contra bactérias gram-positivas (Lowenberger *et al.*, 1995), embora alguns fungos e bactérias gram-negativas também ativem sua transcrição (Aguilar *et al.*, 2005; Lamberty *et al.*, 1999). Acredita-se que seu modo de ação ocorre pela formação de canais dependentes de voltagem na membrana citoplasmática (Hoffmann & Hetru, 1992).

Gambicina foi identificada em *A. aegypti* e *A. gambiae*, no entanto, não foi identificada em *D. melanogaster* (Dimopoulos *et al.*, 2000; Vizioli *et al.*, 2001; Christophides *et al.*, 2002). Acredita-se que a Gambicina tenha evoluído especificamente para combater a flora microbiana ou os parasitas da malária já que é fortemente expressa em infecções por bactéria ou *Plasmodium* (Dimopoulos *et al.*, 1997; Richman *et al.*, 1997; Dimopoulos, 2003).

1.7 Bactérias simbiotes

Associações simbióticas entre microbiota e insetos podem ser benéficas para o hospedeiro de muitas formas, incluindo suplementação da dieta, tolerância a variações do ambiente, e/ou manutenção da homeostase no sistema imune do hospedeiro (Weiss & Aksoy, 2001). Essa microbiota suplementa o seu hospedeiro com nutrientes que são limitados ou ausentes na dieta ou que não podem ser produzidos por ele próprio.

De acordo com Zook (1998), simbiose é definida como uma relação entre dois micro-organismo resultando em novas estruturas ou metabolismo. No entanto, essa definição não assume que a simbiose é uma relação benéfica. Uma interação positiva entre micro-organismo e inseto é identificada como comensalismo e mutualismo. No comensalismo, o micro-organismo beneficia o inseto enquanto o habita. No mutualismo, inseto e microrganismos se beneficiam mutuamente (Smith & Douglas, 1987; Bignell, 2000).

A complexidade entre a simbiose de insetos com micro-organismos levou muitos pesquisadores a ignorar o impacto da microbiota intestinal na biologia do hospedeiro (Dillon & Dillon, 2004). Primariamente, simbiotes são verticalmente transmitidos da mãe para a prole com alta fidelidade, simbiotes secundários podem ser adquiridos horizontalmente ou pelo ambiente.

Enquanto insetos com uma dieta nutricional limitada estabelecem associações com simbiotes primários e secundários, insetos com uma ampla dieta podem abrigar uma variedade de micro-organismos adquiridos do ambiente. Tanto linhagens de campo como de laboratório de mosquitos possuem uma robusta associação da microbiota com o intestino que consiste principalmente de bactérias Gram-negativas membros da família Enterobacteriaceae. Foi identificado em populações de campo de *A. gambiae* e *A. funestus* 16 espécies de bactérias de 14 gêneros (Lindh *et al.*, 2005). Em populações de laboratório de *A. gambiae* e *A. stephensi* foi indenticado uma ampla variedade de bactérias, principalmente dos gêneros *Asaia*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Serratia* e *Chryseobacterium* (Favia *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2009).

Estudos sobre a influência da microbiota intestinal do vetor no desenvolvimento do ciclo de vida dos parasitos vêm sendo desenvolvidos. Em mosquitos, as pesquisas vêm mostrando que infecções por bactérias do intestino podem inibir o desenvolvimento esporogônico dos parasitas da malária (Pumpuni *et al.*, 1993; 1996; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2009; Cirimotich *et al.*, 2011). Pumpuni e colaboradores, (1993, 1996),

demonstraram que bactérias Gram-negativas inibem a formação de oocistos total ou parcialmente, sendo que a mesma ação não foi observada com bactérias Gram-positivas.

Evidências dessa influência da microbiota intestinal no ciclo de vida de parasitas têm sido demonstradas para outros insetos como flebotomíneos e moscas tsé-tsé (Schlein *et al.*, 1985; Welburn & Malldin, 1999).

Esses estudos indicam que a microbiota intestinal possivelmente contribui para a modulação da competência vetorial do inseto, mas na maioria dos casos os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos. Essa influência pode ser por uma interação direta com o parasita, que pode ocorrer pela atividade inibitória de enzimas ou toxinas, ou indiretamente pela indução da atividade do sistema imune do hospedeiro.

Estudos recentes sugerem que a presença de espécies de *Enterobacter* no intestino do *A. arabiensis* originados de uma população de Zâmbia agem diretamente no *P. falciparum* bloqueando o desenvolvimento do parasito, tornando essa população refrataria a infecção. Essa refratariedade foi associada à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que interferem com o desenvolvimento do parasito e o mata antes da sua invasão no epitélio intestinal (Cirimotich *et al.*, 2011).

Já estudos anteriores sugerem que bactérias no lúmen do intestino modificam o ambiente intestinal e inibem o desenvolvimento de parasitas pela ação do sistema imune por meio da super expressão de genes de imunidade culminando no aumento da taxa de produção de peptídeos antimicrobiano (Pumpuni *et al.*, 1996; Ratcliffe & Whitten, 2004; Michel & Kafatos, 2005). Esses peptídeos provavelmente possuem um papel chave não somente no controle de bactérias patogênicas ou simbiotes, mas também no desenvolvimento de infecções por parasitos (Beard *et al.*, 2001; Boulanger *et al.*, 2004). Interessantemente, o sistema imune do mosquito age contra a proliferação de bactérias e também elimina um grande número de parasitos, modulando a intensidade da infecção no mosquito quando infectado com *P. berghei* ou com *P. falciparum* (Meister *et al.*, 2009).

Existem ainda muitas dificuldades em definir a microbiota indígena em comparação a bactérias transientes. A realização de projetos de genoma de insetos e a introdução de técnicas moleculares novas como ferramenta estão auxiliando estudos detalhados da microbiota de insetos (Dillon & Dillon, 2004).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da microbiota intestinal do *Aedes aegypti* no desenvolvimento esporogônico do *Plasmodium gallinaceum*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a eficiência da infecção dos mosquitos por *P. gallinaceum* quando submetidos ao tratamento com diferentes antibióticos
- b) Avaliar a eficiência da infecção dos mosquitos por *P. gallinaceum* quando tratados com uma combinação dos antibióticos que apresentarem maior eficiência na diminuição da microbiota, avaliado no item anterior.
- c) Identificar as bactérias presentes no intestino do *A. aegypti* antes e após o uso dos antibióticos que se apresentaram mais eficientes.
- d) Avaliar os efeitos do tratamento com antibióticos e da infecção por *P. gallinaceum* na expressão de genes relacionados com o sistema imune em *A. aegypti*.

3 Materiais e Métodos

3.1 Manutenção da cepa *P. gallinaceum*

Aproximadamente 200µl de sangue contendo trofozoítos de *P. gallinaceum* (20%-30%) foi inoculado via intramuscular em pintos híbridos (*Gallus gallus domesticus*) de três dias de vida.

O estabelecimento da infecção, que ocorre em média 5 dias após a inoculação, foi acompanhado pela análise do esfregaço, colhida a partir do corte da extremidade da unha, de uma gota de sangue de todas as aves infectadas. A lâmina foi fixada e corada com soluções de Panótico Rápido® (Laboclin). O número de células parasitadas foi contado em microscópio óptico, usando aumento de 1000X para a estimativa da parasitemia. Quando a parasitemia encontrava-se em ascensão (4-10%) e as aves apresentavam uma porcentagem de gametócitos entre 1-2%, as mesmas foram colocadas sobre as gaiolas para a alimentação de mosquitos.

A passagem da cepa em aves foi feita semanalmente por no máximo sete vezes. Após esse período é necessário restabelecer a infectividade do parasito pela picada direta de mosquitos infectados em aves sadias.

3.2 Obtenção e manutenção dos mosquitos

Os mosquitos *A. aegypti* originados da região administrativa de Barreiro de Belo Horizonte, Minas Gerais - foram obtidos a partir de ovos coletados pela Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte e mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ e a terceira geração utilizada nos experimentos.

O insetário é climatizado com uma variação média de temperatura de 26-28°C e umidade relativa do ar em torno de 70-80% em ciclos de 12 horas de claridade e 12 horas de escuridão. As larvas foram mantidas em uma cuba plástica contendo água sem cloro, duas gotas de solução de iodo (2%) e uma de Gonol (após reconstituição com água filtrada para 60 ml: ampicilina 3,5 g e probenecida 1,0 g), e foram alimentadas diariamente com ração de peixe (Goldfish Colour®). Após a mudança de fase de larva para pupa, estas foram coletas e

transferidas para gaiolas próprias, até o surgimento dos adultos que foram utilizados nos experimentos.

3.3 Tratamento dos mosquitos com antibiótico

As gaiolas utilizadas foram previamente lavadas e limpas com álcool 70% antes da introdução das pupas. Os mosquitos adultos que emergiram foram alimentados *ad libitum*, por cinco dias consecutivos em algodões estéreis umedecidos contendo solução de glicose 10% estéril acrescida com um dos seguintes antibióticos (Sigma Chemical Co) separadamente: tetraciclina, gentamicina e canamicina que possuem ação contra bactérias Gram negativas e positivas, e carbenicilina e espectinomicina que apresentam ação contra bactérias gram-negativas, todos na concentração de 200µg/mL. Fêmeas do grupo controle foram alimentadas com solução de glicose 10% estéril sem antibiótico.

3.4 Infecção dos mosquitos

Foi oferecido, por cinco dias, para cerca de 150 fêmeas de *A. aegypti* de cada grupo (controle e tratado com antibiótico), solução de glicose 10% e após esse período, esses insetos foram colocados para se alimentarem, ao mesmo tempo em ave infectada por *P. gallinaceum*. As fêmeas foram anestesiadas em CO₂ para separação das ingurgitadas e mantidas a 27°C. O tratamento com antibiótico continuou sendo administrado até o 7º dia após a infecção, quando um total de 30 insetos para cada grupo foram dissecados e o intestino retirado. Os experimentos de infecção foram feitos em três repetições independentes, com insetos da mesma geração, porém, podem ter sido criados em épocas diferentes.

3.5 Dissecção dos intestinos dos mosquitos

As fêmeas foram anestesiadas no freezer por 5 min e transferidas para uma placa de Petri sobre gelo para imobilização dos insetos. O intestino foi dissecado com o auxílio de estiletos sobre uma lâmina contendo solução de tampão fosfato salina (PBS), pH 7.2, e transferido para outra lâmina contendo solução de merbromina (mercurocromo) a 0,2% e

coberto por uma lamínula para visualização e contagem dos oocistos ao microscópio. Os dados foram submetidos a análise estatística para verificação de diferenças significativas.

3.6 Análise estatística

Análises estatísticas foram feitas usando o software GraphPad Prism (Prism 5.01; GraphPad Software Inc.). Foi utilizado o Teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição. Em caso positivo foi feito o teste T-Student não pareado paramétrico, quando não era possível fazer esse teste, foi feito o teste Mann-Whitney não pareado e não paramétrico.

3.7 Plaqueamento das amostras

Mosquitos fêmeas do grupo controle e do grupo tratado, após cinco dias de vida, tiveram suas superfícies esterilizadas com lavagens rápidas em uma sequência de soluções antissépticas: hipoclorito de sódio 1%, álcool 70% e PBS estéril (pH 7.2), por um minuto cada. A seguir, os mosquitos foram dissecados em condições estéreis, com o auxílio de estiletes estéreis sobre uma lâmina contendo solução de PBS. Dez intestinos foram transferidos para tubos de 1,5ml contendo 50µl de PBS, macerados com o auxílio de um pistilo e diluídos em 150µl de PBS. Uma alíquota de 100µl foi transferida para uma placa de Petri contendo meio PCA (Plate Count Ágar) (0,5% peptona, 0,25% extrato de levedura, 0,1% dextrose, 1% ágar), um meio não seletivo, e outra alíquota 10 vezes diluída também foi transferida para uma nova placa, sendo utilizado o método de semeadura por espalhamento. As placas foram incubadas a 27°C por 24-48h, e as colônias contadas e descritas como unidades formadoras de colônia (UFC/mL). O plaqueamento foi feito em duplicata.

3.8 Isolamento e estocagem das bactérias intestinais de *A. aegypti*

Após o crescimento bacteriano por 48 h, as colônias que apresentavam características distintas foram selecionadas para identificação. Cada colônia diferente foi submetida a 3 ciclos de repique para garantir a obtenção de cultura pura. Após, essas colônias foram colocadas em meio PCA líquido, para permitir seu crescimento, incubados em estufa na temperatura de 27°C por até no máximo 18 horas.

Posteriormente, amostras da cultura foram utilizadas para realização da coloração de Gram. O restante foi separado para extração de DNA e para congelamento. Para o armazenamento, as alíquotas foram transferidas para tubos de 1,5 ml contendo solução de congelamento (Tris-HCl 25mM, pH 8,0; MgSO₄ 0,1M; glicerol 65%), na proporção de 1:2. As amostras foram estocadas em freezer -70°C.

3.9 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, cada isolado bacteriano foi cultivado em meio PCA líquido sob agitação de 200 rpm a temperatura de 27° C por até 16h. As culturas foram centrifugadas por 5 min a 10.000 x g em temperatura ambiente. A extração de DNA foi feita utilizando-se DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®) seguindo as instruções do fabricante e armazenado a -20° C para posterior uso. A concentração e qualidade do DNA obtido foram determinadas em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000 Thermo Scientific) e por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (w/v). O DNA obtido apresentando valor de absorbância (A) A260/280 acima de 1,8 foi armazenado a -20°C.

O DNA do intestino das fêmeas também foi extraído de acordo com o descrito acima, com a finalidade de comparar a quantidade total de DNA bacteriano entre o inseto tratado e não tratado.

3.10 Amplificação do gene 16S DNAr

O DNA genômico extraído dos isolados bacterianos foi utilizado como molde para a reação em cadeia da polimerase (PCR- “Polymerase chain reaction”) visando a amplificação do gene 16S DNAr. Para a realização da PCR foi utilizado: tampão da reação GoTaq® (1,5mM MgCl₂; Mix dNTPs (10mM); *primer forward* 27F 10 (pmol); *primer reverse* 1492R (10pmol); GoTaq® DNA polimerase (Promega) (5,0u/μl); cDNA (20% v/v); água livre de nuclease para um volume final de 75μl.

O material foi misturado em vórtex, centrifugado e os tubos levados ao termociclador Gene AMP® PCR System 9700 (Applied Biosystems), com os seguintes parâmetros: 95°C por 2 min, 10 ciclo de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C 10 min, seguido por 25 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 3 min e um ciclo de 72°C por 7 minutos.

Os seguintes iniciadores universais da sequência 16S DNAr (Polz e Cavanaugh, 1998) foram utilizados: 27F 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1492R 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'.

3.11 Eletroforese de DNA

O produto das ampliações foi analisado em gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata 6%. O gel foi submetido a uma corrente de 100 V com tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) (Tris 90mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0) por 90 minutos. Como padrão de massa molecular utilizou-se 3µl de Orange Blue Dye (Promega®). A imagem foi digitalizada utilizando um scanner.

3.12 Purificação dos produtos da PCR

Após verificar pelo gel de poliacrilamida a ocorrência da amplificação das amostras com tamanho correspondente a 1.500 pb, os produtos obtidos dos isolados foram purificados utilizando o Wizard® Gel and Clean up System Kit (Promega), segundo orientações do fabricante.

3.13 Reação de sequenciamento do gene 16S

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o kit DyeNamic™ Terminator (GE Healthcare, UK) seguindo as instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos iniciadores, 27F e 1492R, foram utilizados separadamente, e adicionado 100ng do DNA molde. As condições de PCR foram as seguintes: 1) desnaturação inicial a 95°C por 2 min; 2) desnaturação a 96 °C por 20 seg; 3) anelamento a 50°C por 15 seg; 4) extensão a 60°C por 1 min; 7) 25 ciclos das etapas de 2 a 4. Após, o DNA foi precipitado adicionando 1µL de acetato de amônio 7,5 M, 2X o volume da reação de etanol 95% gelado em cada cavidade da placa. O material foi submetido à agitação e mantido a temperatura ambiente por 15 min protegido da luz; e a seguir centrifugado à temperatura ambiente por 45 min a 3.700 rpm. O sobrenadante foi removido invertendo-se a placa e foi adicionado 100µL de etanol 70% gelado em cada cavidade e centrifugado novamente à temperatura ambiente por 15 min a 3.700 rpm. O sobrenadante foi removido e a placa invertida foi submetida à centrifugação a

800 rpm por 5 segundos. O pellet foi eluído em 10uL da solução de eluição do kit de sequenciamento e centrifugado brevemente e guardado no -20°C e protegido da luz até o momento de colocar na máquina.

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) da plataforma de sequenciamento do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz – MG.

3.14 Alinhamento das sequências

Cada sequência foi submetidas à consulta no banco de dados público mundial, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1990) para comparação com sequências homólogas ali depositadas. O resultado obtido de cada isolado contém valores de identidade e “e-value” das mesmas.

As sequencias obtidas foram também foram comparadas a outro programa MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet, 1988).

3.15 Análises da expressão gênica do mosquito

Para a análise da expressão de defensina e gambicina, foram utilizados os seguintes grupos: fêmeas SF-Ctr = controle não tratado alimentado com açúcar. (sugar fed non-treated control group), BF-Ctr = controle alimentado com sangue (normal blood fed control group), BFI = alimentado com sangue infectado (blood fed infected group), KNSF= tratado com canamicina alimentado com açúcar (kanamicin treated sugar fed group), KNBF= tratado com canamicina alimentado com sangue (kanamicin treated normal blood fed group), KNBFI= tratado com canamicina alimentado com sangue infectado (kanamicin treated blood fed infected group), CBSF= tratado com carbenicilina alimentado com açúcar (carbenicilin treated sugar fed group), CBBF= tratado com carbenicilina alimentado com sangue (carbenicilin treated normal blood fed group), CBBFI= tratado com carbenicilina alimentado com sangue infectado (carbenicilin treated blood fed infected group). As amostras com sangue foram retiradas em diferentes tempos (0h, 12, 24h, 36h). Seguiu-se, portanto, as etapas de extração e tratamento do RNA, síntese do cDNA, e qPCR (Reação em cadeia da polimerase quantitativa).

3.16 Extração de RNA

A extração do RNA total das fêmeas de *A. aegypti* foi realizada através do método TRIZOL® (Invitrogen), utilizando-se inicialmente para cada amostra 500 µl da substância e macerando-se o conteúdo com o auxílio de um pistilo, após macerar, foi adicionado 500µl da mesma substância totalizando 1ml.

As amostras foram centrifugadas até 12.000 G por 10 min a 4°C. O sobrenadante transferido para um novo tubo e adicionado 200µl de clorofórmio e misturado invertendo o tubo por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 3 minutos. Após, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 10 min a 4°C para separação de fase.

A porção aquosa foi transferida para um novo tubo e a esse adicionado 500µl de álcool isopropílico para precipitação do RNA, incubado a temperatura ambiente por 10 min e feita uma nova centrifugação em 12.000G por 10 min a 4°C e todo sobrenadante resultante foi retirado para a lavagem do “pellet” com 1 ml de etanol 70%, centrifugando-se mais uma vez a 7500 x g por 5 minutos. Após a retirada do sobrenadante e do “pellet” já estar totalmente seco, este foi eluído em 30 µl de água TE (Tris-EDTA) A esse volume foi adicionado 1µl de inibidor de mase RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega).

A qualidade e concentração de RNA obtido foram determinadas em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000).

3.17 Tratamento do RNA com DNase

Para o tratamento do RNA foi utilizado o kit turbo DNA-free® (Applied Biosystems). O RNA foi diluído em um volume final de 8 µl afim de se obter 1µg de RNA num tubo de 1,5 ml. Em seguida, foi adicionado 1µl do tampão e 1µl da enzima DNase, homogeneizado e incubado a 37°C por 20 minutos. Após, foi adicionado 1µl do reagente DNase Inactivation para inativação da enzima, incubado a temperatura ambiente por 5 min e centrifugado a 10.000 x g por 90 segundos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo livre de DNase/RNase.

3.18 Síntese de cDNA

Ao tubo da reação anterior foi adicionada 0,5µl do oligonucleotídeo randômico (Invitrogen) (300µg), e água DEPC (Dietilopirocarbonato) para um volume final de 15µl e incubado a 70°C por 5 minutos. O tubo foi resfriado por 5 min e acrescentado 5µl do tampão M-MLV 5X, 1,5µl dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados - “deoxynucleotide triphosphates”) (10µM) e 1µl da enzima M-MLV (Promega) (200U/µl) e 17,5µl de água DEPC. Após a homogeneização, a reação foi incubada a 37°C por 60 minutos.

O produto da reação foi acondicionado a – 20°C até o momento de sua utilização para a PCR em Tempo Real.

3.19 Reação da polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) utilizando o método comparativo

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

Foram utilizados iniciadores específicos (tabela 1) dos genes de interesse, gambicina e defensina (Xi *et al.*,2008), e como controle interno os iniciadores do gene S7. Como controle negativo foi utilizado poços sem amostra, mas com par de oligonucleotídeos e o mix de SYBR Green.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR em tempo Real.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'
Defensina - F	GAT TCG GCG TTG GTG ATA GT
Defensina - R	TTA TTC AAT TCC GGC AGA CG
Gambicina - F	GCC AAA ACC TGT TCC TCT TG
Gambicina - R	CGA TGT AGC ATT CGG TGA TG
Proteína Ribossomal S7 - F	ACCGCCGTCTACGATGCCA
Proteína Ribossomal S7 - R	ATGGTGGTCTGCTGGTTCTT

O ensaio de *Real-Time* PCR foi realizado no aparelho 7500 *Fast Real-Time* PCR System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: um ciclo de 48°C por 10 min, 1 ciclo de 95°C por 10 min, 40 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 foi utilizado o método de Delta-DeltaCt ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmittgen, 2001). Calcula-se inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraindo os valores de CT (Threshold cycle ou limiar do ciclo) do gene controle (S7) dos valores do Ct do gene alvo. Após a determinação do ΔCt da amostra, escolhe-se a amostra normalizadora. Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ é utilizado a seguinte fórmula: [ΔCt (amostra) – ΔCt (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta Ct$, aplica-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que resulta no valor da expressão relativa.

Para a utilização do método comparativo, foi necessário determinar inicialmente a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno. Para tanto, foram feitas curvas com diluições seriadas do cDNA para cada gene de interesse. Para comparar a eficiência de amplificação de dois genes os valores de Ct do gene alvo foram subtraídos dos valores de Ct do gene controle. Caso a inclinação da reta seja menor que 0,1 a eficiência da amplificação é comparável e o método pode ser utilizado.

3.20 Reação da polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) utilizando o método da curva padrão

A determinação da quantidade de DNA bacteriano correspondente ao gene 16S foi quantificado entre os grupos sem tratamento e tratado com antibiótico (carbenicilina ou canamicina) utilizando o 7500 *Fast Real-Time* PCR System (Applied Biosystems). As amostras foram feitas em triplicata em placas de 96 poços. As reações de PCR foi utilizado um volume total de 25 μ l, usando o TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), contendo 100nM de cada oligonucleotídeo universal e para a sonda. As sequências dos oligonucleotídeos e da sonda estão na tabela 2.

As condições da reação foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A curva padrão foi construída a partir do DNA de uma cultura de *Bacillus licheniformis* em diluições seriadas e comparadas com as amostras de intestino dos insetos.

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR em tempo Real para quantificação bacteriana no intestino do mosquito

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Tm
16S F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	59±4 °C
16S R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	58±1 °C
Sonda	(FAM)CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC(TAMRA)	69±9 °C

4 Resultados

4.1 Crescimento bacteriano diferencial após o plaqueamento dos intestinos

Para observar se houve um crescimento diferencial de bactérias cultiváveis como resultado do efeito dos antibióticos na microbiota intestinal foi feito, o cultivo em meio PCA do macerado de intestinos.

As placas contendo o macerado de intestinos sem tratamento (figura 7A e 7B) resultaram em $5,4 \times 10^3$ est. UFC/ml (tabela 3). No tratamento com gentamicina (figura 7C e 7D), não houve crescimento de UFCs. Nas placas contendo os intestinos tratados com espectinomicina (figura 8A e 8B) houve um crescimento de 7×10 UFC/ml.

Após o plaqueamento dos intestinos tratados com tetraciclina (figura 7F e 7H) foi observado um crescimento de $1,5 \times 10^2$ UFC/ml, enquanto no tratamento com carbenicilina (figura 8E e 8F) observou-se uma média de $6,2 \times 10^2$ UFC/ml,) e no tratamento com canamicina o crescimento bacteriano foi de $2,9 \times 10^2$ UFC/ml.

Tabela 3: Estimativa das UFCs do intestino de *A. aegypti* antes e após o tratamento com antibióticos.

Amostras	Quantidade bacteriana (UFC/ml)
Sem tratamento	$5,4 \times 10^3$ est
Tetraciclina	$1,5 \times 10^2$
Gentamicina	Sem crescimento
Espectinomicina	7×10
Carbenicilina	$6,2 \times 10^2$
Canamicina	$2,9 \times 10^2$

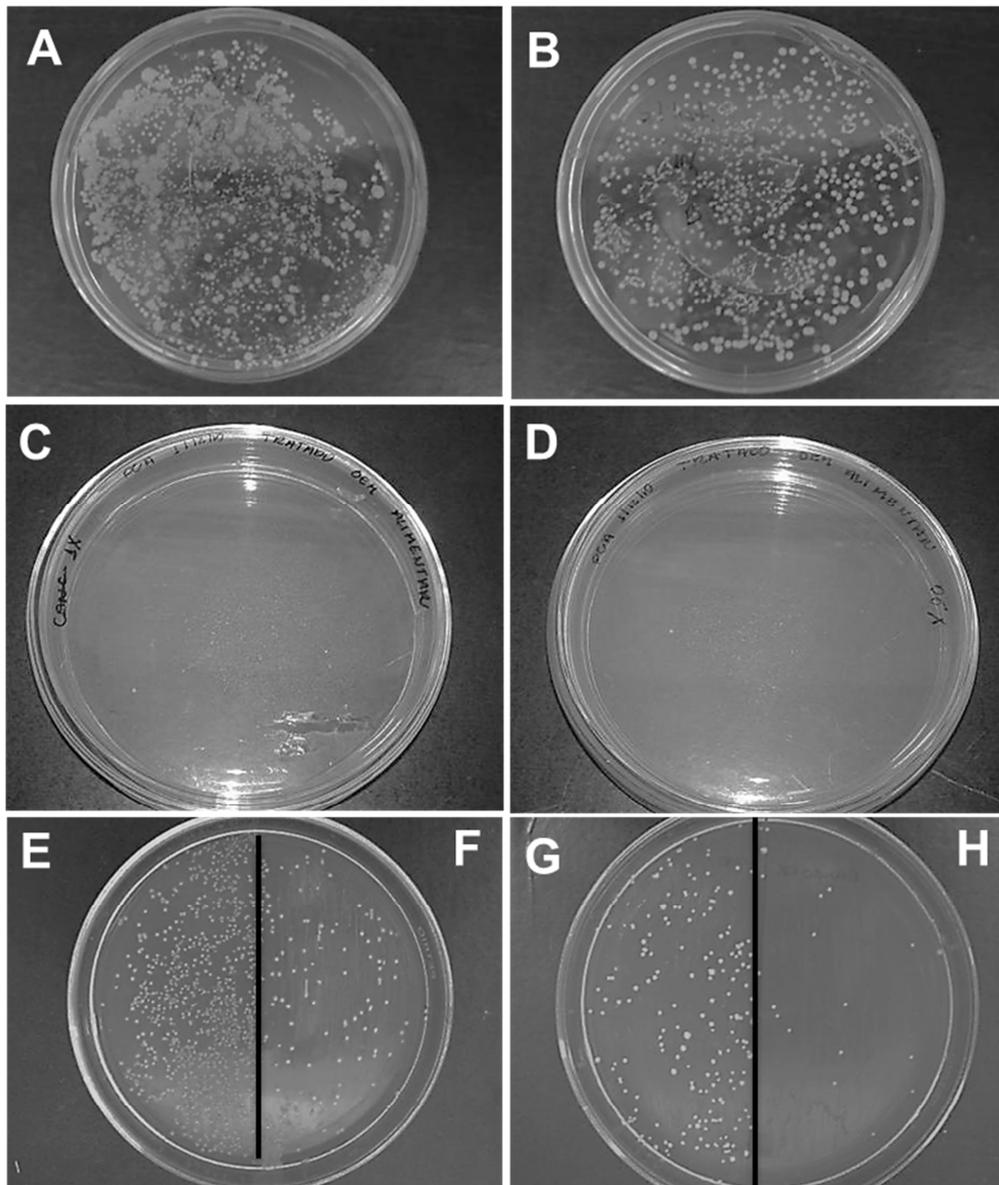


Figura 7: Crescimento bacteriano após a incubação do macerado de intestinos. (A) Crescimento de bactérias no intestino não tratado concentrado. (B) Crescimento de bactérias no intestino não tratado diluído 10X. (C) Crescimento de bactérias no intestino tratado com gentamicina concentrado. (D) Crescimento de bactérias no intestino tratado com gentamicina diluído 10X. (E) Crescimento de bactérias no intestino não tratado concentrado (1X). (F) Crescimento de bactérias no intestino tratado com tetraciclina concentrado (1X). (G) Crescimento de bactérias no intestino não tratado diluído 10X. (H) Crescimento de bactérias no intestino tratado com tetraciclina diluído 10X.

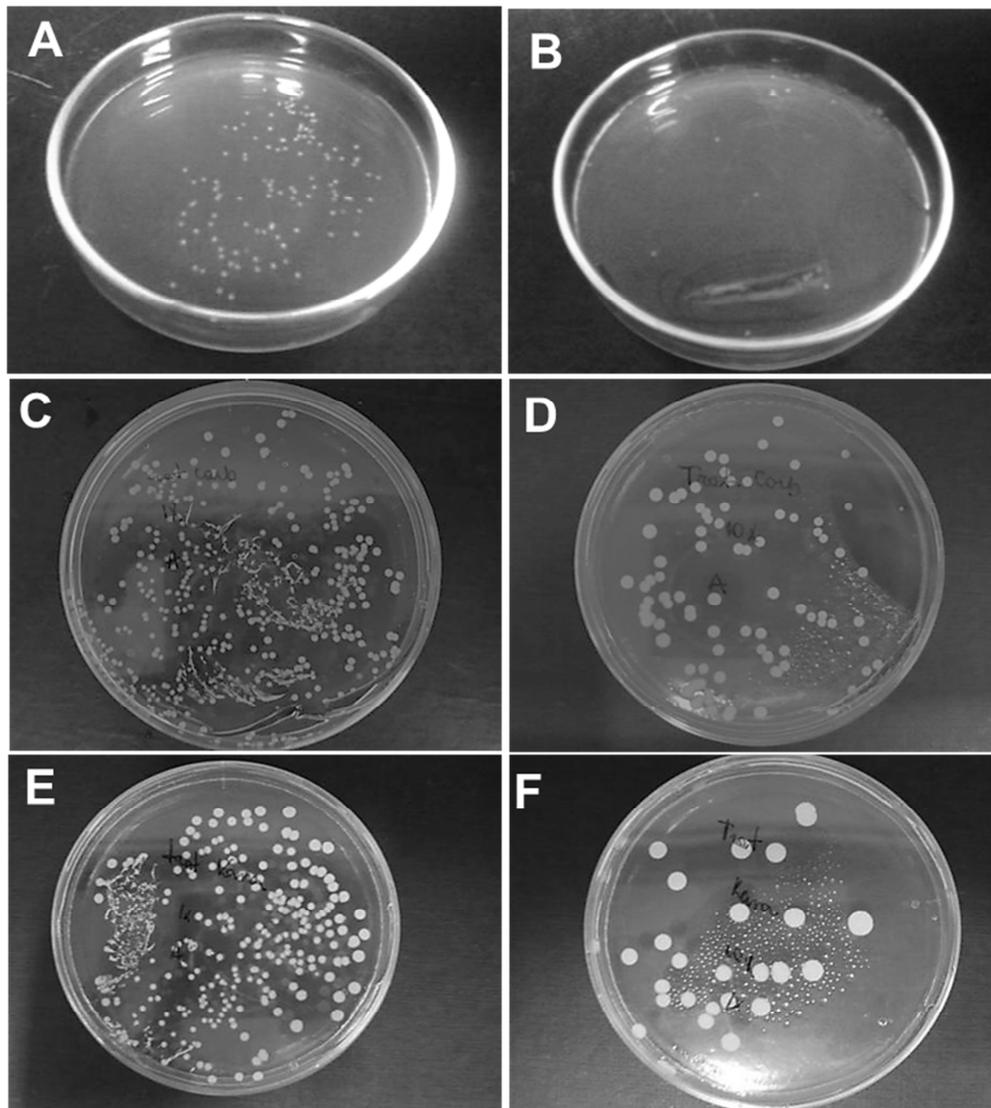


Figura 8: Crescimento bacteriano após a incubação do macerado de intestinos. (A) Crescimento de bactérias no intestino tratado com espectinomicina concentrado (1X). (B) Crescimento de bactérias no intestino tratado com espectinomicina diluído 10X. (C) Crescimento de bactérias no intestino tratado com carbenicilina concentrado (1X). (D) Crescimento de bactérias no intestino tratado com carbenicilina diluído 10X. (E) Crescimento de bactérias no intestino tratado com canamicina concentrado (1X). (F) Crescimento de bactérias no intestino tratado com canamicina diluído 10X.

4.2 Isolamento e identificação das bactérias presentes no intestino de *A. aegypti*

Com o intuito de identificar as bactérias presentes na flora intestinal do *A. aegypti*, bactérias dos intestinos sem tratamento e tratados com carbenicilina e canamicina foram isoladas de acordo com as características da colônia, tais como cor, forma, formato da margem.

Foram obtidos 13 isolados utilizando a técnica de semeadura por estrias. Desses, 7 isolados foram dos insetos não tratados, 4 isolados após o tratamento com carbenicilina e 2 após o tratamento com canamicina.

Para a identificação das espécies presentes nos isolados bacterianos, o DNA genômico foi extraído e o gene 16S DNAr foi amplificado por PCR. Na figura 9 observa-se o gel com a amplificação de 1500 pb correspondente ao gene 16S DNAr presente nos isolados.

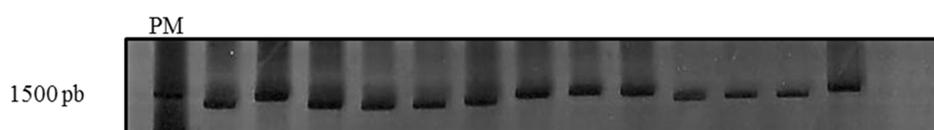


Figura 9: Visualização da banda de 1500pb do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos do intestino de *A. aegypti*.

Após a confirmação da banda correspondente ao gene 16S, o produto de PCR foi purificado e enviado para a plataforma de sequenciamento. As sequências obtidas na plataforma foram comparadas às sequências do banco de dados do GenBank utilizando a ferramenta BLASTn.

Dos 13 isolados foi possível encontrar similaridade para 11 sequências. Uma sequência apresentou similaridade com uma bactéria não cultivável e uma outra não apresentou similaridade com as sequências do banco de dados utilizado. Na tabela 4 pode ser observada a porcentagem de similaridade dos isolados com as sequências do GenBank.

Os isolados provenientes da microbiota de insetos SF-Ctr apresentaram filos como Firmicutes (15%), Bacterioidetes (28%) e Proteobactéria (57%) (figura 10). Nos isolados desse grupo foram identificadas 3 espécies de *Asaia* sendo elas: *Asaia bogorensis*, *Asaia krungthepensis* e *Asaia siamensis*.

Os isolados bacterianos oriundos de insetos CBSF observa-se a presença de espécies do filo Bacterioidetes (65%), e também identificado espécies de Actinobacterias (35%) (figura 10).

Nos isolados do KNSF foi identificado somente *Microbacterium lacticum* um representante do filo Actinobacteria (figura 10).

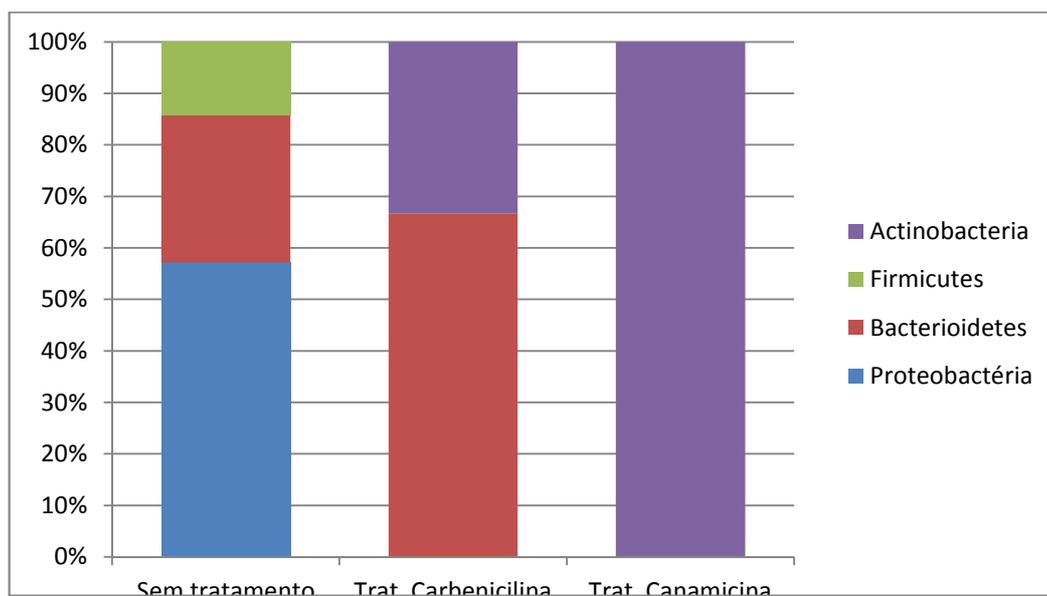


Figura 10: Porcentagem dos isolados bacterianos classificados em filos.

Tabela 4: Identificação dos isolados bacterianos de acordo com o banco de dados GenBank.

Tratamento	Isolado	Espécie próxima	Max identidade	Valor de E	Nº genbank
Sem tratamento	1	<i>Asaia siamensis</i>	95%	2e-171	AB682005.1
	2	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	95%	3e-171	FJ608002.1
	3	<i>Asaia bogorensis</i>	94% R	0.0	AB681076.1
	4	<i>Asaia krungthepensis</i>	94%	0.0	AB681142.1
	5	<i>Asaia siamensis</i>	95%		AB682005.1
	6	<i>Bacillus licheniformis</i>	92%	0.0	HM753625.1
Tratamento com Carbenicilina	7	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	93%	0.0	HQ154560.1
	8	Uncultured bacterium	83%		GU647071.1
	9	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	92%	0.0	HQ154560.1
	10	Uncultured <i>Microbacteriaceae</i> bacterium	83%	3e-10	JN865459.1
Tratamento com Canamicina	11	Sem similaridade			
	12	<i>Microbacterium lacticum</i>	84%	8e-71	EU573788.1
Sem tratamento	13	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	95%	0.0	AF207071.1

4.3 Efeito do tratamento com antibióticos na infecção por *P. gallinaceum*

Foi avaliado o impacto da microbiota natural do mosquito na capacidade do *P. gallinaceum* em estabelecer a infecção quando as bactérias foram removidas utilizando-se o tratamento com antibióticos. Os ensaios foram realizados sete dias após a alimentação em ave infectada, que permitiu determinar a porcentagem de infecção e o número de oocistos de cada intestino. Os gráficos mostram a mediana com intervalo interquartil (percentis de 25 e 75). O tratamento com gentamicina reduziu a presença de bactérias no intestino do inseto (figura 7C e 7D), com um número médio de oocistos foi de 72 ± 10 e e mediana de 58, 77 ± 10 com mediana 68 para o grupo controle e para o tratado com gentamicina respectivamente (figura 11) não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) quando submetido ao teste Mann Whitney.

Resultados semelhantes a esses podem ser observados quando os insetos foram tratados com espectinomicina (figura 12) e tetraciclina (figura 13).

O número médio de oocistos no tratamento com espectinomicina foi $26 \pm 2,6$ com mediana 23 e para o grupo controle $32 \pm 4,4$ com mediana 29 (figura 12) sem diferenças significativas ($p > 0,05$).

Insetos tratados com tetraciclina apresentaram um número médio de 31 ± 3 oocistos, mediana 29,5 enquanto o grupo controle apresentou uma média de 45 ± 7 oocistos e mediana 33,5, com um $p=0,4375$, ou seja, sem diferenças significativas (figura 13) quando avaliado pelo teste estatístico.

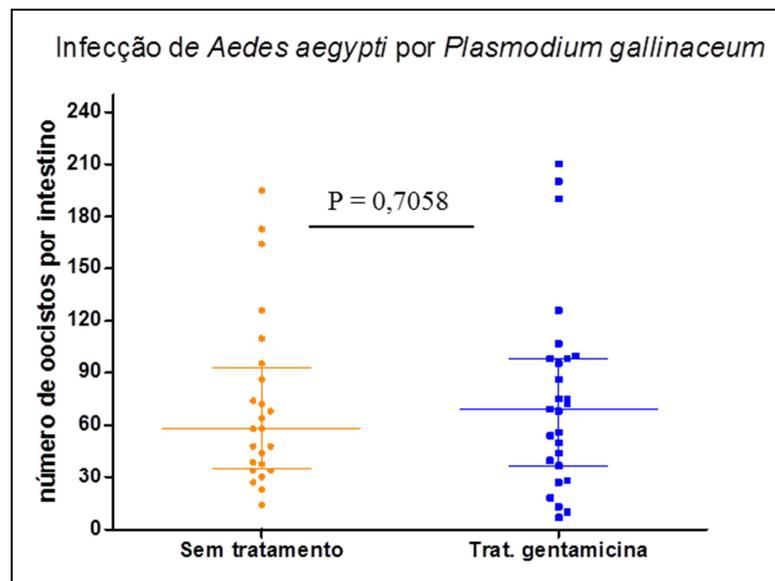


Figura 11: Efeito do tratamento com gentamicina na infecção do *A. aegypti* por *P. gallinaceum*. Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito.

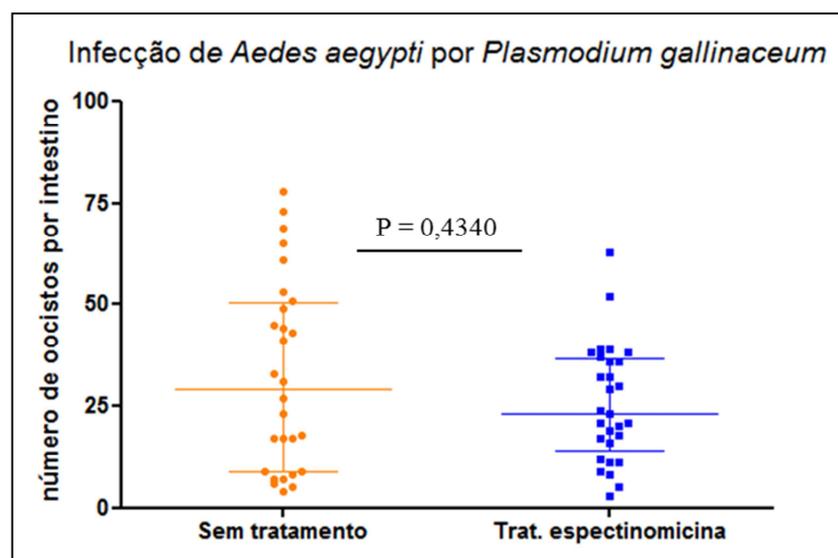


Figura 12: Efeito do tratamento com espectinomicina na infecção do *A. aegypti* por *P. gallinaceum*. Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito.

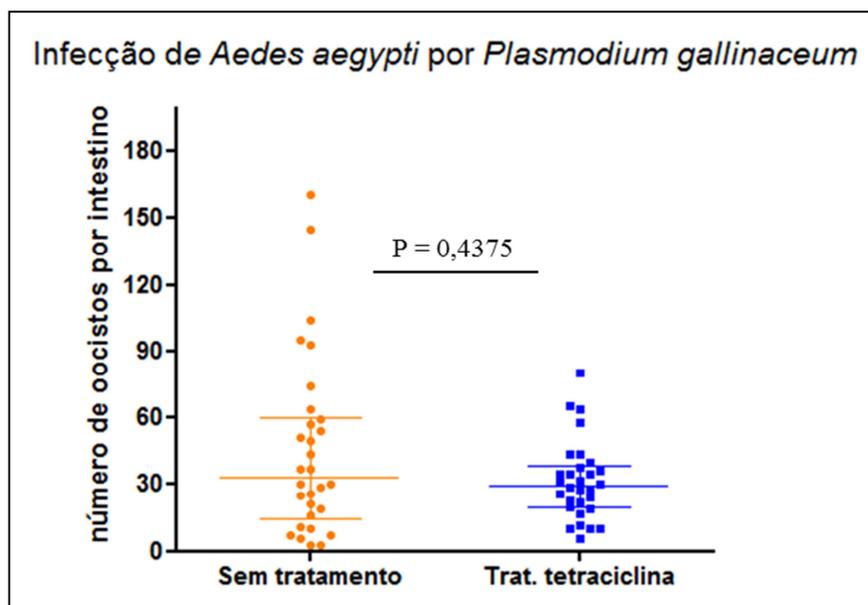


Figura 13: Efeito do tratamento com tetraciclina na infecção do *A. aegypti* por *P. gallinaceum*. Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito.

No tratamento com canamicina a média do número de oocistos foi de $39 \pm 3,8$ e mediana 42, enquanto o grupo controle resultou em uma média de $73 \pm 4,3$ oocistos com mediana 72,5 (figura 14). Essa redução se mostrou significativa quando submetido ao teste estatístico Mann Whitney ($p < 0,0001$)

Quando os insetos receberam carbenicilina na dieta, o número médio de oocistos foi de $79,10 \pm 5,4$, mediana 47, enquanto o grupo controle apresentou $43 \pm 4,6$ (figura 15) e mediana 28, essa diferença apresentou significância estatística ($p < 0,0001$).

Quando uma mistura contendo os dois antibióticos que alteraram o número médio de oocistos (carbenicilina/canamicina) foi adicionada à solução de açúcar não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre a média de oocistos de 41 ± 4 e mediana 44 para o grupo não tratado e $45,2 \pm 4,3$ com mediana 41,5 para o grupo tratado (figura 16).

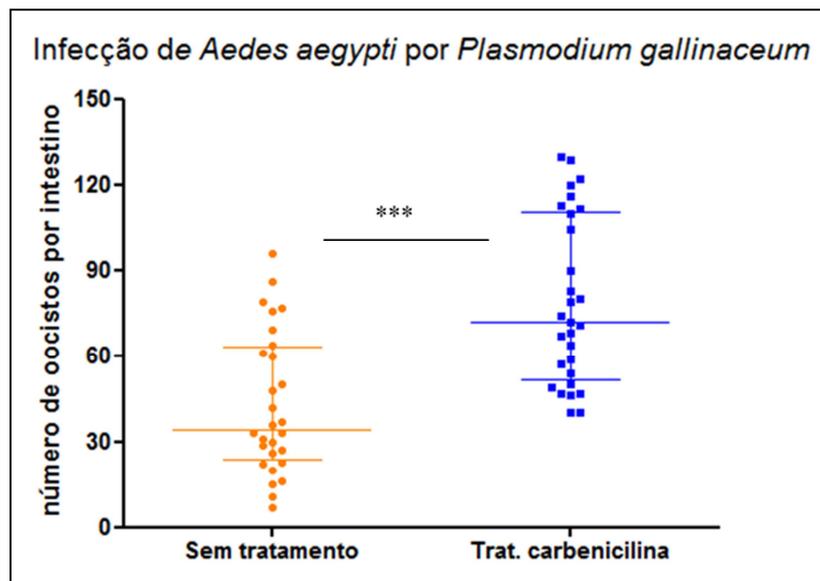


Figura 14: Efeito do tratamento com canamicina na infecção do *A. aegypti* por *P. gallinaceum*. Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito. (***) = $P < 0,0001$.

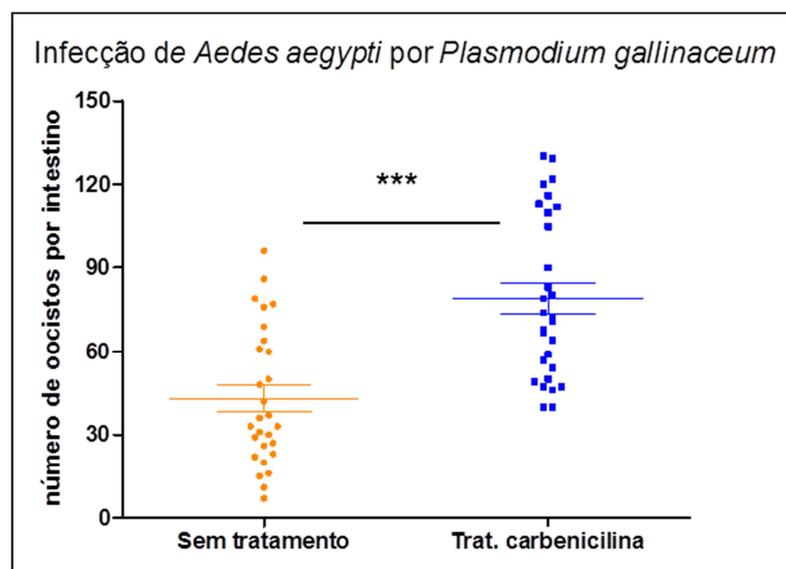


Figura 15: Efeito do tratamento com carbenicilina na infecção do *A. aegypti* por *P. gallinaceum*. Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito. (***) = $P < 0,0001$.

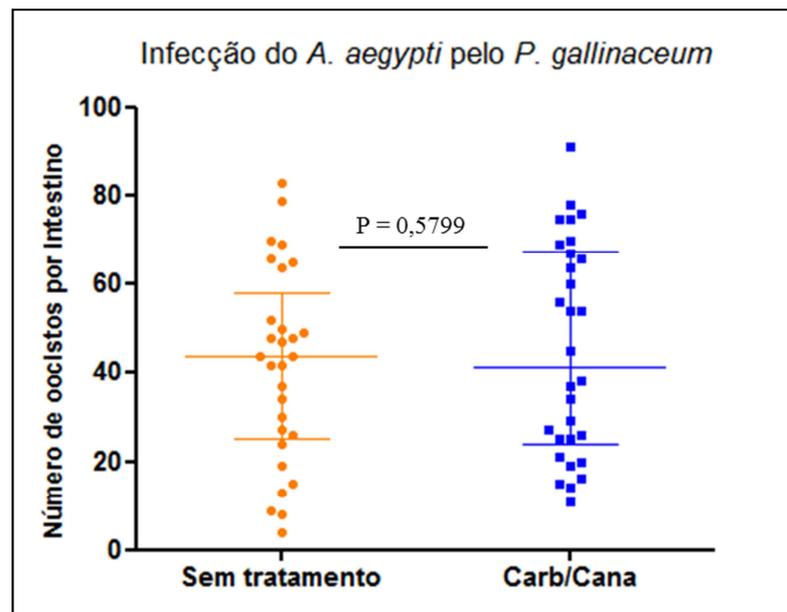


Figura 16: Efeito do tratamento com mistura de carbenicilina e canamicina na infecção do *A. aegypti* por *P. gallinaceum*. Cada ponto representa a quantidade de oocistos por intestino do mosquito.

4.4 Quantificação do DNA bacteriano Total

Para verificar a quantidade total de bactérias, tanto cultiváveis quanto não cultiváveis, no intestino após os tratamentos com os antibióticos carbenicilina e canamicina (os que alteraram a infecção), os DNAs foram extraídos e quantificados por q-PCR utilizando uma sonda específica para a região conservada do gene ribossomal 16S.

A figura 17 mostra que CBSF apresentaram uma quantidade média de DNA bacteriano no intestino de 0,007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, apresentando diferença significativa comparada ao controle ($p > 0,05$). Os intestinos dos insetos KNSF um total de 0,024 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Os insetos SF-Ctr continham no intestino uma quantidade média de 0,036 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

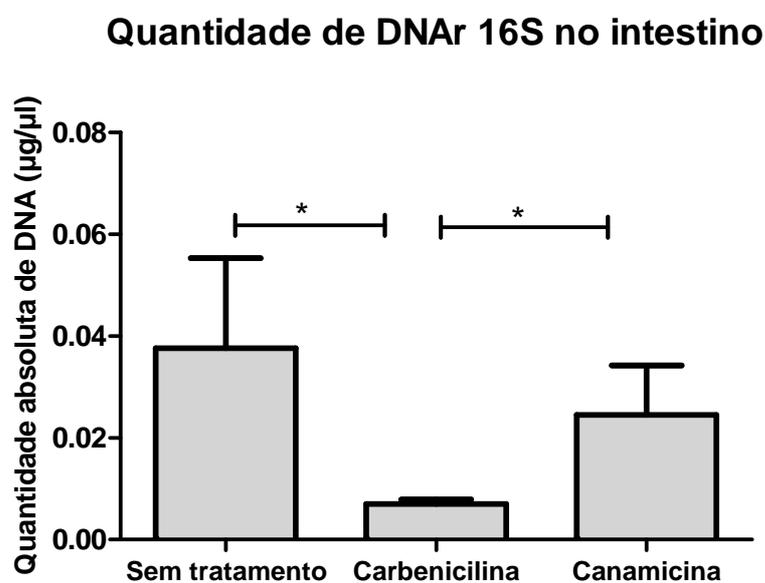


Figura 17: Quantidade total de DNA bacteriano no intestino dos insetos. O teste Mann Whitney foi utilizado (* = $P > 0,05$).

4.5 Análises da expressão dos genes de peptídeos antimicrobianos no *A. aegypti*

Para investigar a possibilidade de a microbiota endógena atuar na ativação de genes regulados pela via *Toll* e *Imd*, foi comparado o nível de expressão de mRNAs gambicina e defensina dos CBSF e KNSF, visto que esses antibióticos afetaram significativamente a infecção dos *A. aegypti* pelo *P. gallinaceum*

A análise de expressão desses alvos foram estudadas considerando 3 grupos de insetos: não alimentado (somente com açúcar), alimentado com sangue normal e com sangue infectado. As análises foram feitas em diferentes tempos por qPCR como descrito no item 3.19 de Materiais e Métodos.

Os níveis de mRNA relativos de defensina nos mosquitos CBSF e KNSF (gráfico 9) foram respectivamente 3,08 e 1,46 vezes maiores que o grupo controle (inseto não tratado) .

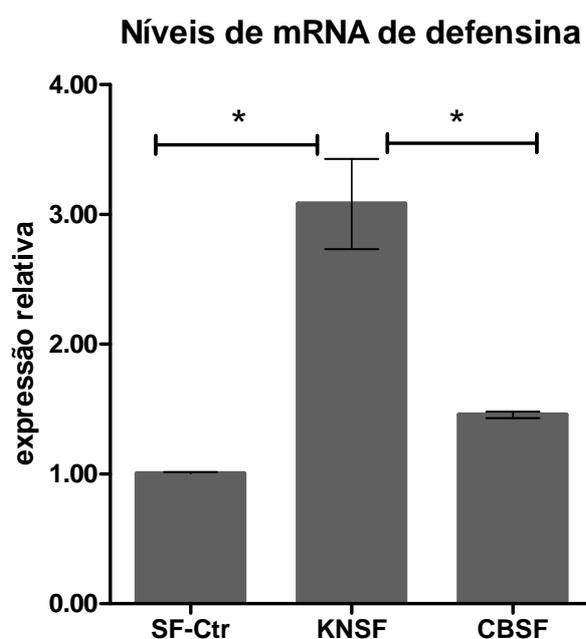


Figura 18: Níveis de mRNA de defensina em mosquitos inteiros alimentados com açúcar tratados (KNSF, CBSF) e não tratados (SF-Ctr). $P= 0,01$ quando testado por One- way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey.

A expressão dos níveis de defensina também foi quantificada nos insetos alimentados com sangue e com sangue infectado nos tempos de 0h, 12h, 24h e 36h pós-alimentação. O tempo 0h corresponde a 30 minutos após a alimentação sanguínea, quando as fêmeas se encontravam totalmente ingurgitadas.

Para avaliar o nível de expressão diferencial de defensina todas as amostras foram normalizadas considerando a amostra não tratada não alimentada. Pode ser observada nas figuras 19 e 20 no tempo 0h após alimentação um pico de expressão desse peptídeo no inseto BF-Ctr, se mostrando 66,73 vezes mais expresso. O inseto BFI apresentou um pico de expressão 12h pós-infecção, enquanto o inseto KNBFI apresentou maior expressão de defensina 24h pós-infecção. Os insetos infectados exibiram um perfil de expressão menor 36h pós-alimentação se comparado com os insetos não infectados.

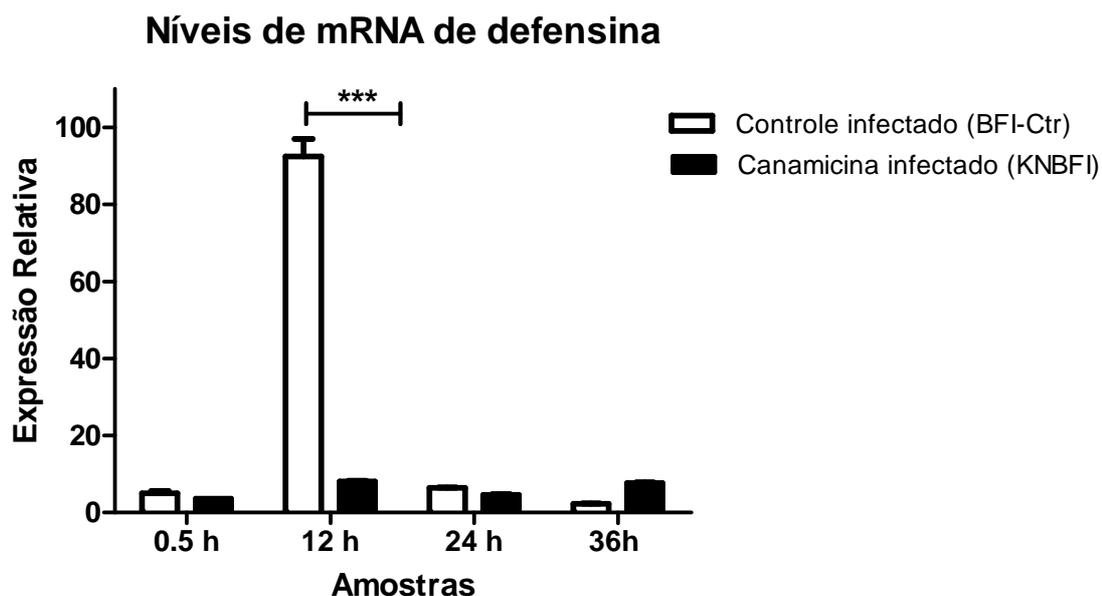


Figura 19: Perfil de expressão de defensina em insetos inteiros infectados (BFI-Ctr, KNBFI) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***) = $p < 0,001$.

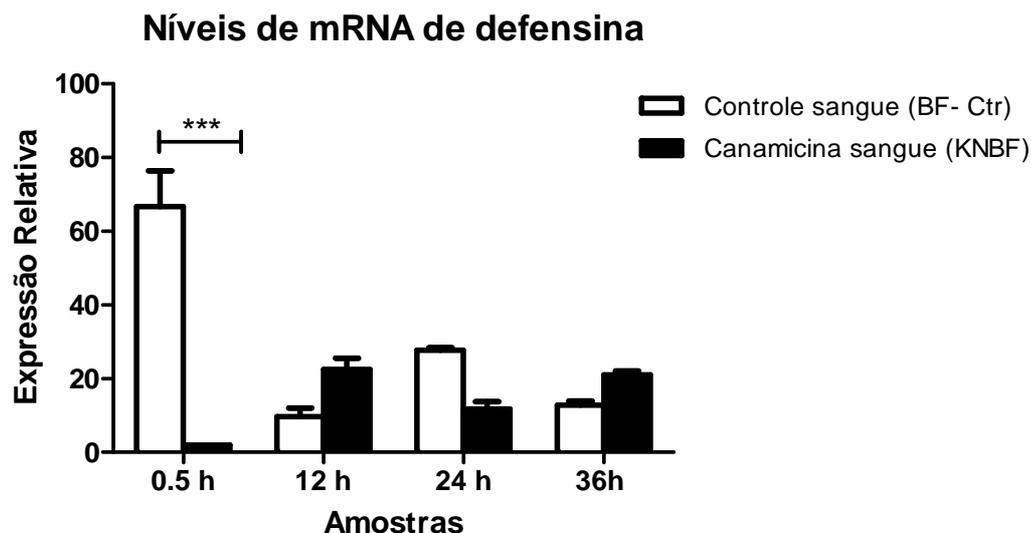


Figura 20: Perfil de expressão de defensina em insetos não infectados (BF-Ctr, KNBF) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***= $p < 0,001$).

O nível de gambicina em insetos KNSF (figura 21) foi 2,49 vezes mais expresso nesse grupo comparando com o inseto SF-Ctr, enquanto o mosquito CBSF apresentou um nível de expressão 1,40 vezes menor comparando com SF-Ctr.

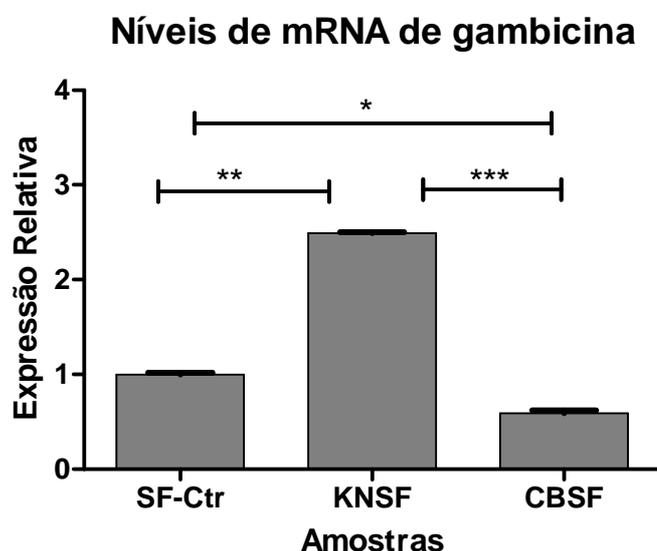


Figura 21: Níveis de mRNA de gambicina em mosquitos inteiros alimentados com açúcar tratados (KNSF, CBSF) e não tratados (SF-Ctr). Teste One-way ANOVA com múltiplas comparações de Tukey. (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,03$; *** = $P < 0,0001$).

A expressão relativa de gambicina também foi medida em mosquitos alimentados com sangue e com sangue infectado (figuras 22 e 23).

No tempo de 0h pós-alimentação os níveis de mRNA de gambicina (figuras 22 e 23) em insetos BF-Ctr e BFI-Ctr foram iguais a 1, sem aumento de expressão comparado ao inseto controle. No inseto KNBFI a expressão de gambicina mostrou-se aumentada 1,6 vezes, e o inseto KNBF mostrou uma expressão de gambicina 0.6 vezes diminuída.

Doze horas pós-alimentação (figura 22) os resultados mostraram que o nível de gambicina no inseto BFI-Ctr teve um aumento de 1,6 vezes enquanto o inseto BF-Ctr foi 1,8 vezes maior comparando ao controle(SF-Ctr). Insetos KNBFI (figura 22) tiveram os níveis de expressão de mRNA 3,1 vezes aumentada enquanto o inseto KNBF (figura 23) não sofreu aumento nessa expressão.

No tempo de 24h gambicina se mostrou diminuída em insetos BFI-Ctr e KNBF respectivamente 0,63 e 0,6 vezes. Nesse tempo, houve um aumento desse peptídeo 1,27 e 2,2 vezes respectivamente para os mosquitos KNBFI e BF-Ctr.

Com 36h é observado um pico de gambicina para mosquitos KNBF (7 vezes maior), um aumento de 2,9 vezes foi observado para o BF-Ctr, enquanto o BFI-Ctr foi 0.1 vezes menor, já os insetos KNBFI sofreram um aumento de 1,6 vezes.

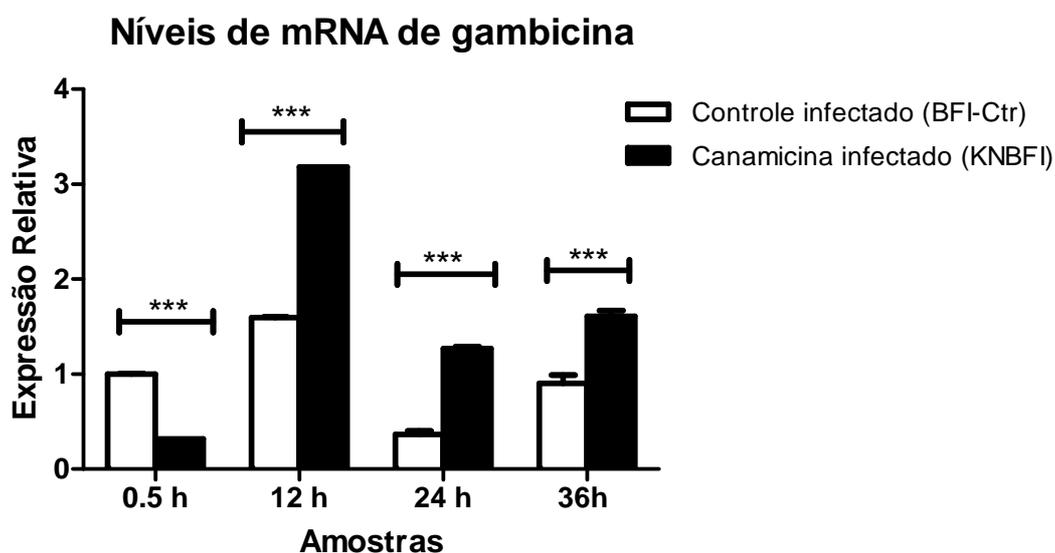


Figura 22: Perfil de expressão gambicina em insetos inteiros infectados (BFI-Ctr, KNBFI) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***) = $p < 0,001$.

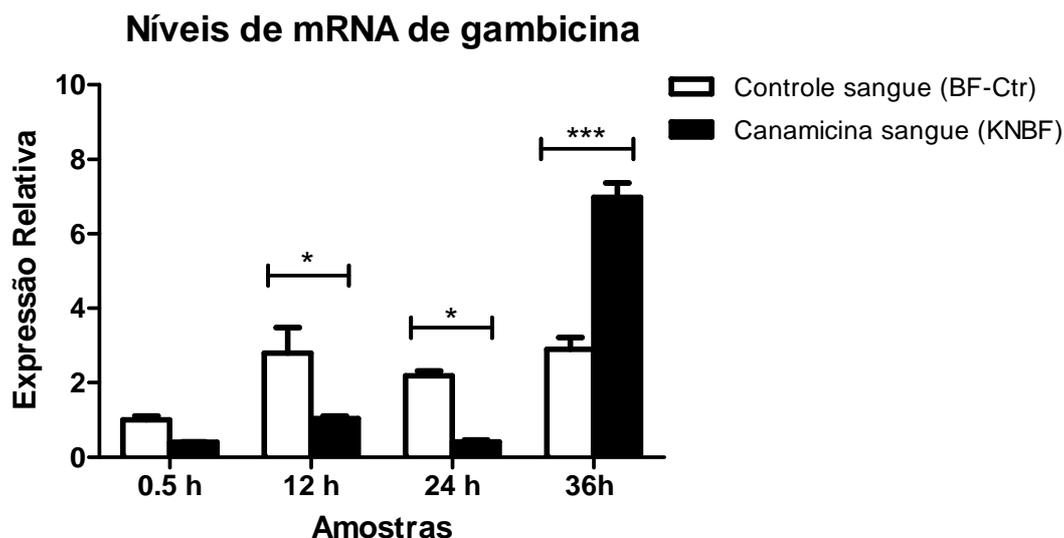


Figura 23: Perfil de expressão de gambicina em insetos não infectados (BF-Ctr, KNBF) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (*= $P < 0,05$; ***= $p < 0,001$).

Com relação ao grupo CBBFI (figura 24), os níveis de expressão de defensina se mostraram 19,6 vezes mais expresso após 12h, 2,66 vezes maior após 24h e 16,08 vezes maior após 36h em relação ao SF-Ctr, o BFI-Ctr apresentou expressão de defensina em torno de 30 vezes maior 24h após a alimentação e 78,3 vezes mais expressão de mRNA desse peptídeo após 36h.

Insetos BF-Ctr apresentaram uma expressão desse AMP 92,5 vezes maior 12h pós-alimentação, seguidos por 6,4 vezes e 2,2 vezes maior após 24h e 36h respectivamente (figura 25).

Os insetos CBBF mostrou níveis de mRNA 8 vezes maior após 12h, 4,57 vezes maior após 24h e 7,65 mais expressão após 36h (figura 25).

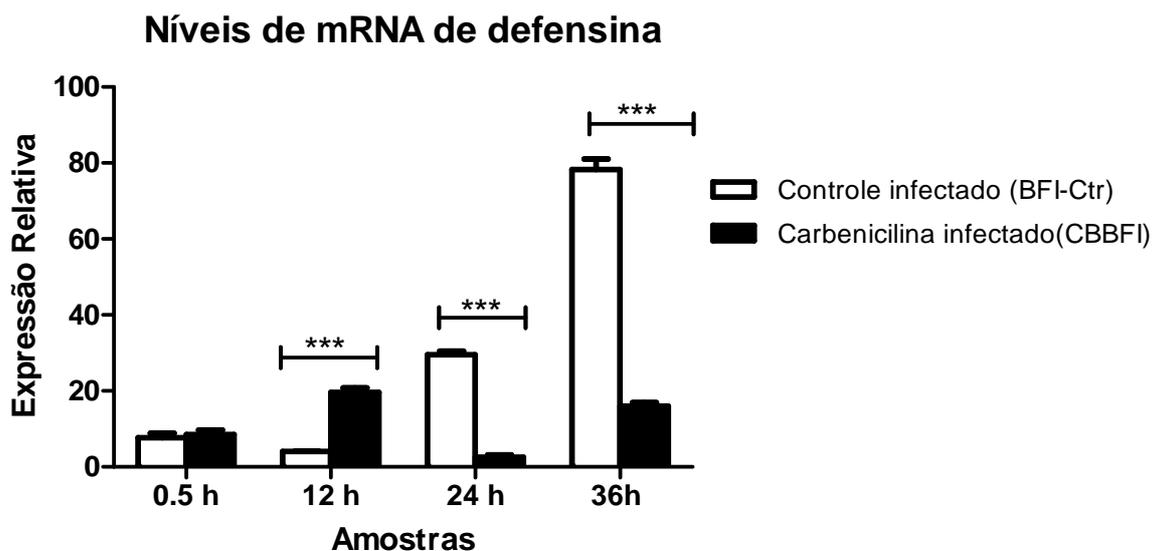


Figura 24: Perfil de expressão defensina em insetos inteiros infectados (BFI-Ctr, CBBFI) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***= $p < 0,001$).

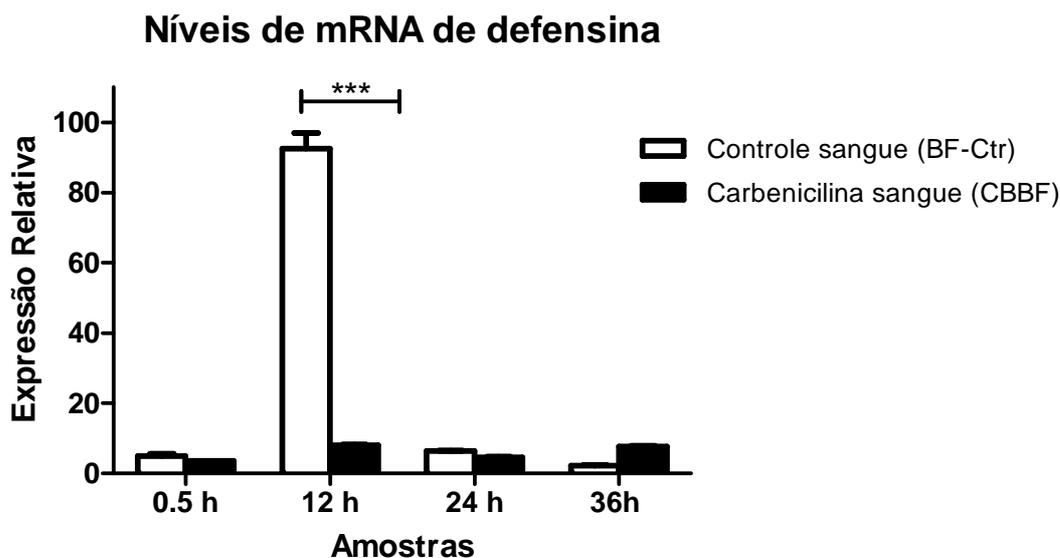


Figura 25: Perfil de expressão de gambicina em insetos não infectados (BF-Ctr, CBBF) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***= $p < 0,001$).

Os níveis de gambicina nos insetos CBBFI foi 0,4 vezes menor no tempo 0h, seguido de 0,7 vezes menor nos tempos de 12h, 24h e 36h (figura 26).

Os insetos BFI-Ctr apresentaram expressão do mRNA de gambicina em torno de 0,4 vezes menor 12h após a alimentação, 0,5 vezes menos expressão de mRNA desse peptídeo após 24h seguido por 0,4 vezes menos após 36h (figura 26).

Insetos BF-Ctr apresentaram uma expressão desse AMP 5,33 vezes maior 12h pós-alimentação, seguidos por 1,24 vezes maior e 1 vez menor após 24h e 36h respectivamente (figura 27).

O CBBF apresentou níveis de mRNA 22 vezes maior após 24h, 24,25 vezes maior após 36h (figura 27).

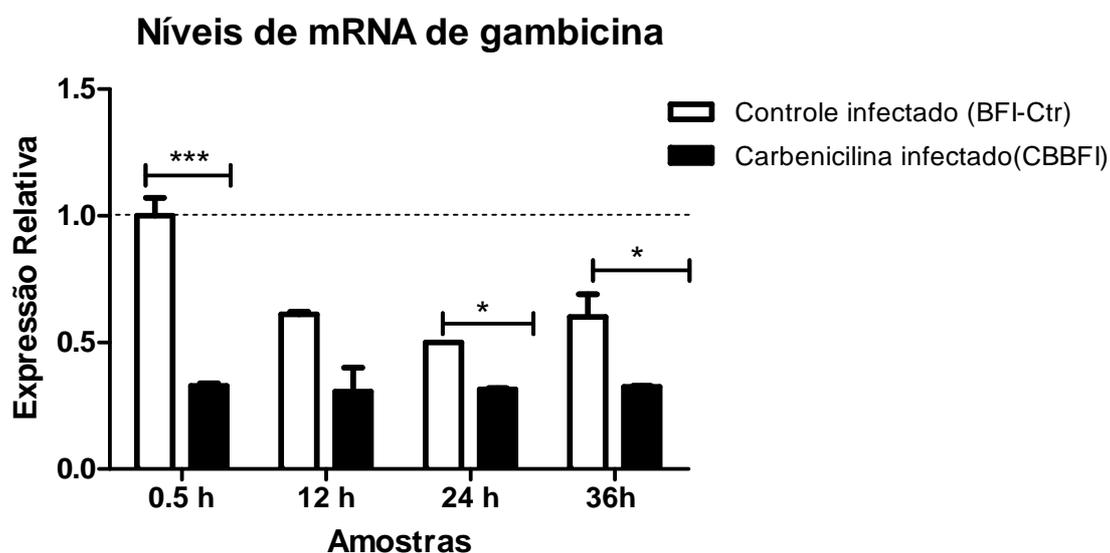


Figura 26: Perfil de expressão gambicina em insetos inteiros infectados (BFI-Ctr, CBBFI) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (*= $P < 0,05$; ***= $p < 0,001$).

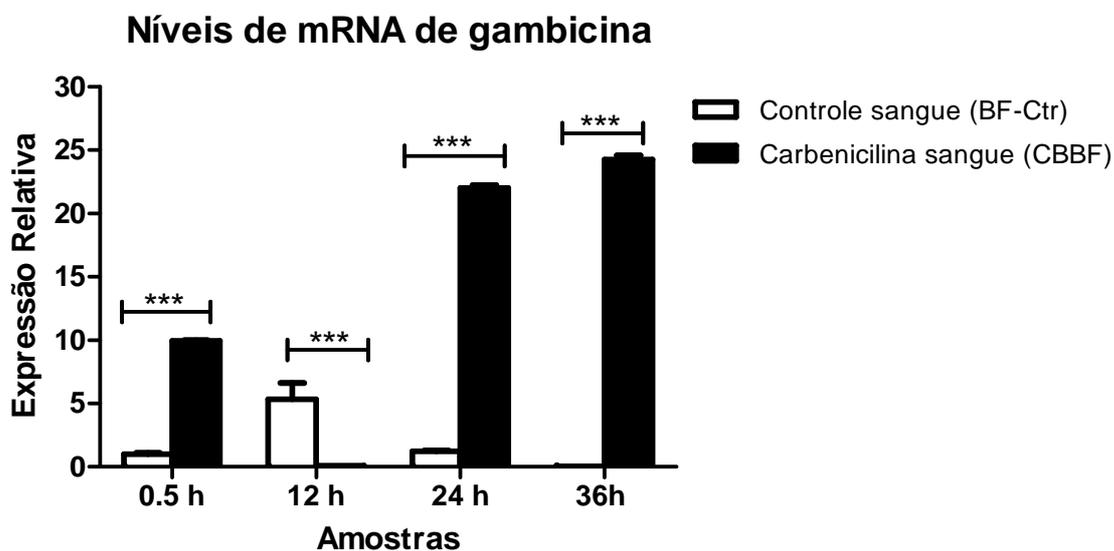


Figura 27: Perfil de expressão de gambicina em insetos não infectados (BF-Ctr, CBBF) em diferentes tempos. Teste 2way Anova com correções de Bonferroni. (***)= $p < 0,001$).

5 Discussão

5.1 Isolamento e identificação da microbiota intestinal de *A. aegypti*

Muitos insetos contêm grandes comunidades de diversos micro-organismos que provavelmente excedem seu número de células. Em humanos e outros mamíferos a microbiota intestinal tem um papel vital em um processo chamado “resistência à colônia” que funciona para prevenir a colonização do intestino por patógenos (Dillon & Dillon, 2004).

A composição da microbiota intestinal do mosquito é muito menos complicada que a microbiota intestinal de mamíferos, e isso permite estudar a dinâmica do sistema imune do hospedeiro, microbiota natural e o micro-organismo patogênico.

Nesse estudo, para verificar a relação da microbiota intestinal do *A. aegypti* e a infecção pelo *P. gallinaceum*, esses insetos foram submetidos ao tratamento por cinco diferentes antibióticos, como descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos.

O fornecimento de antibiótico na solução de açúcar diminuiu efetivamente a quantidade de bactérias do intestino dos mosquitos na presença de todos os antibióticos utilizados quando comparada a placa dos intestinos dos mosquitos que não foram submetidos a qualquer um dos tratamentos.

Os antibióticos, espectinomicina, gentamicina e tetraciclina, se mostraram os mais eficientes na eliminação de bactérias cultiváveis, no entanto, não apresentaram relação no processo de infecção pelo parasito, apesar de alguns trabalhos observarem efeitos na infecção utilizando gentamicina ou tetraciclina no tratamento de alguns mosquitos (Beier *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2009).

Visando a importância dessa relação entre bactéria simbiote e o inseto vetor, esse estudo isolou e identificou a microbiota intestinal de mosquitos *A. aegypti* antes e após o tratamento com canamicina e carbenicilina.

Os isolados provenientes de insetos SF-Ctr, como esperado, apresentaram uma maior diversidade de espécies, englobando filos como Firmicutes, Bacterioidetes e Proteobactéria (figura 10), sendo o último o mais abundante, com similaridade para 3 espécies de *Asaia*, havendo uma predominância de isolados Gram-negativos. Bactérias intestinais tanto de populações de campo como de laboratório de espécies de mosquitos tem sido identificadas em muitos estudos, mostrando a presença de muitas espécies Gram-negativas, apesar da

identificação de algumas espécies Gram-positivas (Chao & Wistreich, 1959; 1960; Ferguson *et al.*, 1961; DeMaio *et al.*, 1996; Pumpuni *et al.*, 1996; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003; Pidiyar *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2009; Gusmão *et al.*, 2010; Chavshin *et al.*, 2011; Cirimotich *et al.*, 2011; Rani *et al.*, 2011).

Alguns gêneros bacterianos desse estudo também foram relatados em outros estudos. *Bacillus* foi observado em *A. aegypti* (Gusmão *et al.*, 2010), em *A. gambiae* (Lindh *et al.*, 2005), em larvas de *Culex quinquefasciatus* (Pidiyar *et al.*, 2002) e de *A. stephensi* (Rani *et al.*, 2009). *Chryseobacterium* foi anteriormente associado ao intestino médio de *C. quinquefasciatus*, *A. gambiae*, *A. stephensi* (Dong *et al.*, 2009; Rani *et al.*, 2009; Chavshin *et al.*, 2011).

Interessantemente, quando os insetos receberam o tratamento com carbenicilina *Chryseobacterium meningosepticum* se tornou dominante e outras espécies tiveram seu crescimento limitado, sugerindo que essa bactéria possa ter alguma vantagem competitiva no intestino do mosquito ou o seu crescimento favorecido pelo meio de cultura utilizado. Observações semelhantes a essa, utilizando outros antibióticos, foram feitas em *A. gambiae* por Dong e colaboradores (2009). Quando tratados com canamicina não foi possível identificar essa espécie após o plaqueamento.

Três espécies do gênero *Asaia* foram identificadas nesse trabalho, sendo o filo mais abundante (proteobacteria). Trabalhos de Pidiyar e colaboradores, (2004), Rani e colaboradores (2009) e do nosso grupo (Gaio e colaboradores, 2011), mostraram uma alta porcentagem de bactérias desse filo colonizando o trato digestivo de mosquitos. As sequências obtidas por nós mostraram 94%, 94% e 95% de similaridade respectivamente para *Asaia bogorensis*, *Asaia krungthepensis* e *Asaia siamensis*, espécies isoladas de flores tropicais (Yamada *et al.*, 2000; Katsura *et al.*, 2001; Yukphan *et al.*, 2004). Além do trato digestivo, estudos demonstraram que espécies desse gênero também são capazes de colonizar a glândula salivar e ovário de mosquitos e são geralmente adquiridas por transmissão vertical (Favia *et al.*, 2007).

Sob o tratamento com carbenicilina, houve uma média de $6,2 \times 10^2$ UFC/ml e como dito anteriormente, com uma predominância de *C. meningosepticum*. Uma espécie Gram-positiva da família *Microbacteriaceae* também foi identificada, no entanto não foi possível encontrar similaridade em nível de gênero. Espécies da família *Microbacteriaceae* foram encontradas também em *A. stephensi*, *C. quinquefasciatus*, *A. gambiae* (Pidiyar *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2009; Chavshin *et al.*, 2011).

No tratamento com KNSF a média de UFC/ml foi de $2,9 \times 10^2$, a sequência obtida encontrou semelhança para *Microbacterium lacticum*, uma espécie Gram-positiva. Além dessa sequência, uma outra não apresentou similaridade para nenhuma sequência presente no banco de dados que utilizamos, podendo ser, portanto, uma sequência bacteriana ainda desconhecida, por isso, faz-se necessário mais experimentos a fim de elucidar essa questão.

A diversidade de bactérias identificadas nesse estudo não foi tão alta como descrito em outros trabalhos que encontraram gêneros principais como *Serratia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (Pumpuni *et al.*, 1996; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003; Pidiyar *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2009; Gusmão *et al.*, 2010; Chavshin *et al.*, 2011), talvez isso tenha ocorrido porque o isolamento foi feito a partir de mosquitos da terceira geração, seguramente mais homogênea e não diretamente da população de campo, além disso a utilização de solução de glicose sem adição de antibióticos porém estéril certamente diminuiu a fonte de contaminação por bactérias já que é sabido que os mosquitos podem adquiri-las do estágio larval ou podem ou a partir da alimentação rica em açúcares (Briegel e Kaiser, 1973). Gaio e colaboradores (2011) mostraram uma menor variabilidade de espécies bacterianas presentes no intestino do *A. aegypti* provenientes da cidade de Recife-PE em relação às cidades de Campos dos Goytacazes-RJ e Manaus-AM.

Sabe-se que a maioria dos microrganismos não são cultiváveis ou são de difícil cultivo (Vartoukian *et al.*, 2010), Contudo, somente a microbiota cultivável do intestino médio foi investigada nesse trabalho. E esse estudo, demonstra claramente, tanto nas placas de cultivo quanto na quantificação total de DNA bacteriano uma diminuição da microbiota revelando assim, sucesso na metodologia utilizada para diminuir bactérias do intestino do *A. aegypti*.

5.2 Análise do impacto da administração de antibióticos na infecção de *A. aegypti* por *P. gallinaceum*

A malária é a mais importante doença causada por vetores no mundo (WHO, 2011). O controle da transmissão dessa doença é principalmente focado no controle do vetor. Contudo, as medidas de controle atuais com base em mosquiteiros tratados com inseticidas e “sprays” residuais não são capazes de interromper a transmissão da malária nas grandes áreas endêmicas principalmente da África e do Pacífico. Com isso, existe um aumento no interesse de estudos com finalidade de controle biológico, mas essas abordagens focadas no controle do vetor ainda são pouco exploradas. (Ferguson *et al.*, 2010).

Inseticidas não químicos vêm ganhando a atenção principalmente por causa do impacto ambiental dos inseticidas químicos e a inevitável resistência a eles (Scholte *et al.*, 2004a; French-Constant, 2005). Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas aos inseticidas convencionais (Zaim and Guillet, 2002; Cirimotich *et al.*, 2011a). Por isso, o uso de micro-organismos é o grande foco como alternativa a tais produtos por causa da sua toxicidade seletiva e segurança ambiental (Mohanty and Prakash, 2004).

Sabe-se que os mosquitos tem sua própria flora microbiana intestinal. Antigamente, acreditava-se que os insetos eram vetores passivos e podiam transmitir micro-organismos por meio de três interações não específicas: carregando no corpo, regurgitando e defecando.

Entretanto, hoje em dia, pesquisadores acreditam que a disseminação de patógenos por vetores envolve interações específicas entre o hospedeiro e a bactéria.

Dessa forma, acredita-se que a microbiota tem um importante papel na interação parasito vetor e poderá contribuir para o desenvolvimento de ferramentas seguras de controle de doenças tropicais, sobretudo a malária.

Estudos vêm mostrando que a microbiota intestinal pode afetar a capacidade do vetor de várias maneiras. Essa associação com o inseto tem um importante papel na sua fisiologia como nutrição, digestão, produção de ovos (Dillon & Dillon, 2004; Gusmão *et al.*, 2010; Gaio *et al.*, 2011b) até mesmo na ativação da imunidade inata (Weiss *et al.*, 2011). Muitas vezes, a capacidade do vetor em estabelecer a infecção é diminuída (Cirimotich *et al.*, 2011a) porque o desenvolvimento do parasito é dificultado por essa microbiota (Dong *et al.*, 2009).

Dong e colaboradores (2009) observaram que a microbiota intestinal influencia na formação de oocistos do *Plasmodium*. Mosquitos que foram tratados com antibióticos e posteriormente desafiados com *P. falciparum* foram mais susceptíveis a essa infecção, todavia, a reconstituição da flora bacteriana resultou em um nível de infecção semelhante aos insetos não tratados.

O presente trabalho avaliou a resposta de *A. aegypti* à infecção por *P. gallinaceum* quando esses insetos foram tratados por cinco antibióticos, e dependendo do antibiótico utilizado os mosquitos responderam positivamente, negativamente ou não apresentaram diferenças na infecção pelo *Plasmodium* quando comparados ao grupo controle. Nesta avaliação foi interessante observar que tanto carbenicilina quanto canamicina atuaram alterando a infecção no inseto. Canamicina inibiu parcialmente o desenvolvimento esporogônico do *P. gallinaceum*, enquanto carbenicilina tornou o inseto significativamente mais susceptível à infecção. Apesar de ambos os antibióticos serem efetivos contra bactérias gram-negativas, a carbenicilina também afeta bactérias Gram-positivas. Possivelmente um

antibiótico, a canamicina, eliminou certas bactérias e favoreceu o crescimento e colonização de outras, provavelmente bactérias não cultiváveis. O gráfico 8 mostra que a quantidade total de bactérias no intestino, apresenta uma maior quantidade de DNA bacteriano nas amostras tratadas com canamicina em relação às com carbenicilina; porém o contrário é observado quando são analisadas as placas contendo as bactérias cultiváveis. Relacionando esse crescimento bacteriano diferencial com a infecção por *Plasmodium*, conclui-se que insetos que tiveram carbenicilina adicionados à dieta apresentaram uma quantidade menor de bactérias, e uma maior suscetibilidade ao parasito. Por outro lado, o grupo tratado com canamicina teve uma parcial inibição da infecção e observando o gráfico de quantidade total de bactérias é visto que há um aumento dessa microbiota comparado ao outro tratamento. Esse fato demonstra que a microbiota intestinal do *A. aegypti* tem um papel importante no desenvolvimento do *P. gallinaceum*. Resultados semelhantes a esses foram relatados quando *A. gambiae* e *A. stephensi* foram tratados com gentamicina e infectados com *P. falciparum* (Beier *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2009). Em *Culex bitaeniorhynchus* o tratamento com tetraciclina resultou em uma maior suscetibilidade ao vírus da encefalite japonesa (Mourya *et al.*, 1985) assim como *A. aegypti* com o vírus dengue após uma combinação de penicilina, estreptomicina e gentamicina (Xi *et al.*, 2008).

A inibição da esporogonia no intestino dos mosquitos vem sendo observada em muitos trabalhos devido à ação de bactérias Gram-negativas (Pumpuni *et al.*, 1993; Straif *et al.*, 1998; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2006; Cirimotich *et al.*, 2011a). Pumpuni e colaboradores (1993) avaliaram o efeito de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas no desenvolvimento do *P. falciparum* no mosquito *A. stephensi*. Uma parcial ou completa inibição na formação do oocisto ocorreu quando esses insetos foram co-alimentados com diferentes concentrações de bactérias Gram-negativas utilizadas, mas esse efeito inibitório não foi observado com bactérias Gram-positivas.

Estudos vêm discutindo a utilização de espécies do gênero *Asaia* como paratransgenese (Favia *et al.*, 2007; Damiani *et al.*, 2008; 2010; Rani *et al.*, 2009; Chavshin *et al.*, 2011; Djadid *et al.*, 2011), que é a manipulação genética de um micro-organismo simbiote para controle de doenças transmitidas por vetores. Um candidato à paratransgênese necessita ter uma relação simbiótica com o vetor, ser facilmente propagado e possuir estabilidade para expressar o gene de interesse sem comprometer seu *fitness* (Riehle *et al.*, 2007), fazendo assim dessa espécie um forte candidato ao controle de malária. No entanto, no presente estudo, a relação entre *Asaia* sp. e *Chryseobacterium* se mostrou relevante na resistência/suscetibilidade do *A. aegypti* ao *P. gallinaceum*. *Asaia* e *Chryseobacterium* estão

presentes na microbiota normal desses mosquitos, porém o tratamento com carbenicilina elimina *Asaia*, predomina *C. meningosepticum* e ocorre um aumento da infecção pelo *Plasmodium*. Todavia, distintamente, o tratamento com canamicina elimina ambas as espécies e como consequência ocorre inibição parcial na formação de oocistos. Experimentos de co-alimentação devem ser feitos para elucidar o possível papel dessas bactérias com a infecção de *A. aegypti* por *P. gallinaceum*.

5.3 Análise do perfil de expressão de AMPs

Patógenos são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão que ativam vias de sinalização imune (*Toll* e *Imd*) bem caracterizadas em *Drosophila*. Como resultado dessa sinalização, ocorre a ativação de um fator de ativação nuclear específico-kB (NF-kB) que é translocado para o núcleo e induz a transcrição de genes que codificam moléculas imune efetoras. Dentre essas, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) que causam lise ao micro-organismo alvo são um dos genes mais induzidos após uma infecção (De Gregorio *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 2001).

Este nosso estudo demonstra que o sistema imune responde a uma supressão da microbiota. Os níveis de defensina se mostraram super-expressos quando os mosquitos foram submetidos aos tratamentos com antibióticos canamicina e carbenicilina (KNSF e CBSF). Distintamente, a gambicina se mostrou super-expressa nos mosquitos KNSF e sub-expressa naqueles CBSF. Estes dados fortemente sugerem que insetos tratados com canamicina apresentam um sistema imune mais ativo apesar da diminuição da microbiota, e que, provavelmente, esses dois AMPs apresentam uma especificidade para bactérias Gram-positivas como demonstrado em *Drosophila* (Kaneko & Silverman, 2005), visto que este antibiótico possui espectro de ação para bactérias Gram-negativas. Curiosamente, a taxa de sobrevivência de *A. gambiae* que tiveram o gene da defensina silenciado, foi medida após a injeção com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Verificou-se que a sobrevivência dos mosquitos foi diminuída apenas com a injeção de bactérias Gram-positivas e não se alterou com as Gram-negativas (Blandin *et al.*, 2002). Considerando os nossos dados e estes verificados em *A. gambiae*, será interessante avaliar a expressão e silenciar genes precursores de ativação da via *Toll* e *Imd* nos *A. aegypti* tratados como os antibióticos que utilizamos para confirmar tal hipótese.

A expressão desses dois AMPs também foi medida quando esses grupos de insetos se alimentaram com sangue e com sangue infectado.

É sabido que, a alimentação sanguínea fornece nutrientes para a maturação de ovócitos, para isso, o corpo gorduroso da fêmea ativa a expressão do gene da vitelogenina, enquanto genes relacionados à imunidade, como defensinas, tendem a ficar sub expressos para diminuição do gasto energético (Raikhel, 1992; Romans *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 1999; Kokoza *et al.*, 2000). De acordo com a literatura, a expressão de vitelogenina, principal proteína produzida pelas fêmeas para a maturação dos ovócitos, atinge seu pico em 24h e se mantém até 36h-48h após alimentação sanguínea (Attardo *et al.*, 2006). Trabalhos de Gaio e colaboradores (2011) demonstraram claramente uma diminuição no número de ovócitos após a administração de carbenicilina, indicando que bactérias possuem um importante papel nesse evento. Nossos resultados mostraram que a expressão de defensina e gambicina no CBBF apresentou um aumento de 24h para 36h, e uma queda nesses tempos no grupo BF-Ctr corroborando com a literatura (figuras 25 e 27).

Experimentos de Kokoza e colaboradores (2000) produziram um mosquito transgênico para expressar vitelogenina e defensina simultaneamente, e com isso foi observado um aumento de expressão de ambos os genes. Esse inseto foi infectado com *P. falciparum* e a inibição na produção de oocistos foi observada (Kokoza *et al.*, 2010). Um trabalho recente utilizando o mesmo princípio de produção de transgênico em *A. stephensi*, *A. gambiae* e *A. albimanus*, porém ativo para vitelogenina e Rel2 (um importante componente da via *Imd* ativadora de AMPs), mostrou resultados semelhantes possuindo atividade anti- *P. falciparum* (Dong *et al.*, 2011). Essa abordagem transgênica se mostrou eficiente em três modelos, indicando que essa via de controle da resposta imune é altamente conservada em mosquitos, dessa forma, pode ser uma eficiente ferramenta para controle da doença.

Insetos KNBFI aumentam a expressão de defensina 24h e 36h após a alimentação comparada ao BFI-Ctr, momento em que o oocineto começa a invadir o epitélio intestinal, diminuindo a infecção. Resultados semelhantes são observados quando *A. gambiae* se infecta com *P. berghei* apresentando um pico de expressão 26h após a infecção em insetos previamente tratados por antibióticos (Richman *et al.*, 1997).

O CBBFI apresentou níveis de expressão de defensina menores comparada ao controle infectado 24h e 36h após a alimentação revelando um sistema imune menos ativo o que provavelmente propiciou uma maior suscetibilidade ao parasito.

Avaliando os níveis de expressão de gambicina do KNBFI pode se concluir que se mostrou mais ativa que o BFI-Ctr determinando uma inibição parcial do numero de oocistos.

Quando se avalia os níveis de gambicina do grupo que apresentou maior suscetibilidade ao *P. gallinaceum* (carbenicilina) é observado uma inibição do mRNA sugerindo assim que a ativação desse peptídeo não ocorre somente pelo parasita e necessita da ação da microbiota, talvez uma classe específica de bactérias diferente das presentes no KNSF ou SF-Ctr, pois quando essa expressão é avaliada no inseto BF-Ctr o perfil também muda.

Estudos feitos por Welburn e colaboradores (1993) mostraram que o simbiote intestinal da mosca Tsé-tsé, *Sodalis glossinidius*, produz açúcar que neutraliza a atividade da lectina anti-tripanosossoma no intestino do inseto, aumentando assim o desenvolvimento do *Tripanossoma brucei*, mecanismos semelhantes a esse pode estar ocorrendo no modelo avaliado e interferindo nas vias do sistema imune ativando-as ou inibindo-as, o qual poderia explicar as flutuações observadas no inseto quando está infectado ou somente alimentado com sangue

6 Conclusões

- Todos os antibióticos utilizados eliminaram efetivamente a quantidade de bactérias cultiváveis do intestino do *A. aegypti*.
- A variabilidade de espécies de bactéria constante da microbiota intestinal após o tratamento com carbenicilina e canamicina foi diminuída.
- O tratamento com carbenicilina e canamicina influenciaram na resistência/suscetibilidade do *A. aegypti* ao *P. gallinaceum*.
- Os experimentos de infecção e sequenciamento de DNA bacteriano sugerem que a presença concomitante de *Asaia* e *C.meningosepticum* é importante no estabelecimento da infecção por *P. gallinaceum*.
- A expressão de defensina se mostrou maior 24h e 36h pós-infecção e gambicina em todos os tempos em insetos KNBFI comparado ao grupo SF-Ctr.
- A expressão de defensina se mostrou menor 24h e 36h pós-infecção e gambicina em todos os tempos em CBBFI comparado ao grupo SF-Ctr.
- A carbenicilina atua na microbiota intestinal do *A. aegypti*, e possivelmente causa um desequilíbrio na ativação das vias de imunidade aumentando os níveis de expressão de gambicina e defensina nos insetos CBBF.

7 Referências Bibliográficas

Aguilar R, Jedlicka AE, Mintz M, Mahairaki V, Scott AL, Dimopoulos G. Global gene expression analysis of *Anopheles gambiae* responses to microbial challenge. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 2005; 35:709-719.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 1990; 215: 403–410.

Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature medicine*, 2006; 12: 220-4.

Asling B, Dushay MS, Hultmark D. Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 1995; 25: 511–518.

Augustine AD, Hall BF, Leitner WW. NIAID workshop on immunity to malaria: addressing immunological challenges. *Nature Immunology*, 2009; 10: 673-8.

Bahia AC, Kubota MS, Tempone AJ, Araújo HRC, Guedes BAM, Orfanó AS, et al. The JAK-STAT Pathway Controls *Plasmodium vivax* Load in Early Stages of *Anopheles aquasalis* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011; 11:e1317.

Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, 2001; 31: 621-627.

Beckage NE. *Insect Immunology*. Academic Press/Elsevier. San Diego, CA, 2008.

Beier JC. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 1998; 43: 519-543.

Beier MS. Effects of para-aminobenzoic acid, insulin and gentamycin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera:Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 1994; 31:561-565.

Bignell DE. Introduction to symbiosis, 2000; 189–208. *In* Abe T, Bignell DE, Higashi M, eds, 2000. *Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*. Dordrecht, Neth.: Kluwer.

Billingsley PF, Lehane MJ. *Structure and Ultra-structure of the Insect Midgut*. London: Chapman & Hall, 1996.

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; 9:852–6.

Boman HG. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell*, 1991; 2:205-207.

Boulanger N, Lowenberger C, Volf P, Sigutova L, Sabatier L, Beverley SM, et al. Characterization of a Defensin from the Sand Fly *Phlebotomus duboscqi* Induced by

- Challenge with Bacteria or the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, 2004; 12: 7140-7146.
- Briegel H, Kaiser C. Lifespan of mosquitoes. (Culicidae, Diptera) under laboratory conditions. *Gerontologia*, 1973; 19: 240-249.
- Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and comparative immunology*, 1999; 23:329-44.
- Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G, Van Dorsselaer A, Hoffmann JA. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993; 268:14893–14897.
- Chalk R, Albuquerque CMR, Ham PJ, Townson H. Full sequence and characterization of two insect defensins: Immune peptides from the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the Royal Society of London, Biology*, 1995a; 261: 217–221.
- Chao J, Wistreich GA. Microorganisms from the midgut of larval and adult *Culex quinquefasciatus* Say. *Journal of Insect Pathology*, 1960; 2: 220–224
- Chalk R, Townson H, Ham PJ. *Brugia pahangi*: the effects of cecropins on microfilariae in vitro and in *Aedes aegypti*. *Experimental Parasitology*, 1995b; 3: 401- 406.
- Chao J, Wistreich GA. Microbial isolations from the midgut of *Culex tarsalis* Coquillett. *Journal of Insect Pathology*, 1959; 1: 311–318
- Chavshin AR, Oshaghi MA, Vatandoost H, Pourmand MR, Raeisi A, Enayati AA, et al. Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: A step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta tropica*, 2011; 2:129-134.
- Christophides G, Zdobnov EM, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*, 2002; 298: 159–165.
- Consoli RAG, B Oliveira, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fundação Instituto Oswaldo Cruz, 1994. Rio de Janeiro, Brasil.
- Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 1988; 16:10881-90.
- Dale C, Welburn SC. The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *International journal for parasitology*, 2001; 31:628–31.
- Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, et al. Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microbial ecology*, 2010 ; 3:644-54.
- Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, et al. Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Current biology* , 2008; 23:R1087-8.

- Deepak G, Ghislaine MDC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *International Journal for Parasitology*, 2004; 34:1413-29.
- De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001; 98:(22).
- DeMaio J, Pumpuni CB, Kent M, Beier JC. The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psophora columbiae* mosquitoes. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 1996; 54: 219-223.
- Devenport M, Fujioka H, Jacobs-Lorena M. Storage and secretion of the peritrophic matrix protein Ag-Aper1 and trypsin in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 2004; 13: 349–358.
- Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 2004; 98:71–92.
- Dimarcq JL, Hoffmann D, Meister M, Bulet P, Lanot R, Reichhart JM, Hoffmann JA. Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *European Journal of Biochemistry*, 1994; 221: 201–209.
- Dimopoulos G. Microreview Insect immunity and its implication in mosquito – malaria. *Cellular Microbiology*, 2003; 5: 3–14.
- Dimopoulos G, Christophides GK, Meister S, Schultz J, White KP, Barillas-Mury C, Kafatos FC. Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: Responses to injury, bacterial challenge and malaria infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002; 99: 8814-8819.
- Dimopoulos G, Casavant L, Chang S, Scheetz T, Roberts C, Donohue M. et al. *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: Identification of novel mosquito innate immunity genes from ESTs generated from immune competent cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000; 97: 6619–6624.
- Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A, Kafatos FC. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle, 1998; 21:6115–23.
- Dimopoulos G, Richman a, Müller HM, Kafatos FC. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997; 94: 11508-13.
- Dinglasan RR, Devenport M, Florens L, Johnson JR, Mchugh CA, Carucci DJ, et al. NIH Public Access. *Insect Biochemistry*, 2009; 2:125-134.
- Djadid ND, Jazayeri H, Raz A, Favia G, Ricci I, Zakeri S. Identification of the Midgut Microbiota of *An . stephensi* and *An . maculipennis* for Their Application as a Paratransgenic Tool against Malaria. *Flora*, 2011; 12:6-12.

- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS pathogens*, 2009; 5:e1000423.
- Eyles DE. Studies on *Plasmodium gallinaceum*. Characteristics of the infection in the mosquito, *Aedes aegypti*. *American Journal of Hygiene*, 1951; 54:101-112.
- Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, et al. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007; 21: 9047-51.
- Feder ME, Blair N, Figueras H. Natural thermal stress and heat-shock protein expression in *Drosophila* larvae and pupae. *Functional Ecology*, 1997; 11: 90–100.
- Fehlbaum P, Bulet P, Michaut L, Lagueux M, Broekaert WF, Hetru C, Hoffmann JA. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994; 269: 33159–33163.
- Ferguson HM, Dornhaus A, Beeche A, Borgemeister C, Gottlieb M, Mulla MS, et al. Ecology: a prerequisite for malaria elimination and eradication. *PLoS medicine*, 2010; 7:8.
- Ferguson MJ, Micks DW. Microorganisms associated with mosquitoes: bacteria isolated from adult *Culex fatigans* Wiedemann. *Journal of Insect Pathology*, 1961; 3: 112–119.
- Ffrench-Constant RH. Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control? *Trends in Ecology & Evolution*, 2005; 20: 577–579.
- Filho BPD, Lemos FJA, Secundino NFC, Pascoa V, Pereira ST, Pimenta PFP. Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti* A chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002; 32:1723-1729.
- Foratini OP. *Culicidologia Médica*. Vol. 2. Edusp. São Paulo, 2002.
- Gaio ADO, Gusmão DS, Santos AV, Berbert-Molina MA, Pimenta PFP, Lemos FJA. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasites & vectors*, 2011; 4:105.
- Gao Y, Hernandez VP, Fallon AM. Immunity proteins from mosquito cell lines include three defensin A isoforms from *Aedes aegypti* and a defensin D from *Aedes albopictus*. *Insect Molecular Biology*, 1999; 8: 311-318.
- Garnham PCC. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1966.
- Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitology today*, 2000; 5:196-201.
- Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *Journal of Medical Entomology*, 2003; 3:371-4.

- Graf R, Raikhel AS, Brown MR, Lea AO, Briegel H. Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). *Cell and Tissue Research*, 1986; 245: 19–27.
- Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008; 4:1266-1276.
- Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino, T, Milon G. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 2010; 107: 18640–18645.
- Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PFP, Barillas-Mury C. Midgut epithelial responses of different mosquito-Plasmodium combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005; 11:4010-5.
- Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Bacci M, Berbert-Molina M a, Lemos FJ a. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta tropica*, 2010; 3: 275–81.
- Hillyer JF, Barreau C, Vernick KD. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *International journal for parasitology*, 2007; 6: 673-81.
- Hoffmann JA, Hetru C, Reichhart JM. The humoral antibacterial response of *Drosophila* *FEBS Letters*, 1993; 325: 63-66.
- Hoffmann JA, Hetru C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunology Today*, 1992; 10: 411-5.
- Horton J, Ratcliffe NA, 2001 *Evolution of Immunity* In I. Roitt J, Brostoff, D Male, *Immunology* 6th ed. Toronto, ON: Mosby.
- Ichimori K. Susceptibility of *Anopheles stephensi* and other *Anopheles* strains to *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Japanese Journal of Parasitology*, 1989; 38: 150–151.
- Irving P, Troxler L, Heuer TS, Belvin M, Kopczynski C, Reichhart JM, et al. A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001; 98: 15119–15124.
- Jobling B. *Anatomical drawing of biting flies*. London: British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust Publisher, 1987; 119p.
- Kaneko T, Silverman N. Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cellular microbiology*, 2005; 4:461-9.
- Kaplan RA, Zwiens SH, Yan G. *Plasmodium gallinaceum*: ookinete formation and proteolytic enzyme dynamics in highly refractory *Aedes aegypti* populations. *Experimental Parasitology*, 2001; 98: 115–122.

- Katsura K, Kawasaki H, Potacharoen W, Saono S, Seki T, Yamada Y, et al. *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-proteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2001; 51:559-63.
- Korochkina S, Barreau C, Pradel G, Jeffery E, Li J, Natarajan R, Shabanowitz J, Hunt D, Frevert U, Vernick KD. A mosquito-specific protein family includes a candidate receptor for malaria sporozoite invasion of salivary glands. *Cellular Microbiology*, 2006; 8:163–175.
- Krotoski WA, Collins WE, Bray RS. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1982; 6: 1291–3.
- Kumar S, Molina-Cruz A, Gupta L, Rodrigues J, Barillas-Mury C. A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 2010; 5973:1644-8.
- Kumar S, Gupta L, Han YS, Barillas-Mury C. Inducible peroxidases mediate nitration of anopheles midgut cells undergoing apoptosis in response to Plasmodium invasion. *The Journal of biological chemistry*, 2004; 51:53475-82.
- Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D. The cecropin locus in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection. *European Journal of Biochemistry*, 1990; 9: 217–224.
- Lamberty M, Ades S, Uttenweiler-Joseph S, Brookhart G, Bushey D, Hoffmann JA, et al.. Insect immunity: Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *Insect Immunity Biochemistry*, 1999; 14: 9320 6.
- Lehane MJ, Aksoy S, Gibson W, Kerhornou a, Berriman M, Hamilton J, et al. Adult midgut expressed sequence tags from the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* and expression analysis of putative immune response genes. *Genome biology*, 2003; 10: R63.
- Levashina EA, Ohresser S, Bulet P, Reichhart JM, Hetru C, Hoffmann JA. Metchnikowin, a Novel Immune-Inducible Proline-Rich Peptide from *Drosophila* with Antibacterial and Antifungal Properties. *European Journal of Biochemistry*, 1995; 233: 694–700.
- Levashina EA. Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004; 7: 673-678.
- Lindh JM, Terenius O, Faye I. 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl. Environ. Microbiol*, 2005; 71:7217-7223.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001; 25: 402–408.
- Lowenberger CA, Kamal S, Chiles J, Paskewitz S, Bulet P, Hoffmann JA, et al. Mosquito-*Plasmodium* interactions in response to immune activation of the vector. *Experimental Parasitology*, 1999; 1:59-69.

- Lowenberger C, Bulet P, Charlet M, Hetru C, Hodgeman B, Christensen BM, Hoffmann JA. Insect immunity: Isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995; 7: 867-873.
- Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, Rosenberg R. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998; 10: 5700-5.
- Lumsden WHR, Bertram DS. Observations on the biology of *Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935, in the domestic fowl, with special reference to the production of gametocytes and their development in *Aedes aegypti* (L.). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1940; 34: 135
- Meis JFGM, Verhave JP. Exoerythrocytic development of malaria parasites. *Advances in Parasitology*, 1988; 27: 1– 61.
- Meister S, Agianian B, Turlure F, Relógio A, Morlais I, Kafatos FC, et al. *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. *PLoS pathogens*, 2009; 8: e1000542.
- Meister MB, Lemaître, JA, Hoffmann. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *BioEssays news and reviews in molecular cellular and developmental biology*, 1997; 11: 1019-1026.
- Michel K, Kafatos FC. Mosquito immunity against *Plasmodium*. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 2005; 35: 677–689
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002; 415: 673-679.
- Ministério da Saúde, 2011. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_da_malaria_site_svs_28_12.pdf. Acesso em 05 out 2011.
- Mohanty SS, Prakash S. Extracellular metabolites of *Trichophyton ajelloi* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *Current Science*, 2004; 86: 323–325.
- Molina-Cruz A, DeJong RJ, Charles B, Gupta L, Kumar S, Jaramillo-Gutierrez G, et al. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. *The Journal of biological chemistry*, 2007; 6: 3217–23.
- Mourya DT, Soman RS. Effect of gregarine parasite, *Ascogregarina culicis* & tetracycline on the susceptibility of *Culex bitaeniorhynchus* to JE virus. *The Indian Journal of Medical Research*, 1985; 81: 247–250.
- Neves DP. et. al. *Parasitologia Humana*, 2000 10.ed. São Paulo: Atheneu.
- Nguu EK, Osir EO, Imbuga MO, Olembo NK. The effect of host blood in the in vitro transformation of bloodstream trypanosomes by tsetse midgut homogenates. *Medical and Veterinary Entomology*, 1996; 4: 317-22.

- Osta MA, Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *The Journal of experimental biology*, 2004; 15: 2551-63.
- Pidiyar VJ, Jangid K, Patole MS, Shouche YS. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2004; 6: 597-603.
- Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 1997; 115: 359-369.
- Pimenta PF, Touray M, Miller L. The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1994; 41: 608-624.
- Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998; 64: 3724-3730.
- Pumpuni CB, Beier MS, Nataro JP, Guers LD, Davis JR. *Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria. *Experimental Parasitology*, 1993; 77: 195.
- Pumpuni CB, DeMaio J, Kent M, Davis JR, Beber JC. Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1996; 54: 214-218.
- Rani A, Sharma A, Adak T, Bhatnagar RK. *Pseudoxanthomonas icgebensis* sp. nov., isolated from the midgut of *Anopheles stephensi* field-collected larvae. *Journal of microbiology Seoul Korea*, 2010; 5: 601-606.
- Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC microbiology*, 2009; 9:96.
- Ratcliffe NA, Whitten MMA. Vector immunity. In: Gillespie, S.H., Smith, G.L., Osbourn, A. (Eds.), *Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases*. Cambridge University Press, Cambridge, 2004; 199-262.
- Richman AM, Dimopoulos G, Seeley D, Kafatos FC. *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *The EMBO journal*, 1997; 20: 6114-9.
- Richman AM, Bulet P, Hetru C, Barillas-Mury C, Hoffmann JA, Kafatos FC. Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Molecular Biology*, 1996; 5: 203-210.
- Richman AM, Kafatos FC. Immunity to eukaryotic parasites in vector insects. *Current Opinions in Immunology*, 1995; 8: 14-19.

Riehle MA, Moreira CK, Lampe D, Lauzon C, Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *International Journal For Parasitology*, 2007; 37: 595–603.

Schlein Y, Polacheck I, Yuval B. Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology*, 1985; 90: 57-66.

Scholte EJ, Knols BG, Samson, R.A., Takken, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal Insect Science*, 2004^a; 4: 19.

Secundino NFC, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta, PFP. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. *Journal of Medical Entomology*, 2005; 42: 928-38.

Sherman IW. Carbohydrate metabolism of asexual stages. In *Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection* (ed. I. W. Sherman), 1998a; 135–143. Washington, DC: ASM Press.

Shahabuddin M, Pimenta, PFP. *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 1998; 95: 3385–3389.

Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 1993; 90: 4266–4270.

Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 2001; 2:1 19-25.

Sinden RE. *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia*, 1999; 41: 139–148.

Sinden RE, Billingsley PF. *Plasmodium* invasion of mosquito cells: Hawk or dove? *Trends in Parasitology*, 2001; 17: 209-211.

Sinnis P, Coppi A. A long and winding road: The *Plasmodium* sporozoite's journey in the mammalian host *Parasitology International*, 2007; 3: 171-178.

Smith DC, Douglas AE. *The Biology of Symbiosis*. London: Arnold, 1987; 302 pp.

Soderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 1998; 10: 23-28.

Straif SC, Mbogo CN, Toure AM, Walker ED, Kaufman M, Toure YT, Beier JC. Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *Journal of Medical Entomology*, 1998; 35: 222–226.

Sturm A, Amino R, Van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science (New York, N.Y.)*, 2006; 5791: 1287-90.

- Su X, Hayton K, Wellems TE. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nat Rev Genet*, 2007; 7: 497-506.
- Telang A, Li Y, Noriega FG, Brown MR. Effects of larval nutrition on the endocrinology of mosquito egg development. *The Journal of experimental biology*, 2006; 209: 645-55.
- Theopold U, Li D, Fabbri M, Scherfer C, Schmidt O. The coagulation of insect hemolymph. *Cell and Molecular Life Sciences*, 2002; 59: 363-372.
- Tolle MA. Mosquito-borne Diseases. *Current Problems in Pediatric and Adolescent. Health Care*, 2009; 39: 97-140.
- Tsai YL, Hayward RE, Langer RC, Fidock D a, Vinetz JM. Disruption of *Plasmodium falciparum* chitinase markedly impairs parasite invasion of mosquito midgut. *Infection and immunity*, 2001; 6: 4048-54.
- Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, Hoffmann JA, Imler JL. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*, 2000; 13: 737-748.
- Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Strategies for culture of “unculturable” bacteria. *FEMS microbiology letters*, 2010; 30: 1-7.
- Vizioli J, Catteruccia F, Della Torre A, Reckmann I, Muller HM. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *European Journal of Biochemistry*, 2001; 268: 4027.
- Weiss B, Aksoy S. Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in parasitology*, 2011; 20: 1-9.
- Welburn SC, Maudlin I. Tsetse-trypanosome interactions: rites of passage. *Parasitology Today*, 1999; 15: 399-403.
- Welburn SC, Arnold K, Maudlin I, Gooday GW. *Rickettsia*-like organisms and chitinase production in relation to transmission of trypanosomes by tsetse flies. *Parasitology*, 1993; 107: 141-145.
- Wells TN, Burrows JN, Baird JK. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends in Parasitology*, 2010; 3: 145-51.
- Wicker C, Reichhart JM, Hoffmann D, Hultmark D, Samakovlis C, Hoffmann JA. Insect immunity. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the dipterin family of immune peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990; 265: 22493-22498.
- Wilkins S, Billingsley PF. Oligosaccharides on midgut microvillar glycoproteins of the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 2001; 31: 937-948.
- World Health Organization, 2011; Malaria. Fact sheet N° 94 April, 2010. World Health Organization, Geneva

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS pathogens, 2008; 7: e1000098.

Yamada Y, Katsura K, Kawasaki H, Widyastuti Y, Saono S, Seki T, et al. *Asaia bogorensis* gen . nov ., sp . nov ., an α -Proteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000; 823–9.

Yukphan P. *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004; 2: 313-316.

Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: an urgent need. Trends in Parasitology, 2002; 18: 161–163.