



Universidade Federal de Rondônia – UNIR
Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental -
PGBIOEXP

Frances Tatiane Tavares Trindade

MANIPULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DE *Anopheles darlingi*
(DIPTERA: CULICIDAE) PARA BLOQUEIO DA TRANSMISSÃO DE
Plasmodium vivax

Orientador: Dr. Alexandre de Almeida e Silva.

Porto Velho-RO

2016

FRANCES TATIANE TAVARES TRINDADE

**MANIPULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DE *Anopheles darlingi*
(DIPTERA: CULICIDAE) PARA BLOQUEIO DA TRANSMISSÃO DE
*Plasmodium vivax***

Orientador: Dr. Alexandre de Almeida e Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP) do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia como pré-requisito para a obtenção do título de doutor em Biologia Experimental.

Porto Velho-RO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

T833m

Trindade, Frances Tatiane Tavares.

Manipulação do sistema imune de *anopheles darlingi*(diptera:culicidae) para bloqueio da transmissão de *plasmodium vivax* / Frances Tatiane Tavares Trindade. - Porto Velho, Rondônia, 2016.

106f.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Almeida e Silva

Tese (Doutorado em Biologia experimental) - Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR

1.Biologia. 2.Malária.3.Mosquitos.4.Oocistos. I.Silva, Alexandre de Almeida e. II.Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR.III. Título.

CDU: 576.8:616.9

Bibliotecária Responsável: Carolina Cavalcante CRB11/1579

FRANCES TATIANE TAVARES TRINDADE

**MANIPULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DE *Anopheles darlingi*
(DIPTERA: CULICIDAE) PARA BLOQUEIO DA TRANSMISSÃO DE
*Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de doutorado.

Banca examinadora

Dr Alexandre de Almeida e Silva
Presidente

Dra Deusilene Vieira
Examinador 1

Dra Genimar Julião
Examinador 2

Dr. Gabriel Eduardo Melim Ferreira
Examinador 3

Dra Aurea Silveira
Examinador 4

Dedico este trabalho aos meus pais Felisberto e Cristina que com simplicidade e muito amor estiveram integralmente ao meu lado me apoiando e me ensinando o melhor e mais digno modo de trilhar meu próprio caminho.

Amo vocês!

"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

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Rondônia e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental pela formação.

Ao Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais-IPEPATRO/FIOCRUZ-RO por alocar toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão de bolsa e financiamento do projeto.

Ao meu orientador Dr. Alexandre de Almeida e Silva pela enorme paciência e compreensão nesses dez anos de orientação e por tornar todo esse trabalho possível. Serei eternamente grata por todas as oportunidades e por toda a confiança. Muito obrigada pela orientação e ensinamentos na vida acadêmica e também por ter me ajudado a ser uma pessoa melhor. Você é um espelho profissional e pessoal e sinto-me muito privilegiada por ser sua aluna.

Aos pesquisadores Neal Silverman e Douglas Golembok da UMASS, pela oportunidade de trabalhar nesse projeto e pelo subsidio na Biologia Molecular.

A equipe do laboratório de Entomologia do IPEPATRO/FIOCRUZ-RO, principalmente: Raimundo e Marlon pelo auxílio na criação dos mosquitos e experimentos. Aos chefes desse laboratório Jansen Medeiros, Genimar Julião e Luiz Herman Gil por todo o apoio e acolhimento nesse projeto.

Aos amigos do LABEIN/UNIR, Laboratório de Bioecologia de Insetos, pela ajuda nas coletas e criação de mosquitos.

Aos Dr. Dhelio Batista Pereira e Tony Katsuragawa e toda sua equipe pelo auxílio com a triagem e coletas de amostras dos pacientes.

A plataforma de PCR em tempo real da Fiocruz Amazonas, pelo apoio nas análises moleculares.

Aos amigos do laboratório de Entomologia da Fiocruz Amazonas, especialmente ao Dr. Felipe Pessoa e Cláudia Rios Velásquez, por todo apoio e acolhimento.

Aos amigos do laboratório de Virologia da Fiocruz RO, especialmente a Dra. Deusilene Vieira, pelos empréstimos e doações de reagentes de Biologia Molecular.

As amigas Lilian Motta e Iasmin Pimentel, e todo o laboratório de genética humana pela ajuda e todo o auxílio, principalmente na primeira etapa do projeto.

As minhas irmãs, Fran Macauache e Cris Macauache, que me apoiaram em todos os momentos da minha vida e me ensinaram a melhor parte de mim.

Ao meu esposo Leandro Costa por todo seu apoio, amor, paciência, dedicação e por ter me dado o maior presente de todos: Nosso Felipe Macauache. Obrigada, meu amor, por melhorar a minha vida e me fazer melhor! Amo vocês.

Aos meus amigos, pelo apoio e compreensão, em especial ao Moreno Rodrigues por ter sido o melhor amigo de todos e por todo apoio, incentivo e puxões de orelha.

Aos membros da banca pelo interesse e disponibilidade.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs- Conjunto de moléculas efetoras

ANOVA- Análise de variância

CAAE- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

cDNA- DNA complementar

CEPEM- Centro de Pesquisa em Medicina Tropical

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DDT- DICLORODIFENILTRICLORETANO

dsRNAs- Double-stranded RNA (RNA de dupla fita)

TNF- Fator de Necrose Tumoral

FIOCRUZ-RO- Fundação Oswaldo Cruz Rondônia

H₂O- Água

IMD- *Immune deficiency*

IPEPATRO- Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais

LPS- Lipopolissacarídeos

mRNAs- RNA mensageiro

MS- Ministério da Saúde

nl- Nanolitro

OMS- Organização Mundial de Saúde

OPP- Prophenoloxidasas

PAMPs- Pathogens associated molecular patterns, ou padrões moleculares associados aos patógenos

PGN- Peptidoglicano

Pias- *Protein Inhibitor of activate STAT*

PNCM- Programa Nacional de Controle da Malária

PRRs- Pattern recognition receptors, ou receptores de reconhecimento padrões

qPCR- Quantitative real time polymerase chain reaction, ou reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

REL- Relish

RNAi- Interferência mediada por RNA

RP49- Ribosomal Protein 49, ou proteína ribossomal 49

siRNAs- small interfering RNAs

SIVEP- Sistema Informatizado de Vigilância Epidemiológica

Socs- *Suppressor of cytokine signaling*

STAT- *Signal Transducers and Activators of Transcription*

SVS- Sistema de Vigilância em Saúde

TEP- *Thioester-containing-protein 1*

UMASS- *University of Massachusetts*

UpD- *unpareid*

WHO- World Health Organization

µg- Micrograma

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ - Micrograma por Microlitro

μL - Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Distribuição mundial da malária em 2015	Pág. 21
Figura 02: Mapa de risco de transmissão de malária por município de infecção, Brasil, 2015	Pág. 23
Figura 03: Proporção de casos de malária notificados, por espécie, na Região Amazônica, Brasil.	Pág. 24
Figura 04: Estágios correspondentes ao ciclo de vida de um mosquito. A – Ovo; B – Larva; C –Pupa; D – Adulto	Pág. 26
Figura 05: Principais espécies de anofelinos (Diptera: Culicidae) no mundo	Pág. 27
Figura 06: Principais espécies de anofelinos (Diptera: Culicidae) nas Américas	Pág. 28
Figura 07: Esquema do ciclo de transmissão da malária, envolvendo mosquitos e humanos	Pág. 30
Figura 08: Ciclo de desenvolvimento do <i>Plasmodium</i> sp no mosquito	Pág. 31
Figura 09: Divisão de populações de hemócitos em mosquitos	Pág. 35
Figura 10: Esquema de ativação da resposta imunológica de <i>Anopheles gambiae</i> para parasitas <i>Plasmodium</i>	Pág. 37
Figura 11: Esquema de ativação da resposta imunológica, incluindo proteínas, nos diferentes estágios de <i>Plasmodium</i>	Pág. 38
Figura 12: Representação esquemática das respostas imunológicas efetoras de <i>A. gambiae</i> contra <i>Plasmodium spp</i> , compostos por barreiras físicas, respostas imunes locais e sistêmicas	Pág. 39
Figura 13: Vias Toll (A) e IMD (B) do sistema imune de <i>Drosophila melanogaster</i>	Pág. 42

Figura 14: Esquema de sinalização imune das vias Toll e IMD envolvidas na defesa anti- <i>Plasmodium</i>	Pág. 43
Figura 15: Esquema do silenciamento por RNAi	Pág. 46
Figura 16: Pontos de coleta das fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> em regiões Peri urbanas e rurais Porto Velho de Rondônia	Pág. 50
Figura 17: Coleta de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> pelo método de atração humana protegida	Pág. 51
Figura 18: Oviposição induzida dos mosquitos <i>Anopheles darlingi</i> (A) para obtenção de larvas e F1 utilizados nos bioensaios	Pág. 52
Figura 19: Criação de mosquitos <i>Anopheles darlingi</i> para utilização nos bioensaios: (A) Manutenção de Larvas; (B) Manutenção de Adultos	Pág. 53
Figura 20. Fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> anestesiadas (B) Injeções de RNAi, no tórax dos mosquitos, utilizando-se um micro injetor (Nanoject)	Pág. 55
Figura 21. Alimentação do mosquito <i>Anopheles darlingi</i> gotícula de dsRNA em solução açucarada durante os experimentos de administração do dsRNA por ingestão	Pág. 56
Figura 22. Gotícula de acetona/RNAi (3:1) aplicado com utilização de micropipeta sobre o abdome de <i>Anopheles darlingi</i>	Pág. 57
Figura 23. Esquema do experimento de diferentes métodos de aplicação de dsRNA para silenciamento dos genes Cactus (TOLL) e Caspar (IMD) em <i>Anopheles darlingi</i> (Diptera: Culicidae)	Pág. 57

- Figura 24.** Coleta de sangue de paciente diagnosticado com malária vivax por exame de gota espessa, com parasitemia acima de duas cruzes. (A) Material utilizado na Coleta; (B) Punção de Veia para Coleta de Sangue a Vácuo; (C e D) Coleta da Amostra de Sangue Infectado com *P. vivax* Pág. 60
- Figura 25.** Alimentação sanguínea dos adultos de *Anopheles darlingi* em alimentadores artificiais. (A) Tubo de Sangue com Amostra de Paciente a 38°C; (B) Abastecimento dos Alimentadores Artificiais com Amostra de Sangue de Paciente e (C) Alimentação Artificial dos Mosquitos Pág. 62
- Figura 26.** Oocistos de *P. vivax* em mosquitos positivos dissecados nos experimentos de ativação das vias IMD e TOLL e bloqueio da infecção (A) mosquito não infectado, (B) mosquito infectado mostrando oocistos (pontos vermelhos) Pág. 63
- Figura 27.** Esquema do experimento de injeções de RNAi para bloqueio de infecção de *Plasmodium vivax* em *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Pág. 63
- Figura 28.** Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após injeções de diferentes dsRNAs Pág. 66
- Figura 29.** Níveis de transcrição relativos de Cactus (A), um regulador negativo Toll e Caspar (B), um regulador negativo IMD, em fêmeas adultas de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) injectados com dsRNA Pág. 67
- Figura 30.** Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após ingestão de diferentes dsRNAs em solução açucarada a 10% Pág. 68
- Figura 31.** Níveis de transcrição dos genes Cactus (A) e Caspar (B) analisado por PCR em tempo real em adultos de *Anopheles darlingi* após a alimentação com dsRNA em solução açucarada a 10% Pág. 69
- Figura 32.** Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após aplicação tópica de diferentes dsRNAs Pág. 70
- Figura 33.** Níveis de transcrição do gene Cactus (A) e Caspar (B) analisado por PCR em tempo real em adultos de *Anopheles* Pág. 71

darlingi após aplicação tópica de dsRNAs

Figura 34. Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após injeção de diferentes RNAi e infecção com sangue infectado por *Plasmodium vivax* Pág. 72

Figura 35. Frequência de infecção de *Plasmodium vivax* em *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) depois de silenciar os reguladores negativos da via Toll (Cactus) e IMD (Caspar) Pág. 73

Figura 36. Número de oocistos de *Plasmodium vivax* em *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) após silenciamento de Cactus (TOLL) e Caspar (IMD) Pág. 74

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Conjuntos de iniciadores construídos para análise da expressão dos genes de interesse do sistema imune de *Anopheles darlingi* por PCR em Tempo Real (qPCR) e para a síntese de RNA de dupla fita (T7) para os experimentos de silenciamento por RNAi

RESUMO

Na Amazônia, especificamente no estado de Rondônia, o mosquito *Anopheles darlingi* é um importante vetor de *Plasmodium vivax*, a principal espécie de parasita causador de malária humana nas Américas. Alguns componentes das vias de sinalização do sistema imune, IMD e Toll, podem modular a infecção por *Plasmodium* nos mais diversos anofelinos. Portanto, este estudo avaliou de forma inédita o papel do silenciamento dos reguladores negativos Caspar e Cactus das vias de IMD e Toll, respectivamente, e seu efeito na taxa de infecção e produção de oocistos de *Plasmodium vivax* no principal vetor da malária no norte do Brasil, *Anopheles darlingi*. Para avaliar a ativação das vias IMD e TOLL, os dsRNAs foram oferecidos de diferentes maneiras, *i.e.*, microinjeção, ingestão e aplicação tópica observando-se a sobrevivência diária e o silenciamento dos genes. Os grupos injetados foram avaliados quanto ao bloqueio da infecção por *Plasmodium vivax* em *An. darlingi*, sendo os mosquitos injetados com dsRNA de Caspar, Cactus e LacZ (dsRNA controle). Após 3 dias, os mosquitos foram alimentados com sangue infectado por *P. vivax* usando um sistema de membrana artificial. No oitavo dia, os mosquitos foram dissecados e com auxílio de estereoscópio o número de mosquitos infectados (taxa de infecção) e oocistos foram contados (carga infecção). A sobrevivência dos mosquitos injetados com dsRNA Cactus foi afetada em relação aos demais tratamentos. Nos demais métodos, a mortalidade foi menor até o terceiro dia, além da técnica ser menos laboriosa. O silenciamento causado pelo método de ingestão foi muito semelhante ao método clássico de microinjeções, mas a aplicação tópica não causou o silenciamento dos genes como desejado. As injeções de dsRNA de Cactus e Caspar diminuíram significativamente o nível de expressão destes genes (86,3 e 80,4%, respectivamente) e a média do número de oocistos (65,7 e 89,6%, respectivamente), em comparação com as fêmeas não manipuladas de *An. darlingi*. Por outro lado, a taxa de infecção por *Plasmodium vivax* foi apenas diferente para os mosquitos injetados com dsRNA de Caspar. Foram avaliados os métodos alternativos de aplicação de dsRNA, mas deve ser investigado quanto a eficiência no bloqueio da infecção.

Palavras-chave: RNAi, malária, mosquitos, oocistos e microscopia.

ABSTRACT

In the amazon, specifically in TO state, the mosquito *Anopheles darlingi* is an important vector of *Plasmodium vivax*, the main species of human malaria in the Americas. Some components of the immune pathways, IMD and Toll, can modulate the infection by *Plasmodium* in other anophelines. Therefore, this study evaluated in an unprecedented manner role of silencing of negatives regulators Caspar and Cactus of IMD and Toll pathways, respectively, and their effect on the rate of infection and production of oocyst the *Plasmodium vivax* in the main vector in northern Brazil, *Anopheles darlingi*. To evaluate the activation of the IMD and toll pathways the dsRNAs were offered in different ways, i.e., microinjection, oral and topical and was observed survival and silencing of genes. The injected groups were evaluated for blockade of infection by *Plasmodium vivax* in *An. darlingi*, and mosquitoes injected with dsRNA Caspar, Cactus and lacZ (dsRNA control). After 3 days, mosquitoes were fed a blood infected with *P. vivax* using an artificial membrane system. On the eighth day, the mosquitoes were dissected and with the aid of stereoscopic the number of infected mosquitoes (infection rate) and oocysts were counted (load infection). The survival of mosquitoes injected with dsRNA Cactus was affected compared to other treatments. In other methods, mortality was lower until the third day, besides the technique is less laborious. The silencing caused by ingestion was very similar to the classic method of microinjection, but the topical application not caused silencing genes as desired. The Injections of dsRNA Cactus and Caspar significantly decreased the level of expression of these genes (86.3 and 80.4%, respectively) and the average number of oocysts (65.7 and 89.6% respectively) compared with females unmanipulated of *An. darlingi*. On the other hand, the infection rate of *Plasmodium vivax* was only different for mosquitoes injected with dsRNA Caspar. Were evaluated alternative methods for the application of dsRNA, but should be investigated for efficiency in blocking the infection.

Key words: RNAi, malaria, mosquitoes, oocysts and microscopy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Pág. 21
1.1 Malária	Pág. 21
1.2 Mosquitos como Vetores de Doenças	Pág. 25
1.3 Infecção de Anofelinos por <i>Plasmodium sp.</i>	Pág. 29
1.4 Sistema Imune dos Insetos	Pág. 32
1.5 RNAi e Imunidade	Pág. 44
2. JUSTIFICATIVA	Pág. 47
3. OBJETIVOS	Pág. 49
3.1 Objetivo Geral	Pág. 49
3.2 Objetivos Específicos	Pág. 49
4. MATERIAIS E METÓDOS	Pág. 50
4.1 Coleta e Criação de Mosquitos	Pág. 50
4.2 Obtenção das sequências de Caspar e Cactus de <i>Anopheles darlingi</i> e produção de dsRNA	Pág. 53
4.3 Avaliação do silenciamento de Caspar e Cactus em <i>Anopheles darlingi</i> utilizando diferentes métodos	Pág. 55
4.4 Extração do RNA Total dos mosquitos	Pág. 58

4.5 PCR em Tempo Real (qPCR)	Pág. 59
4.6 Coleta de Sangue, Aspectos Éticos, Determinação de Parasitemia e Contagem de Gametócitos	Pág. 59
4.7 Avaliação do silenciamento dos genes Caspar e Cactus e da alimentação com sangue infectado por <i>Plasmodium vivax</i> na sobrevivência, taxa de infecção e produção de oocistos em <i>Anopheles darlingi</i>	Pág. 61
4.8 Análise dos Dados	Pág. 64
5. RESULTADOS	Pág. 65
5.1 Sobrevivência diária de <i>Anopheles darlingi</i> e Silenciamento dos Genes Caspar e Cactus Utilizando Diferentes Métodos de Aplicação de dsRNA	Pág. 65
5.2 Sobrevivência diária de <i>Anopheles darlingi</i> Após Injeção de dsRNA e Infecção pelo <i>Plasmodium vivax</i>	Pág. 71
5.3 Análise do Efeito do Silenciamento de Caspar e Cactus na Infecção de <i>Anopheles darlingi</i> e Produção de Oocistos de <i>Plasmodium vivax</i>	Pág. 72
6. DISCUSSÃO	Pág. 75
6.1 Sobrevivência diária de <i>Anopheles darlingi</i> e silenciamento dos genes Caspar e Cactus utilizando diferentes métodos de aplicação de dsRNA	Pág. 75
6.2 Sobrevivência diária de <i>Anopheles darlingi</i> após Injeção de dsRNA e Infecção pelo <i>Plasmodium vivax</i>	Pág. 79
6.3 Efeito do Silenciamento de Caspar e Cactus na Infecção e Produção de Oocistos de <i>Plasmodium vivax</i> em <i>Anopheles darlingi</i>	Pág. 82
CONCLUSÃO	Pág. 88

PERSPECTIVAS

Pág. 89

REFERÊNCIAS

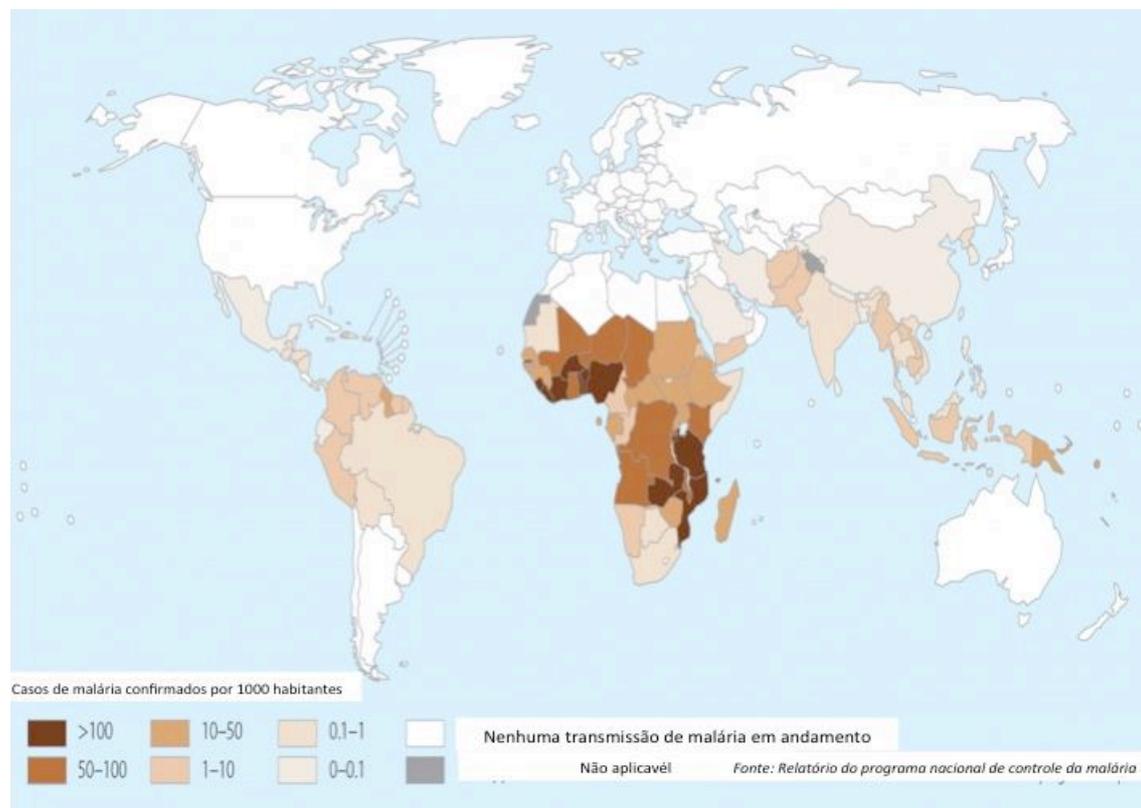
Pág. 90

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A Malária humana é um dos principais problemas de saúde pública da atualidade, principalmente devido ao grande impacto populacional e custos atribuídos aos sistemas de saúde inerentes a essa doença. Estima-se que cerca de 40% da população mundial (~3 bilhões de pessoas), distribuídas em aproximadamente 110 países de regiões tropicais e subtropicais, habitem áreas de risco de contrair a doença (Figura 1) (OMS 2015).

Figura 1. Distribuição mundial da malária em 2015 (Fonte: Adaptado de OMS, 2015)



Em 2015 mais de 200 milhões de casos de malária foram reportados no mundo, dos quais aproximadamente 430.000 evoluíram para óbito. As mortes ocorrem principalmente em crianças menores de cinco anos de idade que vivem no continente Africano (OMS, 2015).

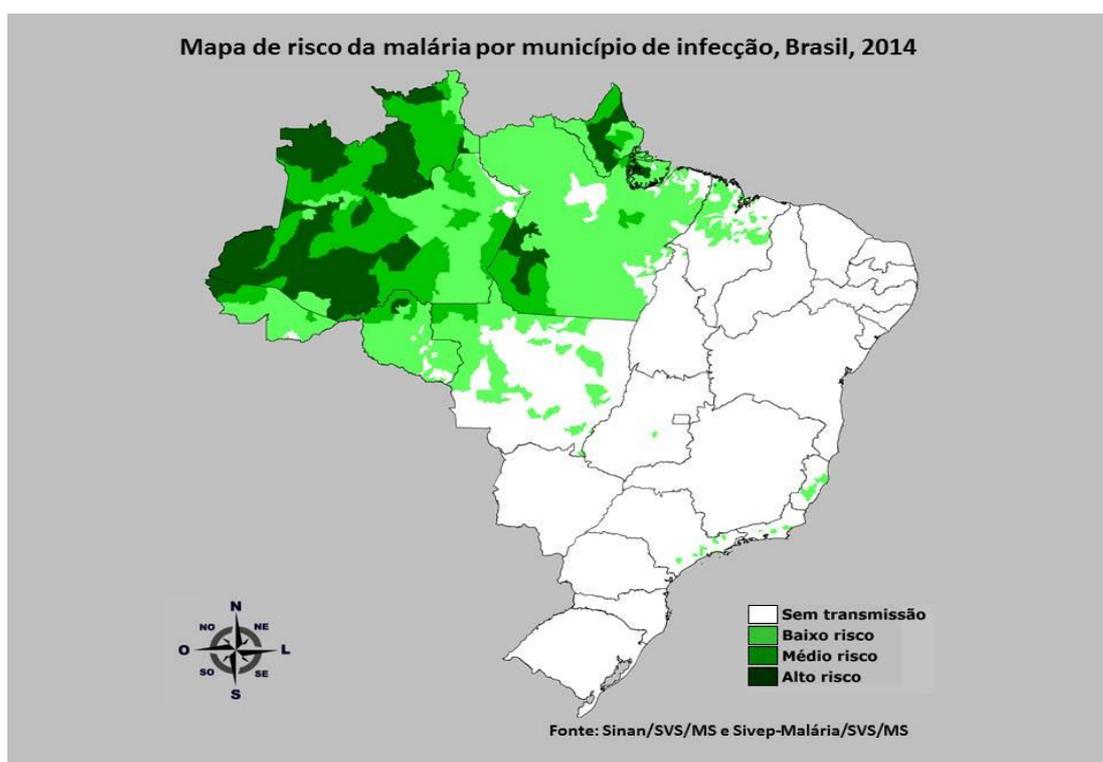
A doença é transmitida ao homem durante a alimentação sanguínea de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas com *Plasmodium* (NEVES, 1998). Esses parasitas são heteroxênicos, pois seu ciclo de vida depende de dois hospedeiros, o vertebrado onde acontece a esquizogônia e o invertebrado onde ocorre a reprodução sexuada (NEVES, 1998; FORATINNI, 2002; SU et al., 2007; REY, 2008). Dentre as várias espécies de parasitas conhecidas, apenas cinco espécies são capazes de infectar o homem, sendo essas *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*, esta última espécie é encontrada no Sul asiático como patógeno natural de macacos constituindo, sendo a mais recentemente descrita e considerada como a quinta espécie capaz de parasitar o homem, especialmente em regiões asiáticas (NEVES, 1998; WHITE, 2008). No Brasil ocorrem apenas três espécies de parasito, no entanto as mais recorrentes são o *P. falciparum* e o *P. vivax* os quais são responsáveis por 15 e 83,7%, respectivamente, de todos os casos reportados no Brasil (MS, 2015; SIVEP, 2016).

O *P. falciparum* é responsável por causar a forma mais grave da doença. Sabe-se que durante a infecção por essa espécie, o paciente pode apresentar o quadro de malária cerebral, no qual ocorre a obstrução dos vasos sanguíneos responsáveis por irrigar o cérebro, além de causar falência renal e edema pulmonar, o que frequentemente leva o paciente a óbito (ANSTEY et al., 2009; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; WHO, 2015). Já o *P. vivax* que era considerado o responsável por infecções brandas e benignas, pode causar quadros clínicos graves e incomuns eventualmente levando a óbito, causando grande morbidade em comunidades endêmicas (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Além disso, o *P. vivax*, tem apresentado cepas resistentes a cloroquina, além da capacidade de permanecer latente nos hepatócitos na forma de hipnozoítos, o que pode levar a recaídas até

anos depois da infecção, aumenta o seu sucesso e dificulta o controle (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

De todas as regiões da América, o Brasil é o país que apresenta a maior incidência de casos de malária reportados, sendo que mais de 99,9% desses são registrados na região Amazônica (OMS, 2015). Na região extra-amazônica, onde ocorre a malária residual, a maioria dos casos são importados, em maior parte da região Amazônica brasileira e o em menor número de países africanos (Figura 2) (MACHADO et al., 2003).

Figura 2. Mapa de risco de transmissão de malária por município de infecção, Brasil, 2015
(Fonte: SIVEP/MALÁRIA, 2015)

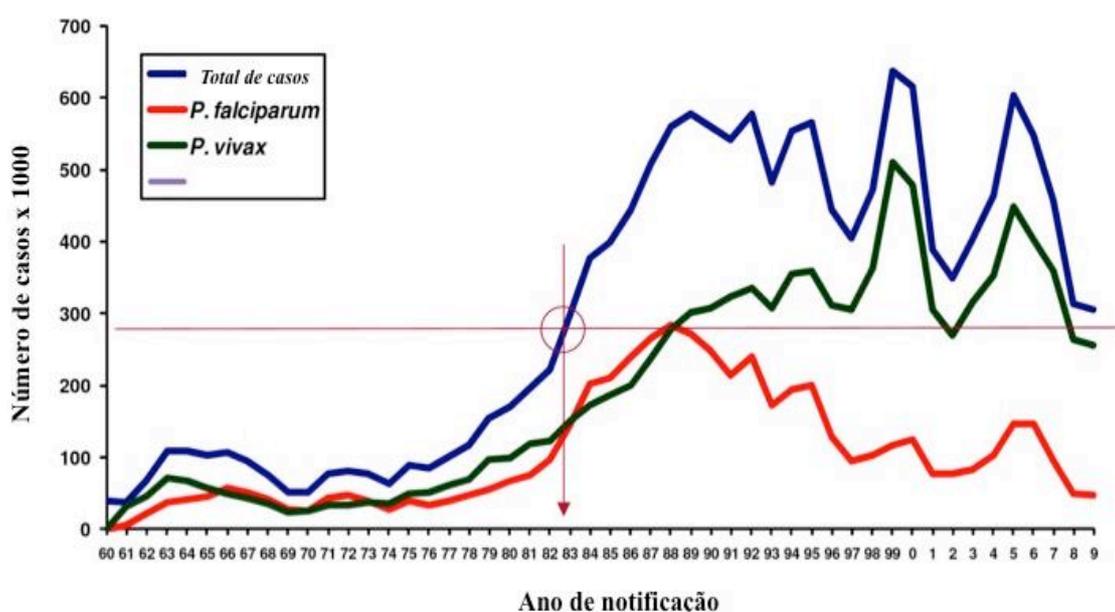


Amazonas, Pará e Rondônia são os estados brasileiros que mais sofrem com a doença, uma vez que juntos são responsáveis por 50% dos casos de malária no país. Em 2015, houve redução de aproximadamente 1%

no número de casos autóctones em comparação com 2014, passando de 139.204 para 138.069 (SIVEP, 2016).

Desde de 2006, a incidência de malária por cada 1000 habitantes no Brasil vem apresentado uma redução (Figura 3). Na análise por estado, em 2015, o Maranhão (71%) apresentou a maior queda, seguido de Rondônia (29%), Pará (17%) e Acre (14%). No estado de Rondônia, em 2014 foram registrados apenas 10.216 casos da doença e em 2015, 7.373, queda de 28% no número de casos (SIVEP, 2016).

Figura 3. Proporção de casos de malária notificados, por espécie, na Região Amazônica, Brasil (Fonte: Adaptado de OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010)



Esse sucesso na redução é, parcialmente, devido ao estabelecimento do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), que visa controlar e prevenir a malária de forma permanente. As estratégias contemplam: (i) apoio à estruturação dos serviços locais de saúde, (ii) diagnóstico e tratamento precoce, (iii) vigilância e controle vetorial, (iv) educação em saúde, comunicação, (v) pesquisa e sustentabilidade política (MS, 2003).

Contudo, a malária é uma doença que não pode ser negligenciada e entre as principais preocupações para esse problema encontram-se: (i) o

elevado fluxo migratório entre áreas endêmicas e não endêmicas, o que poderia causar a reintrodução da malária em municípios onde a mesma foi erradicada; (ii) aumento em sua letalidade devido a diagnóstico tardio e manejo clínico inadequado. Atualmente, o Brasil apresenta 5.276 municípios que estão em prevenção de reintrodução de casos de malária, 219 em processo de eliminação da doença e 75 onde a mesma está devidamente controlada (MS, 2015).

Especialmente em RO, pois, embora o índice da doença tenha diminuído, este estado é historicamente muito afetado por malária (TADA et al., 2012; KATSURAGAWA et al., 2013).

1.2 Mosquitos como Vetores de Doenças

Os insetos, para completar seu ciclo de desenvolvimento, necessitam da ingestão de carboidratos, usualmente procedentes de seivas, flores e frutos (CHARLES & JONNISON, 2011). Apesar disso, em alguns grupos as fêmeas apresentam algumas particularidades como o hábito hematofágico, ou seja, é imprescindível que estas se alimentem de uma fonte sanguínea, pois é fundamental, para algumas espécies, e está relacionado primordialmente ao desenvolvimento dos ovos (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Essa necessidade nutricional é fundamental na dinâmica vetorial de transmissão de doenças.

Contudo, a associação de insetos com doenças foi reconhecida somente no fim do século XIX, quando cientistas descobriram que a filariose bancroftiana e a malária eram transmitidas por mosquitos. Um dos grandes pesquisadores essenciais para consolidar as pesquisas sobre associação de mosquitos com doenças, sobretudo a malária, foi Ronald Ross, que em 1897 observou e descreveu oocistos no estômago de mosquitos que haviam se alimentado sobre um paciente com malária (NEVES, 1998; REY, 2008), pois, anteriormente, acreditava-se que a única inconveniência causada por esses insetos era o incômodo ocasionado por sua picada e a única coisa a ser feita

era evitá-los. E só a partir disso que os pesquisadores começaram a investigar mais detalhadamente a biologia desses animais, a fim de descobrir seus pontos mais vulneráveis com a finalidade de combatê-los mais facilmente (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Dentre os insetos que apresentam importância médica e veterinária encontram-se os pertencentes a ordem Diptera e família Culicidae, composta por insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa, conhecidos popularmente como mosquitos, muriçocas e carapanãs. As fases imaturas são aquáticas, divididas em: (i) ovos, (ii) larvas, quatro estádios larvais e (iii) pupa. Já os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e em sua grande maioria são hematófagos (Figura 4) (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 4. Estágios correspondentes ao ciclo de vida de um mosquito. A – Ovo; B – Larva; C – Pupa; D – Adulto. (Disponível em: http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/mosquitphotos_anopheles.htm#annulipes > Acesso em 16 jul. 2016).

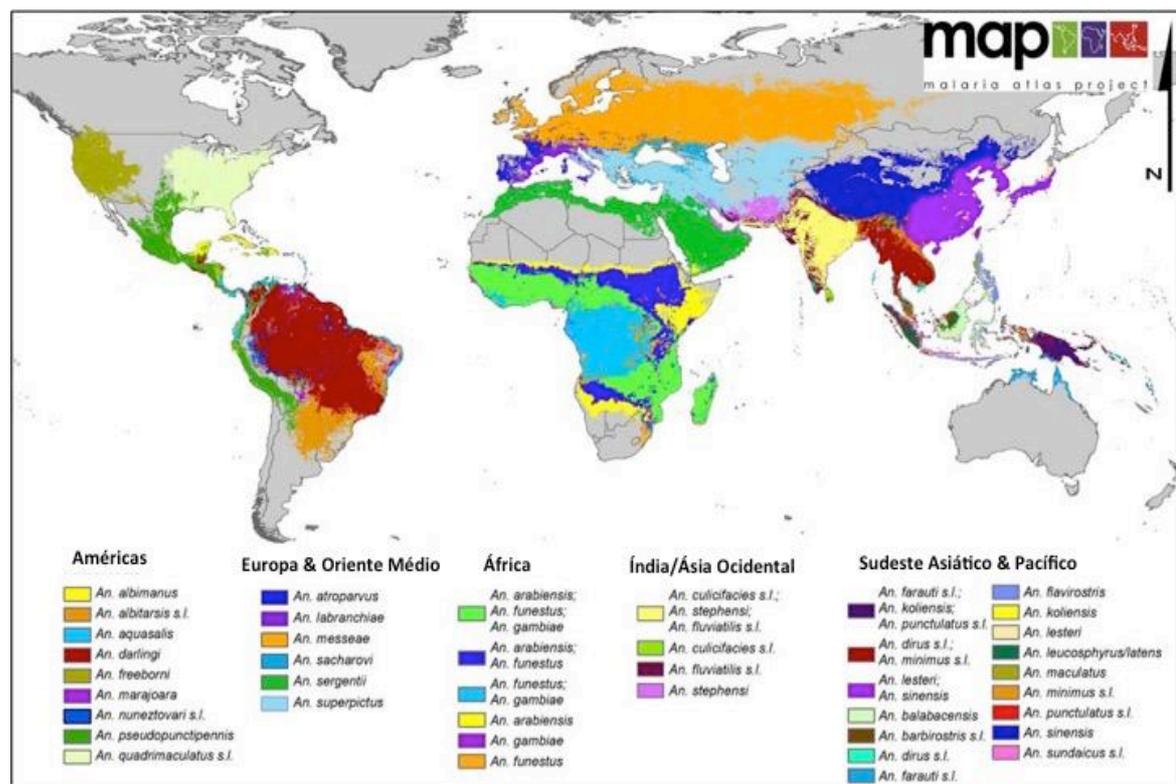


Os mosquitos dessa família estão agrupados nas subfamílias Toxorhynchitinae, de probóscide curvada para baixo e para trás, cujas fêmeas não se alimentam de sangue de vertebrados, e na Culicinae e Anophelinae, onde se encontram as espécies com importância médica, já que as fêmeas são hematófagas (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Os componentes da subfamília Anophelinae são conhecidos como anofelíneos ou anofelinos, divididos em três gêneros: *Anopheles*, cosmopolita; *Chagasia*, restrito à região neotropical e *Bironella*, existente apenas na região australiana (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Atualmente, no mundo, conhece-se cerca de 400 espécies de anofelinos (Figura 5), mas somente cerca de 45 delas são incriminadas como vetores ou potenciais vetores de malária e, sob condições naturais e apenas 30 apresentam importância epidemiológica (SINKA et al., 2012).

Figura 5. Principais espécies de anofelinos (Diptera: Culicidae) no mundo. (Fonte: Adaptado de Sinka, 2012)



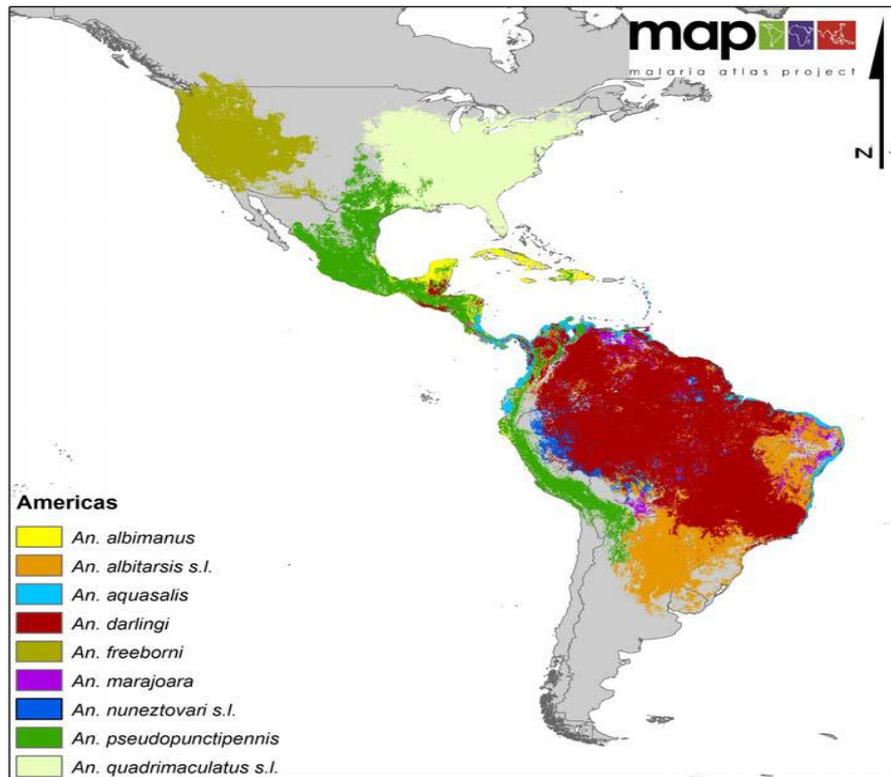
A importância de determinada espécie como vetora depende da região de interesse, por exemplo, no continente Africano *Anopheles gambiae* s.s e espécies pertencentes ao complexo *Anopheles funestus* desempenha papel

crucial na epidemiologia da doença (KRYWINSKI & BESANSKY, 2003; SINKA et al., 2012).

Na Ásia, a co-dominância de espécies é mais acentuada do que a encontrada no continente Africano, com o complexo *Anopheles culicifacies*, *Anopheles stephensi* e o *Anopheles fluviatilis* complexo simpátrico na Índia. O *Anopheles dirus* e *Anopheles minimus* dominam juntos em grande parte do Sudeste Asiático (SINKA, et al., 2012).

Da mesma forma, que ocorre no continente Americano, em que a frequência com que as espécies são encontradas varia de uma região para outra, acontece nas Américas. Na América do Norte, por exemplo, as espécies mais frequentes são *Anopheles freeborni*, *Anopheles quadrimaculatus* s.l., *Anopheles pseudopunctipennis*. Sendo que, essa última espécie mais presente na América Central, seguido de *Anopheles darlingi* e *Anopheles albimanus*. Já na América do Sul, a espécie predominante é o *An. darlingi*, *Anopheles pseudopunctipennis* e complexo *Anopheles albitarsis* s.l, respectivamente (Figura 6) (SINKA, et al., 2012).

Figura 6. Principais espécies de anofelinos (Diptera: Culicidae) nas Américas (Fonte: Adaptado de Sinka, 2012)



No Brasil, as espécies consideradas importantes transmissoras de malária são: *Anopheles darlingi*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles albitarsis* s.l., *Anopheles cruzi* s.l., *Anopheles belattor* (FORATTINI, 2002; MS, 2006; WHO, 2015). Contudo, o mosquito *An. darlingi* é considerado o principal vetor em toda a América do Sul, sendo responsável pela transmissão da maioria dos casos de todo o Brasil (SINKA et al., 2012).

O sucesso que essa espécie apresenta na transmissão da malária se deve principalmente devido a três fatores: (i) ampla distribuição geográfica, (ii) alto grau de antropofilia e endofagia e (iii) susceptibilidade à infecção por plasmódios (DEANE, 1986; TADEI et al., 1998, KLEIN, et al., 2001). Sabe-se que essa espécie é capaz de transmitir qualquer uma das três espécies de *Plasmodium* que circulam no Brasil (e.g. *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*) (RACHOU 1958; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; TADEI et al., 1998 MORAIS et al., 2012). Especificamente em Porto Velho-RO essa espécie equivale a mais de 90% das espécies capturadas, sendo

considerada a responsável por 95% dos casos reportados (GIL et al., 2003; GIL et al., 2007; MORAIS et al., 2012).

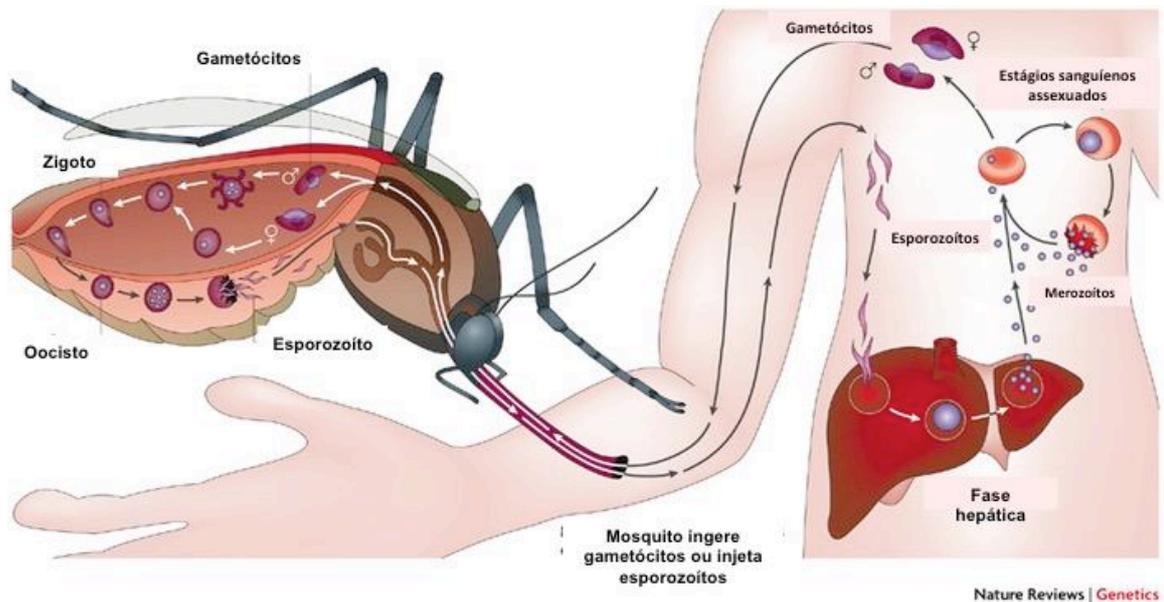
1.3 Infecção de anofelinos por *Plasmodium* sp

Os parasitas da malária para completarem o seu ciclo de vida precisam de dois hospedeiros diferentes: um vertebrado e outro invertebrado. No caso da malária humana, o hospedeiro invertebrado trata-se de uma fêmea de anofelino (FORATINNI, 2002).

A transmissão do *Plasmodium* começa quando um mosquito infectado inocula, durante o repasto sanguíneo, junto com a saliva, esporozoítos no hospedeiro humano que invadem os vasos sanguíneos. Pela circulação sanguínea os parasitas chegam ao fígado e invadem as células hepáticas e se desenvolvem em esquizontes multinucleados (NEVES, 1998; REY, 2008).

Os esquizontes transformam-se em merozoítos, forma que, quando liberada na corrente sanguínea, infectam os eritrócitos. Dentro dos eritrócitos os merozoítos se reproduzem assexuadamente e liberam novos merozoítos através da ruptura das hemácias. Alguns desses merozoítos transformam-se em gametócitos e outros continuam invadindo células vermelhas e repetindo o ciclo assexuado (Figura 7) (REY, 2008).

Figura 7. Esquema do ciclo de transmissão da malária, envolvendo mosquitos e humanos
(Fonte: Adaptado de Su et al., 2007)



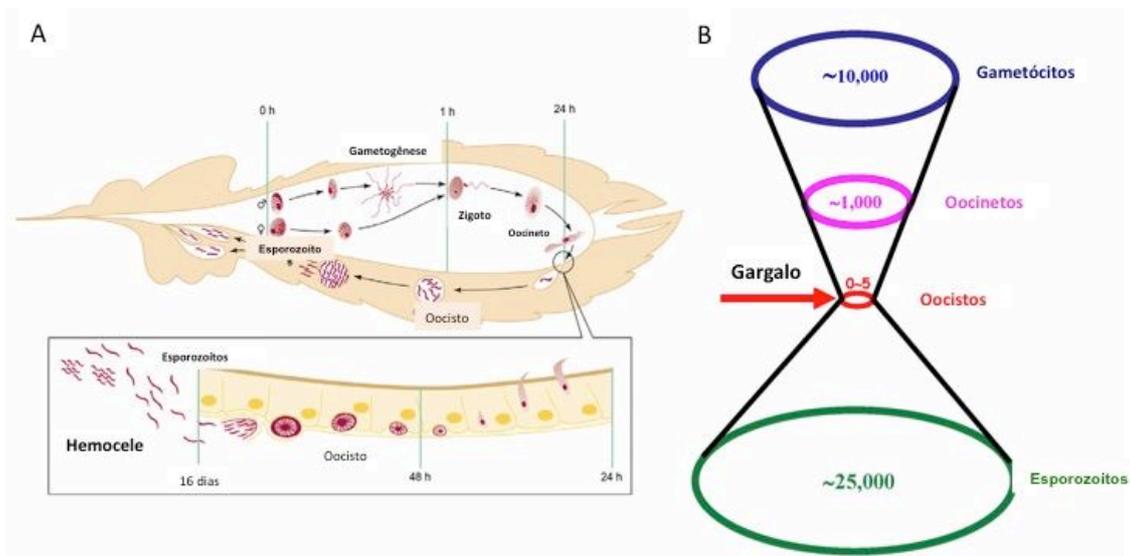
Para que seja estabelecida uma infecção no vetor, durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, os mosquitos devem ingerir gametócitos masculinos e femininos. Dentro do intestino médio esses gametócitos se transformam, por gametogênese, em microgametas (masculinos) e macrogametas (femininos). Ocorre a fecundação desses gametas formando zigotos que se diferenciam em oocinetos móveis. Esses oocinetos atravessam a matriz peritrófica e, na lâmina basal, ocorre a formação dos oocistos, os quais se transformam em milhares de esporozoítos que são liberados na hemocele e se alojam nas glândulas salivares. Com isso, em um novo repasto sanguíneo esses mosquitos podem infectar um novo hospedeiro (REY, 2008, SU et al., 2007; CHEN et al., 2008).

A primeira barreira enfrentada pelos parasitos, quando ingeridos pelos mosquitos, é o aparelho digestivo. Durante todo o ciclo do *Plasmodium* no inseto vetor é observado uma grande perda de parasitas. Isso ocorre devido a ação de um grande número de enzimas digestivas presentes (WANG & LORENA, 2013).

O desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito é complexo e envolve várias etapas de desenvolvimento no intestino médio (gametogênese, fertilização, formação de zigoto, oocinetos e formação de oocistos) e do cruzamento de dois epitélios do mosquito (intestino médio e glândula salivar). O mosquito quando se alimentar de sangue infectado ingere milhares de gametócitos, porém apenas cerca de 10% desenvolvem-se com sucesso em oocinetos e somente cerca de cinco deles apresentam sucesso em invadir o epitélio do intestino médio para formar oocistos (Figura 8) (DREXLER et al., 2008; WANG & LORENA, 2013).

Logo após essa etapa, ocorre a amplificação drástica do número de parasitas, onde cada oocisto libera milhares de esporozoítos na hemocele que em seguida invadem as glândulas salivares desses mosquitos (CRISTOPHIDES, 2004; WHITTEN et al., 2006). Com isso, o alvo principal para combater ou interferir no ciclo do parasita no vetor é o intestino (WANG & LORENA, 2013).

Figura 8. Ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito (Fonte: Adaptado de Wang & Lorena, 2013)



Visto que, quando o parasita cruza essa primeira barreira, depara-se com uma eficiente barreira imunológica, que modula a competência vetorial

dos mosquitos e que, nos últimos anos, tem sido fortemente estudada (KUMAR et al., 2004; VLASHOU et al., 2005; GARVER et al., 2009).

Algumas pesquisas evidenciam que espécies de *Anopheles* vetores eliminam muitos dos parasitas após o repasto sanguíneo (> 80%), enquanto algumas das espécies refratárias podem eliminar os parasitas completamente, sendo a maior parte do controle do parasita mediado pela resposta imune do mosquito através de mecanismos efetores múltiplos do sistema imune. Essas defesas antiparasitos incluem a lise, melanização, óxido nítrico, entre outros (DIMOPOULOS et al., 1997; DIMOPOULOS et al., 2001; SILVA, 2002; FROLET et al., 2006; GUPTA et al., 2009; MEISTER et al., 2009; MITRI et al., 2009; HYLLETER et al., 2014).

Com isso, a manipulação da resposta do sistema imune inato dos mosquitos surge como uma proposta auxiliar para o controle integrado da malária, e tem provado ter uma eficiente resposta contra as infecções dos plasmódios (DIMOPOULOS et al., 1997; DIMOPOULOS et al., 2001; MITRI et al., 2009).

1.4 Sistema Imune dos Insetos

Como os insetos habitam os mais diversos tipos de ambientes, entram em contato com grande variedade de patógenos. Portanto, para diminuir o risco de se infectarem, estes desenvolveram barreiras físicas e mecanismos muito eficientes de defesa celular e humoral (LEMAITRE & HOFFMAN, 2007).

Contudo, o sistema imunológico desse grupo é desprovido de memória, *i.e.*, não produzem, linfócitos e nem sintetizam imunoglobulinas (anticorpos), sendo essas as células e proteínas específicas da imunidade adquirida ou exclusiva de todos os vertebrados (SILVA, 2002). Porém, trabalhos mais recentes mostram que nesse grupo ocorrem mecanismos de resposta imunológica inata, moléculas que se assemelham aos anticorpos

("priming") e outras parecidas com linfócitos que são conhecidas como hemócitos (DONG et al., 2006; HILLYER et al., 2014).

As primeiras barreiras imunes nos insetos são estruturais, compostas por exoesqueleto - protege órgãos e hemolinfa do contato direto com o ambiente, matriz peritrófica - auxilia na digestão e confere proteção contra o contato direto e revestimento de quitina na traquéia- proteção contra o contato direto com microorganismos (PIMENTA et al., 1997; SODERHALL & CERENIUS, 1998; SHAO et al., 2001; THEOPOLD et al., 2002; SECUNDINO et al., 2005).

Quando os microorganismos invasores rompem essas barreiras estruturais, ativam a resposta celular e humoral nos insetos, através da ativação da resposta imune inata (LEMAITRE & HOFFMAN, 2007).

A resposta imune inata é uma sofisticada rede de reconhecimento de patógenos acionada com a entrada do agente invasor no organismo invadido o qual é reconhecido como organismo não próprio. No caso dos insetos, esse reconhecimento é feito através da interação entre padrões moleculares associados aos patógenos (*PAMPs*) e receptores de reconhecimento padrões (*PRRs*) do hospedeiro. Os *PAMPs* podem ser componentes das membranas celulares dos patógenos como peptidoglicanos (*PGN*) e lipopolissacarídeos (*LPS*). Os *PRRs* são peptídeos localizados na superfície das células hospedeiras (DIMOPOULOS et al., 1997; LEMAITRE & HOFFMAN, 2007).

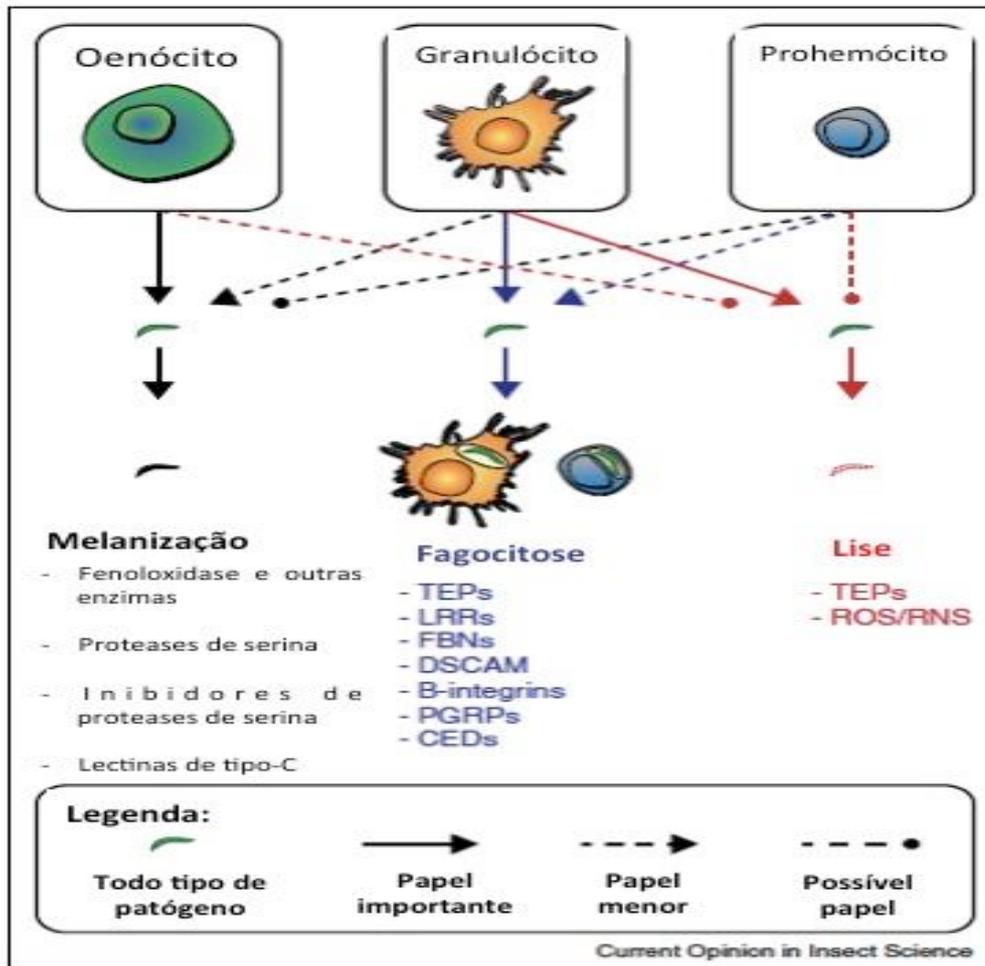
Após o reconhecimento do patógeno, em vários grupos de insetos, podem ser ativadas tanto a resposta humoral quanto a celular, indicando que as respostas de defesa celular e humoral são coordenadas juntamente (LAVINE & STRAND, 2002).

Vários tecidos estão envolvidos na regulação e ativação da resposta imune, no entanto, as principais células e órgãos que participam da resposta imune dos insetos são: corpo gorduroso (principal órgão do sistema imune dos insetos), células epiteliais e hemócitos (DIMOPOULOS et al., 1997, 1998; RICHMAN et al., 1997).

As defesas celulares tradicionais em mosquitos abrangem fagocitose, encapsulamento e melanização, mas o tipo de resposta dominante está associado ao tipo de patógeno (LAI et al., 2002; BLANDIN et al., 2007; HILLYER et al., 2003, 2004, 2010).

Os hemócitos mediam a resposta imune celular e participam da resposta imune humoral. São encontrados em circulação (hemócitos circulantes) e também ligados a tecidos (hemócitos sésseis). Alguns dos hemócitos sésseis estão agregados em torno das válvulas (óstios) do coração, e são chamados hemócitos periosteais (Figura 9) (HILLYER, 2015). Já os hemócitos circulantes estão distribuídos livremente pela hemolinfa e fazem parte dos principais mediadores de defesas imunitárias celulares insetos, sendo que durante a invasão de bactérias, fungos, vírus ou protozoários, migram ao local da infecção, fagocitam e destroem esses patógenos (HILLYER et al., 2014). São descritas três populações de hemócitos: (i) granulócitos, (ii) oenócitos e (iii) prohemócitos, os quais participam diretamente das defesas celulares fazendo fagocitose, encapsulamento e formação de nódulos e atuando junto com a defesa humoral (SILVA, 2002; HILLER et al., 2014) (Figura 9).

Figura 9. Divisão de populações de hemócitos em mosquitos (Fonte: Adaptado de Hyllner et al., 2014)



As respostas de defesa mediada por hemócitos são reguladas por fatores e moléculas efetoras que controlam a adesão celular e citotoxicidade de sinalização. Sabe-se que as respostas imunes celular e humoral são ativadas conjuntamente e além disso existe um cruzamento importante entre os sistemas imunitário e nervoso que pode também desempenhar um papel na regulação de respostas inflamatórias em insetos durante a infecção (LAVINE & STRAND, 2002).

A coagulação é um processo celular importante e ocorre com a ativação de proteínas via cascata de serino proteases que são mediadas por dois genes diferentes: anexina e fibrogênio. Esses dois genes são ativados e

altamente expressos em *Drosophila*, logo após lesões (CRISTENSEN et al., 2005).

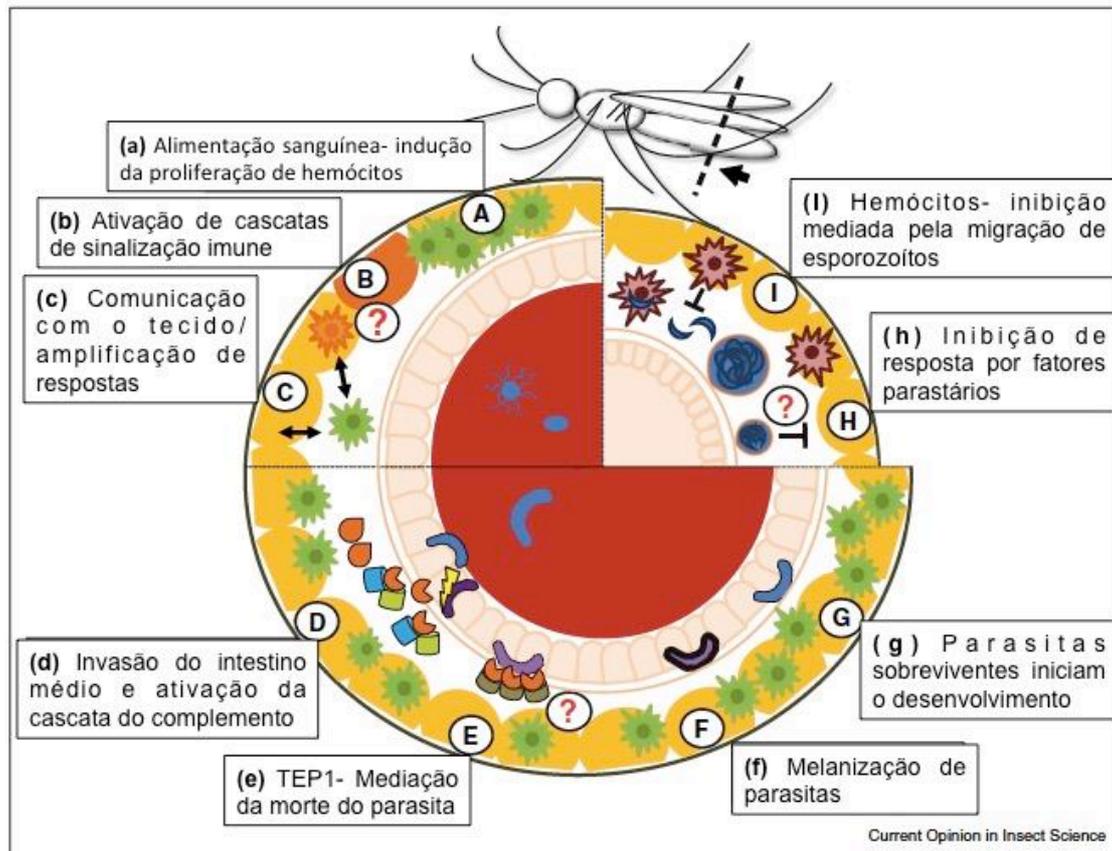
O processo de melanização é fundamental na resposta imune de invertebrados e consiste na deposição de melanina como resultado da ativação de Profenoloxidasas (OPP) em volta de microorganismos (CHRISTENSEN et al., 2005). Os oenocitóides ou granulócitos são ativados e clivam OPP, ativando uma cascata de serino-proteases, que através de uma segunda cascata catalítica, geram melanina e radicais livres que são secretados e depositados em feridas ou em torno de patógenos, formando uma cápsula que rodeia e inativa os parasitas moribundos (Figura 9) (CHRISTOPHIDES et al., 2002; CASTILLO et al., 2006; NAPPI et al., 2009).

Em linhagens de mosquitos resistentes à infecção por *Plasmodium*, nota-se que, normalmente, os parasitas são mortos através da melanização (COLLINS et al., 1986). Em mosquitos susceptíveis, o número de parasitas apresenta enorme variabilidade durante a propagação dentro do vetor, sendo que a maior diminuição no número de parasitas ocorre durante o cruzamento de oocinetos pelo epitélio do intestino (BLANDIN et al., 2004).

A fagocitose é um processo celular importante no sistema imune de insetos, mediada por hemócitos (DIMOPOULOS et al., 2001; LEVASHINA, 2004; MICHEL, 2005). Consiste na ativação de hemócitos através do reconhecimento de um patógeno, englobamento e destruição e digestão intracelular. Todo esse processo ocorre com a associação de PRR's que são ligadas a PAMP's, que auxiliarão no reconhecimento e processamento do invasor por internalização (DIMOPOULOS et al., 1997; LEMAITRE e HOFFMAN, 2007).

Nos mosquitos para que haja a opsonização, marcação por opsoninas ou fragmentos do complemento que facilitam a fagocitose, dos invasores ocorre a ativação de proteínas do tipo TEP (*Thioester-containing-protein 1*), semelhantes as proteínas do sistema complemento humano C3 (Figura 10) (GARVER et al, 2009).

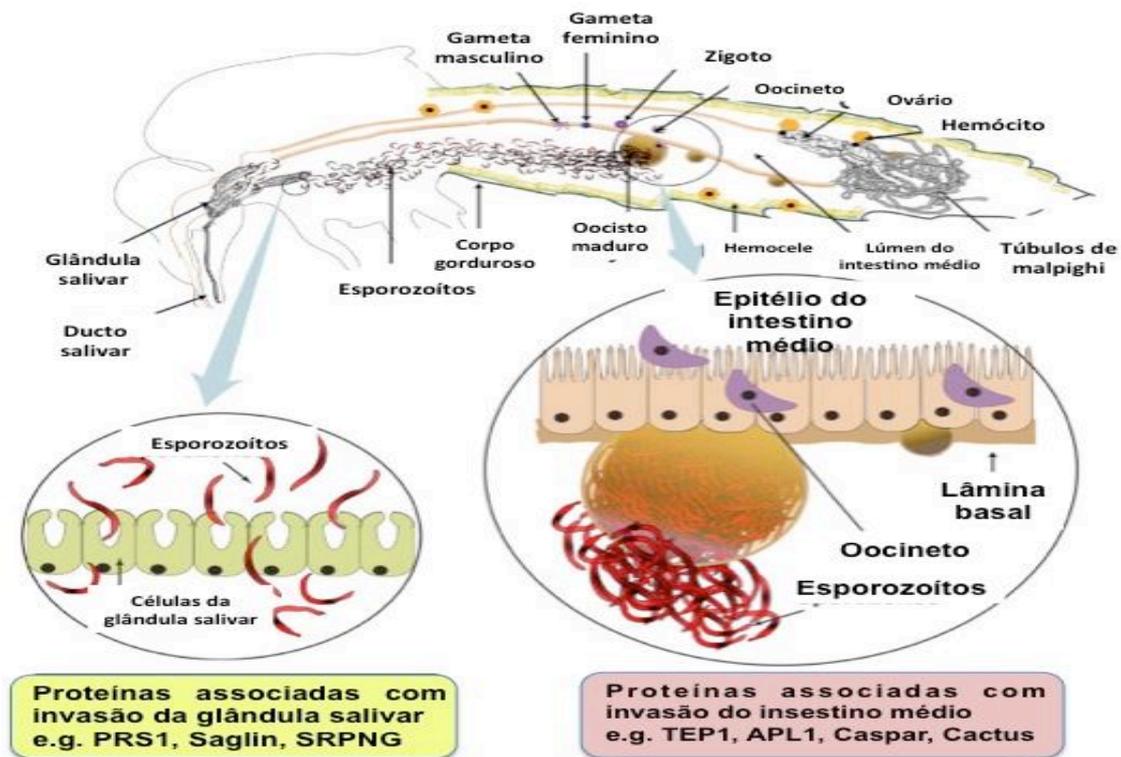
Figura 10. Esquema de ativação da resposta imunológica de *Anopheles gambiae* para parasitas *Plasmodium* (Fonte: Adaptado de Severo et al., 2014)



Em infecções malarígenas, a fagocitose de oocinetos por hemócitos somente foi observada *in vitro*. *In vivo*, a eliminação dos oocinetos ocorre através da amplificação dos sinais reconhecidos e ativação de vias de transdução de sinais (BLANDIN et al., 2007).

A partir disso, nota-se que esse sistema é complexo e eficiente. Envolvendo não só proteínas, mas também mecanismos que auxiliam no reconhecimento dos mais diferentes patógenos e nos seus mais diversos estágios (Figura 11).

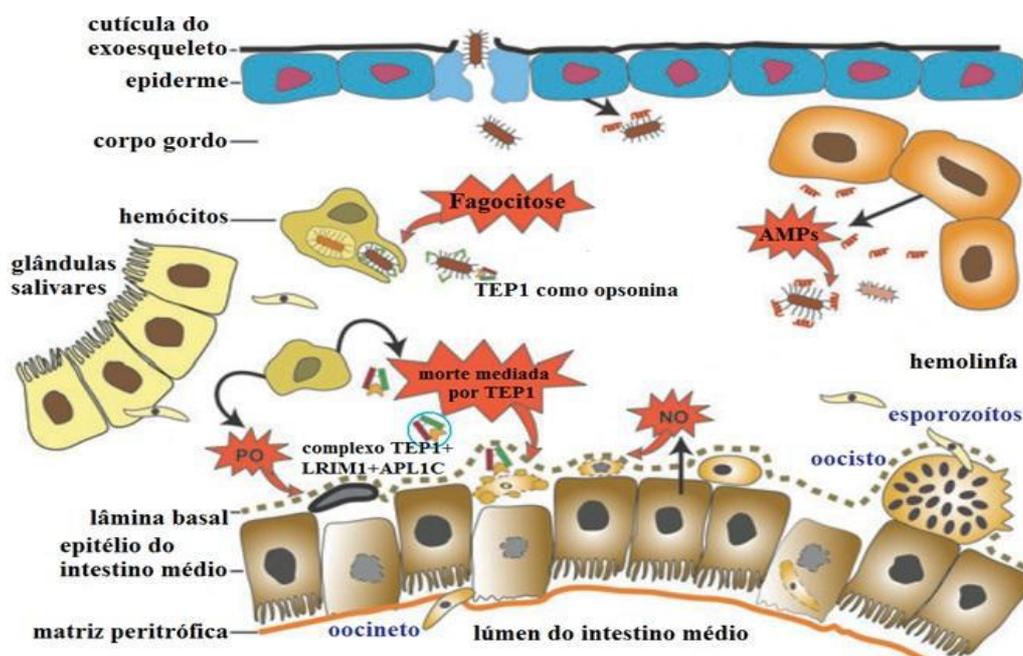
Figura 11. Esquema de ativação da resposta imunológica, incluindo proteínas, nos diferentes estágios de *Plasmodium* (Disponível em: <https://www.linkedin.com/pulse/what-future-mosquitoes-major-killers-humans-around-rodas-martini>. Acesso em 16 jul. 2016)



Os componentes da resposta humoral são proteínas solúveis encontradas na hemolinfa, sendo que estas levam algumas horas ou dias para alcançarem concentração efetiva no combate ao invasor, sendo a maior parte delas inibidora de fungos e bactérias (Figura 12) (SILVA, 2002). Esse tipo de resposta é dividida em quatro etapas: (i) reconhecimento de moléculas patogênicas não próprias (PAMP's por PRR's), (ii) amplificação dos sinais reconhecidos, (iii) ativação de um conjunto de moléculas efetoras (AMPs) e cascatas de coagulação, (iv) aumento das moléculas imunitárias, através da ativação das vias de sinalização como Toll, IMD (*Immune deficiency*) e STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)

(DIMOPOULOS et al., 2001; CHRISTOPHIDES et al., 2002; SEVERO et al., 2014).

Figura 12. Representação esquemática das respostas imunológicas efetoras de *A. gambiae* contra *Plasmodium* spp., compostos por barreiras físicas, respostas imunes locais e sistêmicas (Fonte: Adaptado de Yassine & Osta, 2010)



Dentro do mecanismo de defesa humoral estão as vias de sinalização do sistema imune, que regulam a resposta imunológica dos insetos. As vias Toll, IMD e JAK-STAT, são vias chaves nas respostas de sinalização do sistema imune inato dos insetos. As duas primeiras foram descobertas e caracterizadas primeiramente em *Drosophila melanogaster* (AGGARWAL & SILVERMANN 2008) e a terceira em mamíferos (CIRIMOTICH et al., 2010);

Vários estudos com *Drosophila* tiveram importante papel para o conhecimento a cerca dos mecanismos moleculares subjacentes ao reconhecimento e transdução de sinais na resposta imune de dípteros (LEMAITRE & HOFFMAN, 2007; AGGARWAL & SILVERMANN 2008; GUPTA et al., 2009; MEISTER et al., 2009; MITRI et al., 2009). O sistema de *Drosophila* não oferece muito a respeito das respostas antiparasitos, mas

provam ser de grande importância no estudo das respostas contra bactérias e fungos, além de fornecer as bases para as quais as respostas imunes de mosquitos pudessem ser consideradas.

Em *Drosophila* está bem estabelecido que a resposta das vias IMD e Toll detectam uma grande diversidade de micróbios patogênicos, através da ativação de fatores de transcrição da família NF- κ B, que induzem uma robusta bateria de genes anti-microbianos, especialmente, genes de peptídeos anti-microbianos (GUPTA et al., 2009; MEISTER et al., 2009).

Essas vias apresentam importância central no controle da infecção por *Plasmodium* em *An. gambiae* (FROLET et al., 2006; GUPTA et al., 2009; MEISTER et al., 2009; MITRI et al., 2009) e mais recentemente, no Brasil, a via Jack-Stat no mosquito *An. aquasalis* foi capaz de modular a infecção por *P. vivax* (BAHIA et al., 2010). Esses estudos comprovam que os anofelinos de diferentes espécies podem ter seu sistema imune manipulado, e com isso aumentar a atividade antiparasito.

A maior via de sinalização do sistema imune de insetos é a via clássica Toll. Esta via é composta por receptores transmembrana tipo Toll que reconhecem principalmente fungos e bactérias gram-positivas. Em *Drosophila*, por exemplo, detecta bactérias com peptoglicanos tipo lisina, fungos com β -glucanos, assim como proteases liberadas por uma gama de patógenos.

Após o reconhecimento, a ativação da via Toll por micróbios e produtos microbianos leva, através de uma via de sinalização bastante conservada, a ativação de dois homólogos da família NK- κ B, Dorsal e DIF, com isso o domínio intracelular de Toll interage com um adaptador (MyD88, Tube ou Pelle) e promove a degradação da proteína Cactus, que inibe o fator de transcrição Rel (GUPTA et al., 2009).

Uma vez que Cactus é degradado, Rel age induzindo a expressão de diversos genes antifúngicos e anti-bactérias gram-positivas, que dirigem a transcrição de ambas repostas humoral sistêmica e a resposta celular imune (GUPTA et al., 2009).

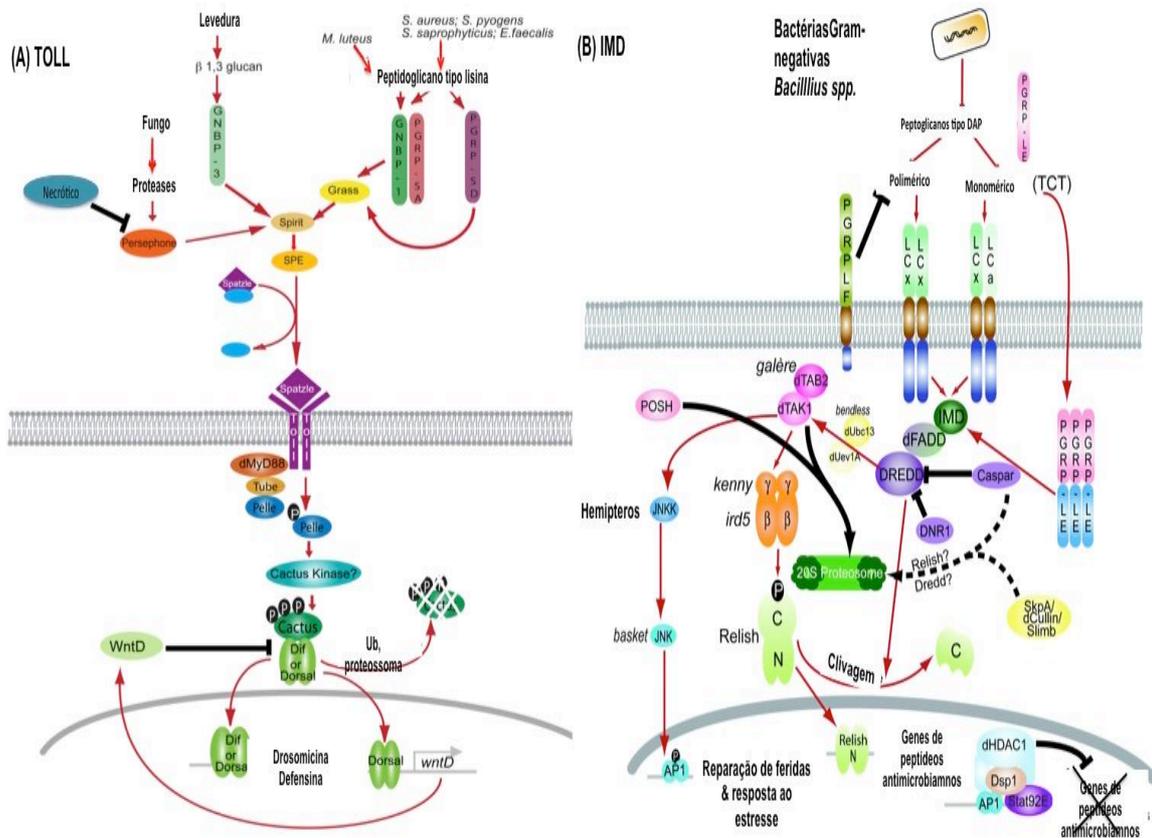
A segunda grande via de sinalização do sistema imune de insetos é a IMD. Esta via é comparada ao fator de necrose tumoral (TNF) em mamíferos (AGGARWAL & SILVERMAN, 2008; KANEKO & SILVERMAN, 2005).

Os peptoglicanos tipo DAP (de bactérias gram-negativas) disparam a via IMD culminando na ativação de um terceiro homólogo da família NF- κ B, Relish, e esse, por sua vez, dirige a transcrição de uma bateria de genes antimicrobianos e outros efetores anti-bacterianos, sendo está responsável por reações contra bactérias gram-negativas e esse tipo de infecção induz a síntese de diversos peptídeos antimicrobianos (HOFFMANN et al., 2002).

A terceira via principal de sinalização é a JAK-STAT, sua denominação deve-se as quinases (Jak) e fatores de transcrição (STAT) que controlam a sua ativação. Em *Drosophila*, esta via tem apresentado desempenho importante na resposta imune contra infecção bacteriana no intestino (BUCHON et al., 2009) mas também tem sido associado com a imunidade antiviral (DOSTERT et al., 2005). A ativação dessa via ocorre após a junção de citocinas da família *unpaired* (UpD) ao receptor transmembrana denominado Domeless. Com isso, ocorre a fosforilação da proteína Jak que fosforilam o Dome, criando sítios de domínio para a proteína STAT, que também sofre fosforilação e dimeriza. Os dímeros formados translocam o núcleo e ativam a transcrição de genes efetores. São dois os reguladores negativos nessa via, (i) Pias (*Protein Inhibitor of activate STAT*) e Socs (*Suppressor of cytokine signaling*) (CIRIMOTICH et al., 2010).

As vias IMD e Toll apresentam respostas transcricionais que se sobrepõem, mas são diferentes. A figura 13 mostra o conhecimento atual sobre as vias IMD e Toll em *Drosophila*, abrangendo elementos sinalizadores positivos e reguladores negativos (sendo os negativos o foco desse projeto, em amarelo). As vias IMD e Toll nos mosquitos podem não funcionar exatamente como em *Drosophila*, de fato, algumas diferenças são aparentes nos detalhes do reconhecimento de microorganismos (AGGARWAL & SILVERMAN, 2008).

Figura 13. Vias Toll (A) e IMD (B) do sistema imune de *Drosophila melanogaster* (Fonte: Adaptado de Aggarwal & Silverman, 2008)

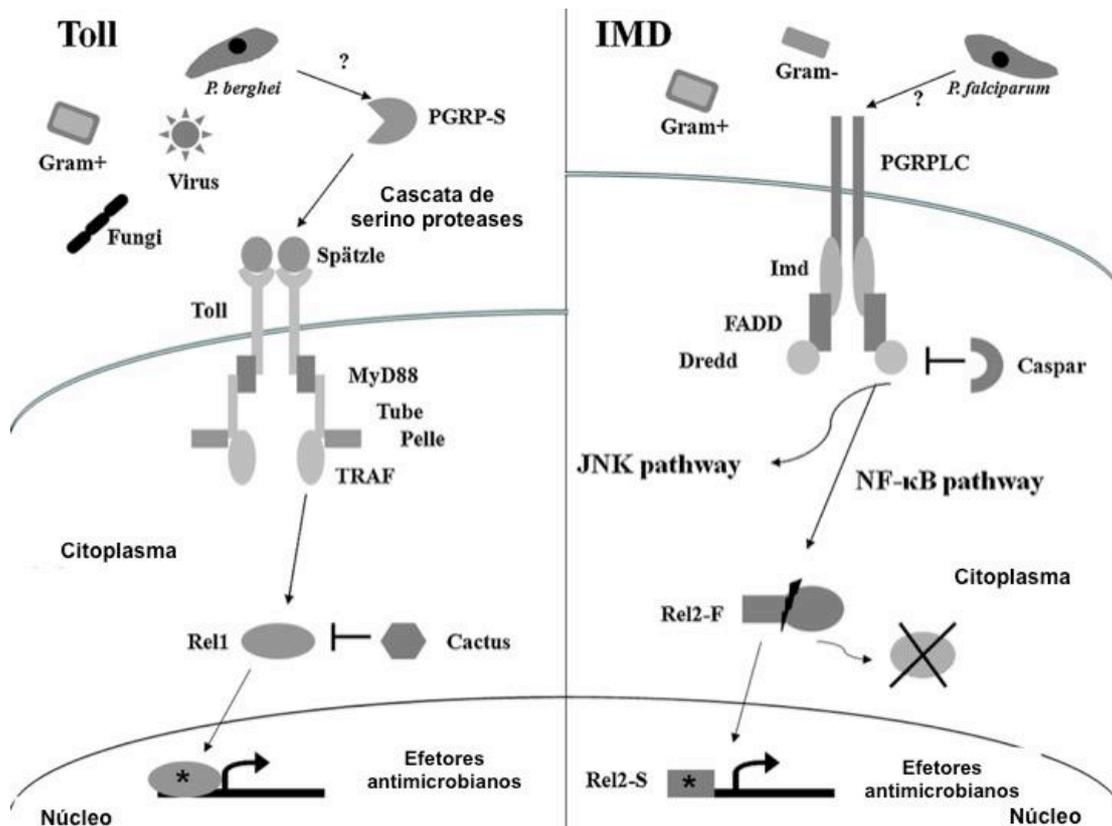


No entanto, muito da regulação geral é provavelmente similar, se não idêntica, e esses diagramas são apresentados para ilustrar de forma generalizada essas respostas de vias imunes inatas chave. Diversas revisões estão disponíveis e discutem essas vias em mais detalhes (DIMOPOULOS et al., 1997; DIMOPOULOS et al., 2001; BLANDIN, 2004, 2007; GUPTA et al., 2009; MEISTER et al., 2009).

A maioria dos componentes das vias Toll e IMD são altamente conservados em *Drosophila* e *An. gambiae* e estudos funcionais dessas vias estabeleceram seus papéis na imunidade a parasitos (Figura 14) (CIRIMOTICH et al., 2010). Por exemplo, Lavishina et al. (1999) usaram RNAi para inativar cactus, o homólogo IκB dos insetos e um regulador

negativo chave na via Toll, em *An. gambiae*, levando a ativação diversos genes dessa via.

Figura 14. Esquema de sinalização imune das vias Toll e IMD de *Anopheles gambiae* envolvidas na defesa anti-*Plasmodium* (Fonte: Adaptado de Cirimotich et al., 2010)



Através desse design, mostrou-se que ativação de Toll podia controlar e até eliminar o desenvolvimento de *Plasmodium berghei* após a ingestão de sangue infectado pelo mosquito. De fato, a ativação de Toll levou ao aumento de defesas pré-invasão através do aumento da síntese de TEP1, uma proteína complemento tioester-like, e de outros fatores na hemolinfa, o que representa que silenciar a expressão de cactus por injeção de dsRNA resulta na ativação constitutiva da via Toll, mesmo sem desafio imunológico (FROLET et al., 2006).

Garver e colaboradores (2009) examinaram se o mesmo ocorria com infecções por *P. falciparum* em *An. gambiae*, *An. albimanus* e *An. stephensi*. Para sua surpresa, eles viram que a ativação da via IMD (Caspar) era muito mais efetiva, nas três espécies, para o controle de *P. falciparum* (parasita da malária humana), enquanto tratamento com RNAi para Cactus (Toll) foi melhor para o controle de *P. berghei* (parasita da malária em roedores).

Mitri e colaboradores (2009) demonstraram que na espécie *Anopheles gambiae* a ativação das vias IMD e Toll funciona de forma diferente para a infecção por *P. falciparum*, *P. berguei* e *P. yoelli*, ou seja, a ativação da via IMD é mais eficiente no controle da infecção por *P. falciparum* enquanto a via Toll diminui a intensidade e número de mosquitos infectados com *P. berguei* e *P. yoelli*. Garver e colaboradores (2012) observaram que silenciando apenas Caspar em *An. gambiae*, também, resultou numa resposta eficiente contra *P. falciparum*.

Estas diferenças entre a ativação das vias IMD e TOLL nas diferentes espécies de parasitas da malária e as diferentes espécies de mosquitos vetores implicam que o reconhecimento imunológico dos parasitas da malária em roedores e parasitas da malária humana pode ocorrer através de diferentes mecanismos (DONG et al., 2006, GARVER et al. 2009).

Portanto, a eficiência demonstrada por essas vias de sinalização, através do silenciamento dos reguladores negativos, sugere que as metas tradicionais no controle vetorial podem ser modificadas e incluir estratégias que seletivamente possam ativar a resposta imune em espécies importantes de parasitos e hospedeiros.

1.5 RNAi e Imunidade

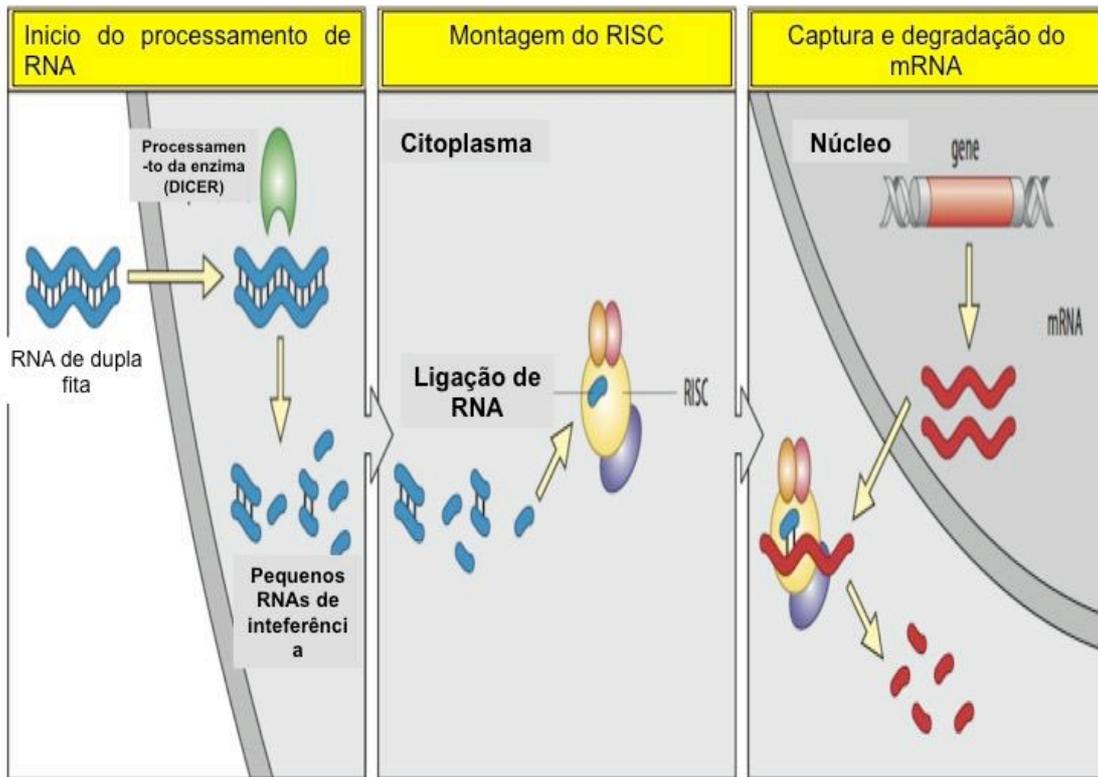
Para avaliar as vias sinalização e sua resposta anti-parasito é utilizada a técnica de RNAi, ou seja, através de injeções de dsRNA específico é

provocado o silenciamento do gene de interesse e avaliada a resposta que esse silenciamento provoca na resposta contra *Plasmodium*.

A interferência mediada por RNA (RNAi) é um fenômeno que naturalmente ocorre com papel na eliminação de RNAs mensageiros anômalos e na defesa do organismo contra parasitas moleculares (vírus). Essa técnica vem sendo utilizada desde 1998, para suprimir genes específicos em organismos de interesse (FIRE et al., 1998).

O silenciamento por RNAi é feito através de um RNA dupla fita (dsRNA) cujo primeiro par de bases é processado pela enzima Dicer RNase, no interior do organismo alvo. Os efeitos são a degradação pelos siRNAs (small interfering RNAs), de maneira específica, de moléculas de mRNAs, cujas sequências sejam homólogas a dos siRNAs. Também pode ocorrer a inibição da tradução de moléculas de mRNA alvo, resultando em redução ou total supressão na expressão destes genes. Por ser uma técnica muito específica, é possível silenciar um gene de uma determinada espécie de inseto, sem silenciar o mesmo gene de uma espécie não alvo. Ainda, vários estudos mostram que a técnica pode ser administrada também por injeção, aplicação tópica, adição na alimentação e inclusive na produção de inseticidas à base de RNAi (MAILLET et al., 2008; COY et al., 2012; ZOTTI et al., 2015) (Figura 15).

Figura 15. Esquema do silenciamento por RNAi (Disponível em: <http://courses.biology.utah.edu/bastiani/3230/DB%20Lecture/Lectures/WormRNAi.html>. Acesso em: 26 ago. 2016)



Conquanto existam vários estudos que são provas claras que uma ou ambas as vias de sinalização gerarão repostas antiparasitárias efetivas nesse vetor, não existem trabalhos na literatura relacionando a resposta imune do principal vetor da Amazônia, *Anopheles darlingi*, contra a principal espécie causadora de malária no Brasil, *Plasmodium vivax*.

Em Rondônia, oeste amazônico, nossos estudos estão focados em estabelecer se as vias Toll ou IMD são efetivas no controle da infecção desse importante anofelino.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de muitos esforços, a malária ainda hoje é um grande problema de saúde pública e continua causando grande impacto na saúde da população mundial. Esses agravos são atribuídos à diversos fatores, entre eles, falhas nas políticas de controle, falta de uma vacina eficiente, o crescimento da resistência dos parasitas às drogas, assim como dos vetores aos inseticidas. Com isso, nota-se que é necessário o desenvolvimento de novas estratégias, reunidas sobretudo em três grupos: desenvolvimento de vacina eficiente, novas drogas antimaláricas, e/ou bloqueio da transmissão.

Historicamente, o controle de mosquitos tem sido uma das mais efetivas maneiras de controlar a malária, através, principalmente, da utilização de inseticidas como o DDT, mas o custo ambiental do seu uso foi muito alto. Apesar disso, o controle vetorial, considerando-se que os anofelinos são os únicos vetores dos plasmódios humanos, ainda é um excelente alvo contra a malária. De fato, o controle efetivo dessa doença precisará provavelmente, de uma combinação entre estratégias de controle vetorial, terapia e prevenção.

Como nova proposta para o controle vetorial tem sido explorado a resposta do sistema imune inato dos mosquitos, que provaram, nas diversas pesquisas recentes, ter uma potente resposta contra a infecção por plasmódios. Especialmente, as vias Toll e IMD, que são vias chaves nas respostas de sinalização do sistema imune inato, que inicialmente foram descobertas e caracterizadas em *D. melanogaster*, apresentaram importância central no controle da infecção por *Plasmodium* em *An. gambiae*. E a via JACK-STAT que apresentou grande importância em mosquitos *An. aquasalis* infectados com *P. falciparum*.

Ao se manipular geneticamente essas vias para aumentar sua atividade, é possível eliminar a infecção por plasmódios nesses mosquitos. Por exemplo, a ativação da via Toll em *An. gambiae* se mostrou mais efetiva contra *P. berghei*, enquanto a ativação da via IMD foi mais potente contra *P.*

falciparum. A ativação da via Jak-Stat também mostrou efetiva no controle de *P. vivax*. O estudo destes genes permite um conhecimento minucioso desta interação resultante de um processo de co-evolução tão bem estabelecido.

Neste contexto, este trabalho apresenta grande relevância, pois de forma inédita enfoca a identificação do papel desses genes relacionados com a resposta imune no principal vetor da malária na Amazônia, *An. darlingi*, e o principal parasita, *P. vivax*. Esta pesquisa é necessária não somente para esclarecer aspectos específicos da imunidade do *An. darlingi*, mas também ampliar o conhecimento na área de resposta imune desse mosquito, aumentando a possibilidade de integrar novas alternativas ao combate da malária na região Amazônica.

Assim sendo, o objetivo dessa proposta é desenvolver intervenções que possam ser usadas em áreas endêmicas explorando a resposta inata dos mosquitos para o controle da malária. Logo após o estabelecimento da aplicação das vias TOLL e IMD e o seu papel na resposta imune dos mosquitos, temos como objetivo a longo prazo explorar o *screening* de pequenas moléculas que possam ativar essas vias, tornando os mosquitos menos susceptíveis e eventualmente imunes aos plasmódios.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a amplificação das vias IMD e Toll e seu efeito anti-plasmódio em *An. darlingi*, através do silenciamento por *dsRNA* dos reguladores negativos Caspar e Cactus.

3.2 Objetivos Específicos

Visando o silenciamento dos genes Caspar e Cactus, reguladores negativos da via IMD e Toll, respectivamente e seus efeitos:

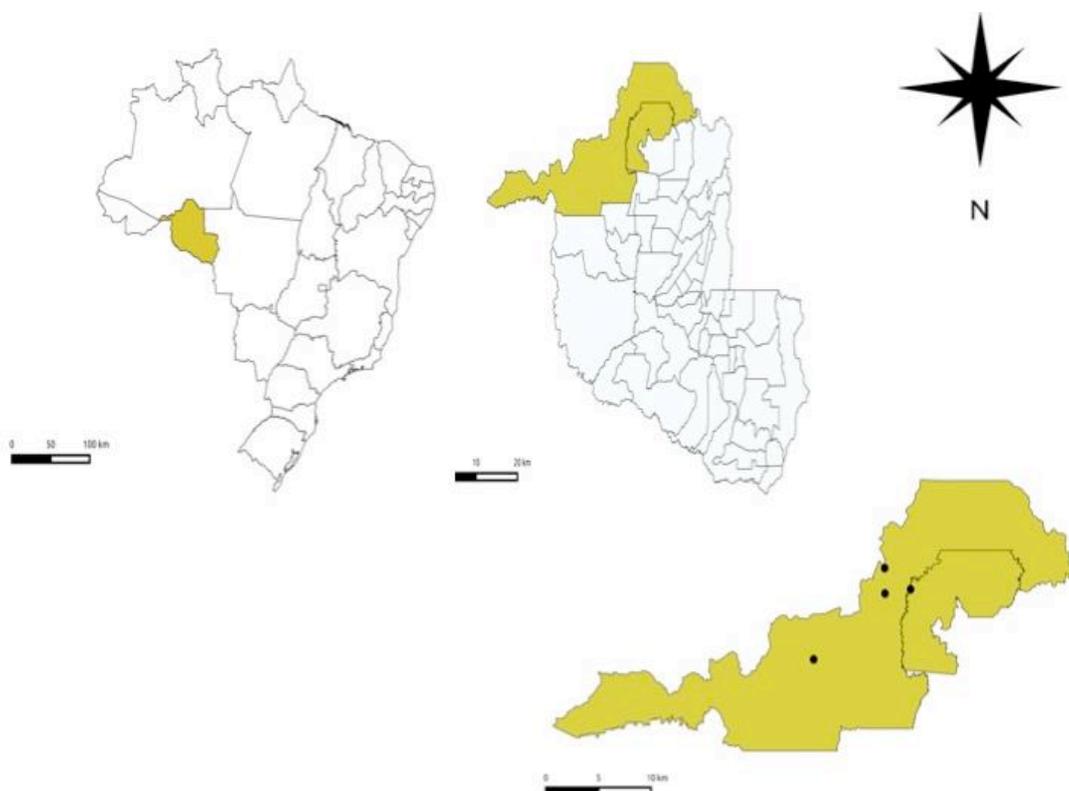
- Avaliar diferentes métodos de aplicação de *dsRNA*, i.e., injeção, aplicação tópica e ingestão no silenciamento dos genes alvo e na sobrevivência 3 dias após a aplicação;
- Analisar o efeito do silenciamento por injeção e da infecção artificial por *P. vivax* na sobrevivência, taxa de infecção e produção de oocistos.

4. MATERIAIS E METÓDOS

4.1 Coleta e Criação de Mosquitos

Os mosquitos foram coletados em cinco diferentes pontos, quatro na região Peri Urbana e Rural da cidade Porto Velho/RO e um no Município de Candeias do Jamari/RO: (i) Próximo ao Campus da Universidade Federal de Rondônia (Latitude: 8°49'22.81"S / Longitude: 63°55'42.57"W), (ii) Candeias do Jamari/RO (Latitude: 8°47'29.77"S / Longitude: 63°42'23.24"W), (iii) Nova Mutum/RO (Latitude: 9°18'55.51"S / Longitude: 64°32'44.96"W), (iv) Sítio em Zona Rural de Porto Velho (Latitude: 08°38'00.3"S/ Longitude: 63°55'51.9"W) e (v) Campus da Universidade Federal de Rondônia (Latitude: 8°49'22.81"S/ Longitude: 63°55'42.57"W (Figura 16).

Figura 16. Pontos de coleta das fêmeas de *Anopheles darlingi* em regiões Peri urbanas e rurais Porto Velho de Rondônia



Para capturar as fêmeas do mosquito *An. darlingi* foi utilizada a atração humana protegida (Figura 17), com duração de 3 horas (18:00 às 21:00). Após a coleta, os mosquitos foram repassados para gaiolas teladas e posteriormente foi oferecido o repasto sanguíneo em galinha, por 10 a 15 minutos. Todos os mosquitos ingurgitados foram separados em gaiolas, repassados para caixa térmica de isopor com algodão embebido em sacarose a 10%, essas gaiolas foram cobertas com camada de plástico e pano úmido, para manter a umidade. Em seguida, todos os espécimes foram encaminhados para o Laboratório de Entomologia da FIOCRUZ-RO.

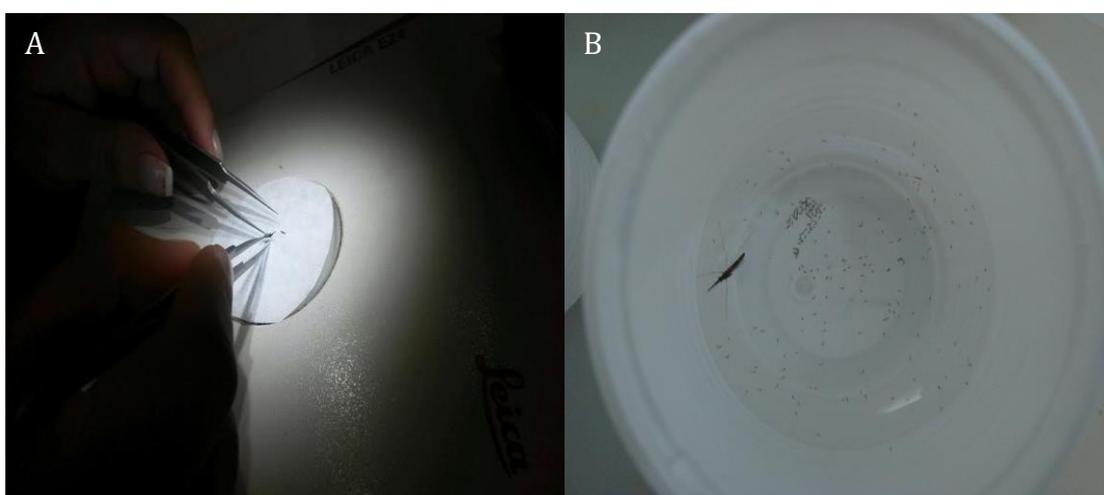
A coleta dos mosquitos por atração humana foi aprovada pelo Comitê de Ética e pesquisa do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CAAE 02285812.3.0000.0011) e a utilização do sangue de galinha para sua alimentação aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Fiocruz-RO (CEUA 2015/1).

Figura 17. Coleta de fêmeas de *Anopheles darlingi* pelo método de atração humana protegida (Foto: Aline Andriolo)



Após 72h, tempo de maturação dos ovos, os mosquitos foram identificados com auxílio de estereomicroscópio e chave de identificação (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), em seguida induzidos a oviposição, removendo-se uma das asas e colocados para ovipor em copos contendo papel filtro (Figura 18).

Figura 18. Oviposição induzida dos mosquitos *Anopheles darlingi* (A) para obtenção de larvas F1 utilizados nos bioensaios (B) (Foto: Frances Tatiane)



As larvas obtidas foram mantidas nos copos de oviposição até alcançarem o 2° instar. Posteriormente foram repassadas para bacias de 25x15x6 cm com 1L de água mineral e mantidas em temperaturas entre 27 - 28°C e fotoperíodo de 12 horas. A alimentação foi feita com comida de peixe TetraMin Tropical Flakes *ad libitum* até chegarem a 3°- 4° instares. Ao atingirem a fase de pupa as mesmas foram separadas em gaiolas teladas até emersão de fêmeas adultas F1 que foram utilizadas nos experimentos com idade entre 2 - 5 dias de (Figura 19).

Figura 19. Criação de mosquitos *Anopheles darlingi* para utilização nos bioensaios: (A) Manutenção de Larvas; (B) Manutenção de Adultos (Fotos: Frances Tatiane)



4.2 Obtenção das sequências de Caspar e Cactus de *Anopheles darlingi* e produção de dsRNA

Foram desenhados e utilizados primers degenerados baseados em sequências conhecidas de outros dípteros com alvos nos seguintes reguladores negativos: Caspar (IMD), gene homólogo ao Fator associado Fas 1 (hFAF1) de humanos (Gupta et al., 2009); Cactus (Toll), homólogo I κ B de *Drosophila* (LEMAITRE & HOFFMANN, 2007).

Parâmetros básicos para PCR em Tempo real foram utilizados para o design dos primers. A ferramenta Primer3 (Whitehead Institute) de design de primers foi utilizada, ajustando os parâmetros default para a técnica em tempo real. Particularmente, temperaturas de anelamento superiores a 60°C, G+C rich 3' ends e altos pontos de fusão serão considerados (SILVERMAN et al., 2003)

Uma vez desenhados e sintetizados, os primers foram validados

utilizando-se PCR e técnicas de eletroforese em gel de agarose 10%, para análise de produtos da amplificação do tamanho previsto (Tabela 1). Os primers dos genes avaliados para *An. darlingi* amplificaram fragmentos de aproximadamente 354 pb do gene caspar e 317 pb de cactus. Este procedimento foi realizado na *University of Massachusetts* em Woscerster, EUA.

Todo o acesso e remessa de material do patrimônio genético dos mosquitos foi aprovado pelo CNPq com autorização de número 010391/2012-6.

Para a produção de dsRNA de Caspar e Cactus foram utilizados primers incorporando o promotor T7 em ambas as extremidades. Após a purificação, esse modelo foi usado em transcrição *in vitro* com T7 RNA polimerase (*Kit T7 Megascript, Ambion*) para gerar grandes quantidades de RNAi, que posteriormente foram utilizados nos experimentos de silenciamento (GARVER et al., 2009).

Tabela 1. Conjuntos de primers construídos para análise da expressão dos genes de interesse do sistema imune de *Anopheles darlingi* por PCR em Tempo Real (qPCR) e para a síntese de RNA de dupla fita (T7) para os experimentos de silenciamento por RNAi

Gene	Via	qPCR	T7
Caspar	IMD	F:GAGAGCAGCGGTGAAGAGT R: CTGTATACTGCCAATCGTTTC	F:TAATACGACTCACTATAGGGC GTACCGGGCTCAACTATCTCG R:TAATACGACTCACTATAGGGC CGACACCCGATTCATTCAGC
Cactus	Toll	R: AGTGCCTCGCGTTGCTCT F: CCCCGTGTGTCGTCAGTTGC	F: TAATACGACTCACTATAGGGGGAATTGG TAAGGAACTGGT R: TAATACGACTCACTATAGGGGCTATGCT GCCCCGTCTCG
RP40	<i>House keeping</i>	R:GCCGTACCCTTTCCGGA CTAC F:GTGGCCACAATTCTTC TTGC	

4.3 Avaliação do silenciamento de Caspar e Cactus em *Anopheles darlingi* utilizando diferentes métodos

Para analisar o efeito do silenciamento dos genes de interesse, das vias de sinalização do sistema imune, Caspar (IMD) e Cactus (TOLL) foram testados três métodos diferentes de administração: Injeção, Ingestão e Aplicação Tópica. Para injeção, os respectivos dsRNA foram diluídos na concentração 5 µg/µl em água ultra-pura e 69 µl foram injetados no tórax de fêmeas de mosquitos (2-3 dias de idade) anestesiadas com acetato de etila. As injeções foram realizadas utilizando-se microinjetor (Nanoject) no Laboratório de Entomologia do IPEPATRO/FIOCRUZ em Porto Velho – RO (Figura 20).

Figura 20. (A) Fêmeas de *Anopheles darlingi* anestesiadas (B) Injeções de RNAi, no tórax dos mosquitos, utilizando-se um micro injetor (Nanoject) (Fotos: Frances Tatiane)



Os mosquitos injetados totalizaram 405 fêmeas divididas em 81, sendo que foram 27 repetições para cada dsRNA (Caspar, Cactus e LacZ) com 5 espécimes de mosquitos por repetição.

No método de administração do dsRNA por ingestão, os mosquitos foram privados de alimento por 12h e após isso foram distribuídas gotículas de 2 μ l dos diferentes dsRNAs diluídos em sacarose 10% distribuídas sobre a tela das gaiolas durante 30 minutos e posteriormente foram separados daqueles que não se alimentaram (COY et al., 2012) (Figura 21).

Figura 21. Alimentação do mosquito *Anopheles darlingi* gotícula de dsRNA em solução açucarada durante os experimentos de administração do dsRNA por ingestão (Foto: Frances Tatiane)



A administração por aplicação tópica de dsRNA foi realizada utilizando um protocolo adaptado de Pridgeon et al (2008) empregando uma mistura de acetona e dsRNA na concentração de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (3:1) aplicado no abdômen dos mosquitos (Figura 22).

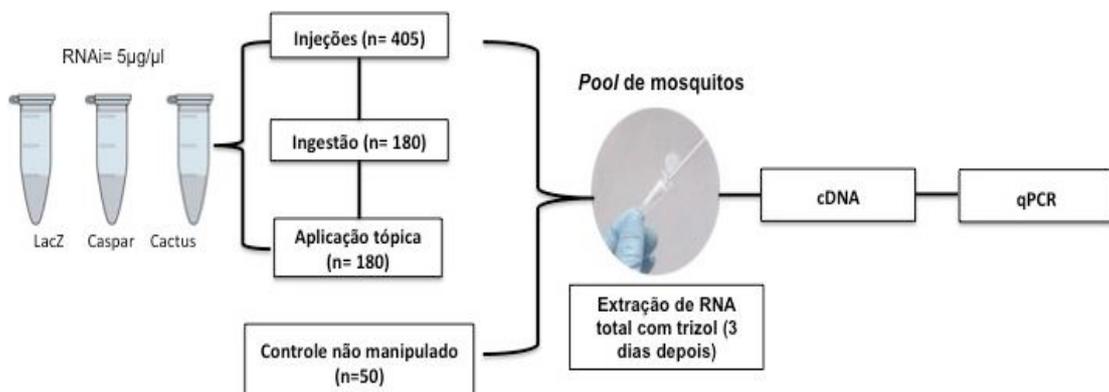
Figura 22. Gotícula de acetona/RNAi (3:1) aplicado com utilização de micropipeta sobre o abdome de *Anopheles darlingi* (Foto: Frances Tatiane)



Os grupos experimentais de administração por ingestão e aplicação tópica foram realizados com o total de 180 mosquitos para cada uma das situações, divididos em 12 repetições com 5 espécimes de mosquitos.

Em síntese, a metodologia para os diferentes métodos de aplicação pode ser vistas na figura 23.

Figura 23. Esquema do experimento de diferentes métodos de aplicação de dsRNA para silenciamento dos genes Cactus (TOLL) e Caspar (IMD) em *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)



Após 3 dias, todos os mosquitos (Injetados, Ingestão e Aplicação tópica) foram macerados e concentrados em *pools* de mosquitos, separados pelo diferente grupo experimental e analisado por cada tipo de aplicação de dsRNA quanto aos níveis de expressão dos genes de interesse por qPCR. Além disso, a sobrevivência diária dos mosquitos foi anotada para avaliar as curvas de sobrevivência.

4.4 Extração do RNA Total dos mosquitos

Para a extração do RNA total os mosquitos provenientes dos experimentos de administração alternativa de dsRNA (Item 4.5) foram transferidos para microtubos de 1,5 ml contendo 500 µL de Trizol, (5 mosquitos por *pool*) e macerados com pistilo plásticos.

Após isso, os tubos foram centrifugados a 12.000 rcf a 4°C durante 15 minutos. O RNA, que ficou separado na fase aquosa foi transferido para outro microtubo limpo, e a este foi adicionado 250 µL de isopropanol, e em seguida a mistura foi submetida a uma nova centrifugação de 12.000 rcf a 4°C durante 10 min.

Ao final, o álcool foi descartado por inversão do tubo e foi feita a lavagem do RNA com 500 µL de etanol a 75%. Os tubos contendo o material descrito foram centrifugados novamente a 12.000 rcf a 4°C durante 5 min e após a retirada do álcool residual por evaporação o RNA foi ressuscitado em 30 µL de H₂O livre de nucleases.

Para a quantificação das amostras e avaliação do grau de pureza do RNA extraído (relação 260/280) foi utilizado o aparelho Nanodrop. As amostras de RNA foram então diluídas a 37,5 ng/µl com 10% de tampão TE (1X) preparado em H₂O livre de nucleases. Essas amostras foram tratadas com DNase I, Amp Grade (Invitrogen™).

Para a confecção do DNA de cadeia simples a partir de RNA (*kit* SuperScriptIII RT-PCR), adicionado 5 µl (0,5 µg) de RNA tratado com DNase

para um tubo de PCR limpo, seguindo as instruções do fabricante para preparação do Mix, obtendo um volume final 20 μ L.

Foi feita uma PCR simples para avaliar a integridade do cDNA confeccionado, e a normalização da expressão dos genes de interesse foi realizada utilizando o gene constitutivo “ubiquitin/60S ribosomal protein L40” de *An. darlingi* (RP40) (Genbank: ACI30049.1). A programação utilizada foi 25°C por 5 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min e 4°C por 30 s.

4.5 PCR em Tempo Real (qPCR)

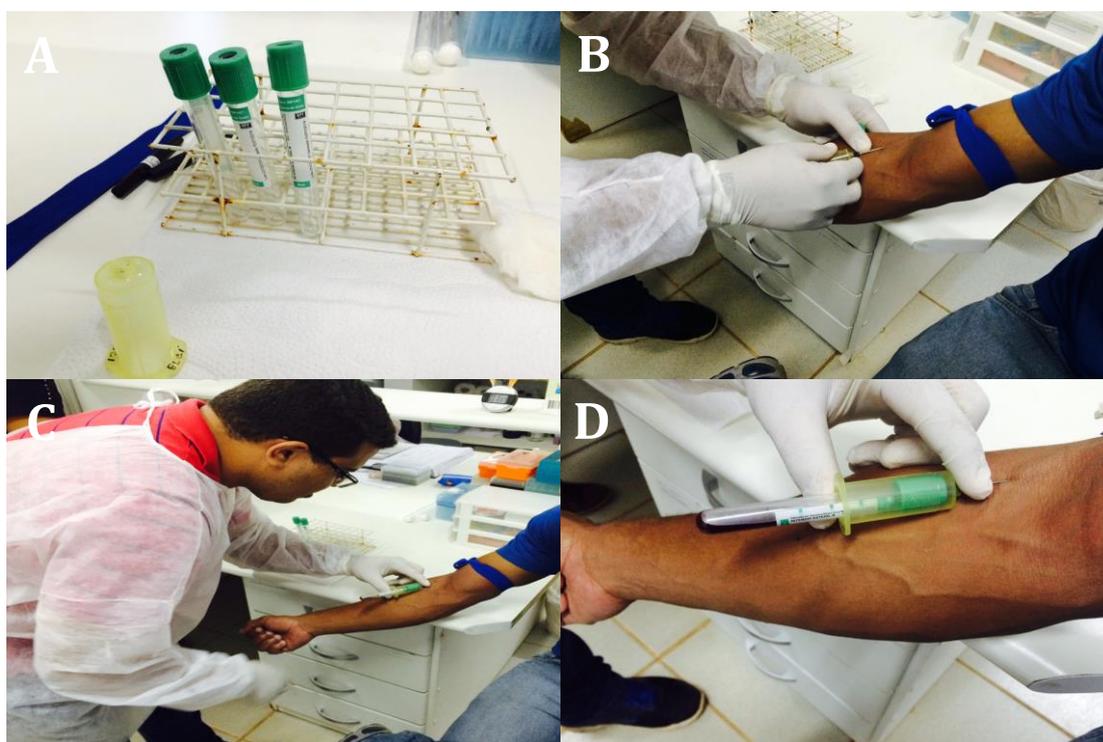
As análises de PCR em tempo real foram realizadas em equipamento da marca BioRad modelo CFX 96 Real time System. As reações foram feitas com volume final de 20 μ l, utilizando 5 μ l de cDNA de cada amostra. Adicionou-se ao cDNA, 2 μ l dos iniciadores do gene de interesse (2pmol/ μ l), 7,5 μ l de Sybr Green (BioRad) e 5,5 μ l de água. A curva padrão foi feita com amostras controle através de diluições seriadas de 1/5, 1/50, 1/500 e 1/5000. A programação foi: 50°C por 2 minutos, 95°C por 5 minutos e 40 ciclos: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos. A curva de dissociação foi construída partindo de 58°C até 95°C com incremento de 0,5 °C a cada 5 segundos. Os números de ciclos acima do limiar (Valor de Threshold) foram anotado para cada amostra e os resultados trabalhados em planilhas do Excel para os cálculos dos valores relativos do silenciamento.

4.6 Coleta de Sangue, Aspectos Éticos, Determinação de Parasitemia e Contagem de Gametócitos

Para a infecção dos mosquitos, cinco mililitros de sangue, de pacientes diagnosticados com malária *vivax* por exame de gôsta espessa, foram coletados, por enfermeiro ou técnico habilitado (Figura 24). Foram incluídos no estudo sangue pertencente a pacientes com faixa etária entre 18

e 60 anos, ambos os sexos, positivos para malária *vivax* e que apresentassem parasitemia acima de uma cruz juntamente a presença de gametócitos. Esse procedimento foi realizado no Centro de Diagnóstico de Malária do CEPEM/IPEPATRO.

Figura 24. Coleta de sangue de paciente diagnosticado com malária *vivax* por exame de gota espessa, com parasitemia acima de duas cruzes. (A) Material utilizado na Coleta; (B) Punção de Veia para Coleta de Sangue a Vácuo; (C e D) Coleta da Amostra de Sangue Infectado com *P. vivax* (Fotos: Frances Tatiane)



Após a coleta das amostras, todos os pacientes foram tratados com antimaláricos conforme preconiza o Ministério da Saúde. O sangue coletado foi encaminhado para o Laboratório de Entomologia da FIOCRUZ-RO em temperatura ambiente em caixas de isopor.

No Laboratório de Entomologia da FIOCRUZ-RO, no período anterior a infecção, foram preparadas novas lâminas de gota espessa para confirmar a presença de gametócitos, através da contagem das formas sexuais

(gametócitos) e assexuais por 500 leucócitos (Manual de Diagnóstico de Malária, 2005).

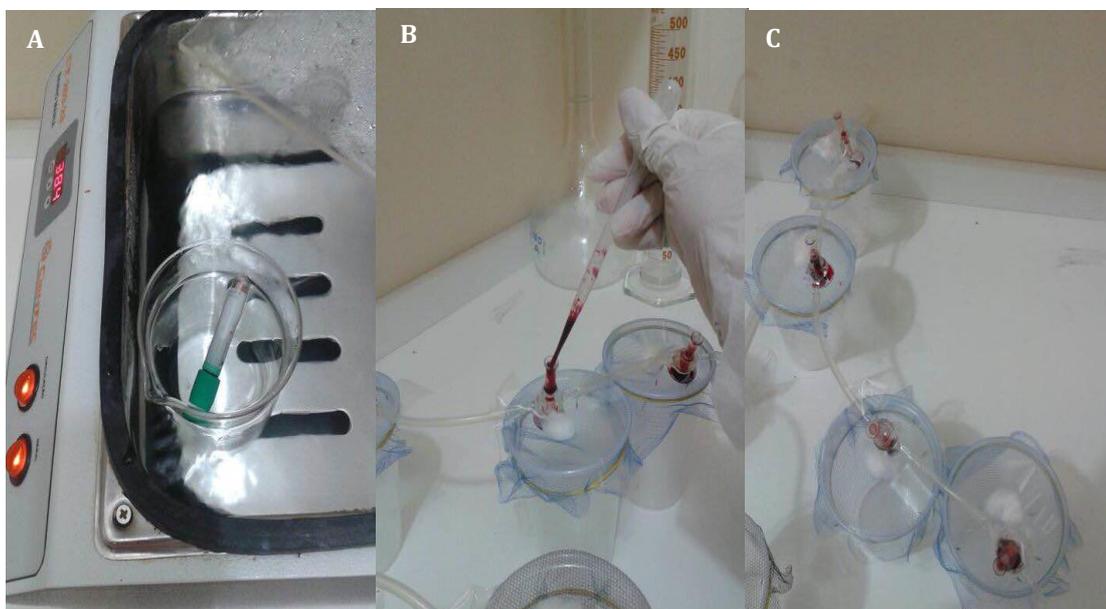
Para que as amostras de sangue de pacientes com malária *vivax* fossem coletadas, todos os indivíduos que aceitaram voluntariamente participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram excluídos pacientes menores de idade, indígenas e portadores de incapacidade mental. Todos esses procedimentos foram aprovados pelo CONEP (CAAE: 00663912.7.0000.0011, parecer número: 173.654).

4.7 Avaliação do silenciamento dos genes Caspar e Cactus e da alimentação com sangue infectado por *Plasmodium vivax* na sobrevivência, taxa de infecção e produção de oocistos em *Anopheles darlingi*

Para avaliar o efeito do silenciamento no bloqueio da infecção pelo parasito, os mosquitos receberam o sangue de indivíduos infectados com malária *vivax*, três dias após a injeção com dsRNA, como descrito (GARVER et al., 2009). As amostras de sangue foram coletadas em tubos de coleta a vácuo contendo anticoagulantes e mantidas a 37°C, até a realização dos experimentos de infecção com os mosquitos (DIEHLMANN et al., 1999).

A alimentação sanguínea dos mosquitos com as amostras foi feita utilizando o sistema de alimentação artificial por membranas. Esse sistema consiste em alimentadores de vidro cobertos com membranas artificiais, conectados a um sistema de mangueiras acoplado a um banho maria. No banho maria circulava água a 39°C e isso mantinha o sangue aquecido (Figura 25) (LEVASHINA et al., 1999; HUME et al., 2007).

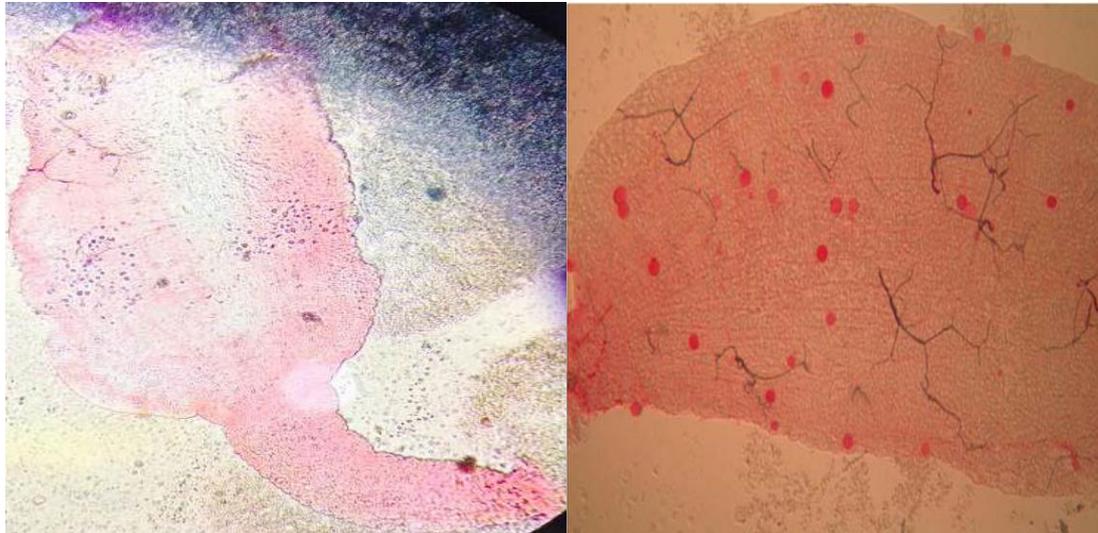
Figura 25. Alimentação sanguínea dos adultos de *Anopheles darlingi* em alimentadores artificiais. (A) Tubo de Sangue com Amostra de Paciente a 38°C; (B) Abastecimento dos Alimentadores Artificiais com Amostra de Sangue de Paciente e (C) Alimentação Artificial dos Mosquitos (Fotos: Frances Tatiane)



Para alimentar os mosquitos nesse sistema, estes foram mantidos sem alimentação por 12 horas e depois receberam o sangue infectado através dos recipientes de vidros colocadas sobre as gaiolas teladas. Depois de alimentados, os mosquitos ingurgitados foram mantidos com dieta regular de sacarose 10%, permitindo o desenvolvimento dos parasitas no intestino. Mosquitos não ingurgitados foram removidos do experimento.

O nível de infecção total foi avaliado 8 dias após a alimentação sanguínea através de dissecação dos intestinos dos mosquitos, coloração dos tecidos com mercúrio cromo 1% e leitura por microscopia óptica para determinação da taxa de infecção contabilizando-se o número de mosquitos infectados e não infectados e a intensidade da infecção contabilizando-se o número de oocistos presentes (Figura 26) (RIOS-VELÁSQUEZ et al., 2013).

Figura 26. Oocistos de *P. vivax* em mosquitos positivos dissecados nos experimentos de ativação das vias IMD e TOLL e bloqueio da infecção (Foto: Frances Tatiane) (A) mosquito não infectado, (B) mosquito infectado mostrando oocistos (pontos vermelhos)



Esse experimento teve cinco repetições realizadas em momentos diferentes, foram consideradas repetições as cinco amostras de sangue dos diferentes pacientes. O número de mosquitos foi variável para cada repetição, totalizando 3.825 fêmeas injetadas, 2096 infectadas, 944 dissecadas.

Em síntese os experimentos para avaliação do silenciamento dos genes alvo e do bloqueio da infecção podem ser observados na figura 27.

Figura 27. Esquema do experimento de injeções de RNAi para bloqueio de infecção de *Plasmodium vivax* em *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)



4.8 Análise dos Dados

As curvas de sobrevivência dos mosquitos submetidos a diferentes tratamentos para o silenciamento dos genes de interesse e também após a infecção com *P. vivax* foram analisadas pelo teste de Mantel-Cox. O silenciamento foi analisado por ANOVA e as comparações foram feitas pelo teste de Tukey (pos-hoc). Para avaliação da infecção do mosquito, foi construída uma tabela de contingência de 2 x 4 para testar a independência do status de infecção do mosquito (infectado x não infectado) após os diversos tratamentos com dsRNA. O número de oocistos (carga parasitária) foi analisado utilizando o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) e as comparações feitas pelo teste de Tukey (pos-hoc). Todos os testes foram realizados usando 5% de significância no programa Prism 6 (GraphPad).

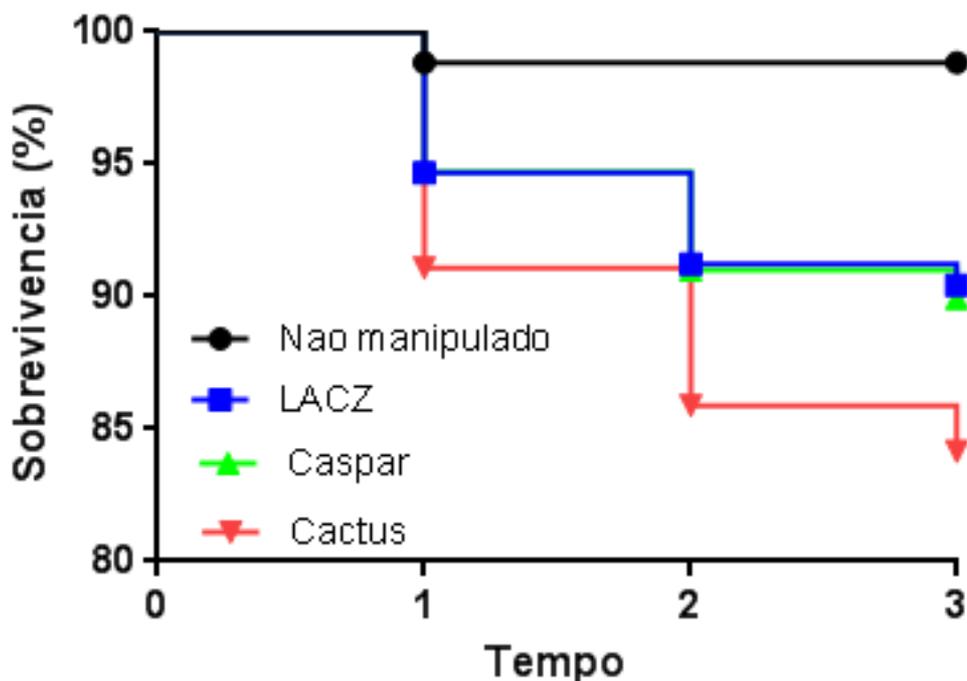
5. RESULTADOS

5.1 Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* e Silenciamento dos Genes Caspar e Cactus Utilizando Diferentes Métodos de Aplicação de dsRNA

O primeiro método de aplicação testado foi injeção de dsRNA, considerado o padrão ouro para silenciamento gênico. Contudo, observamos que a aplicação de dsRNA através de injeções além de ser muito laboriosa diminui consideravelmente a sobrevivência dos mosquitos em todos os grupos manipulados em comparação ao grupo controle não manipulado. Além disso, de todos os métodos testados (Injeções, Ingestão e Aplicação Tópica) a mortalidade é potencialmente maior, o que foi observado logo nas primeiras 24h e perdurou até 72h, tempo em que são avaliados os níveis de transcrição relativos a cada gene de estudado.

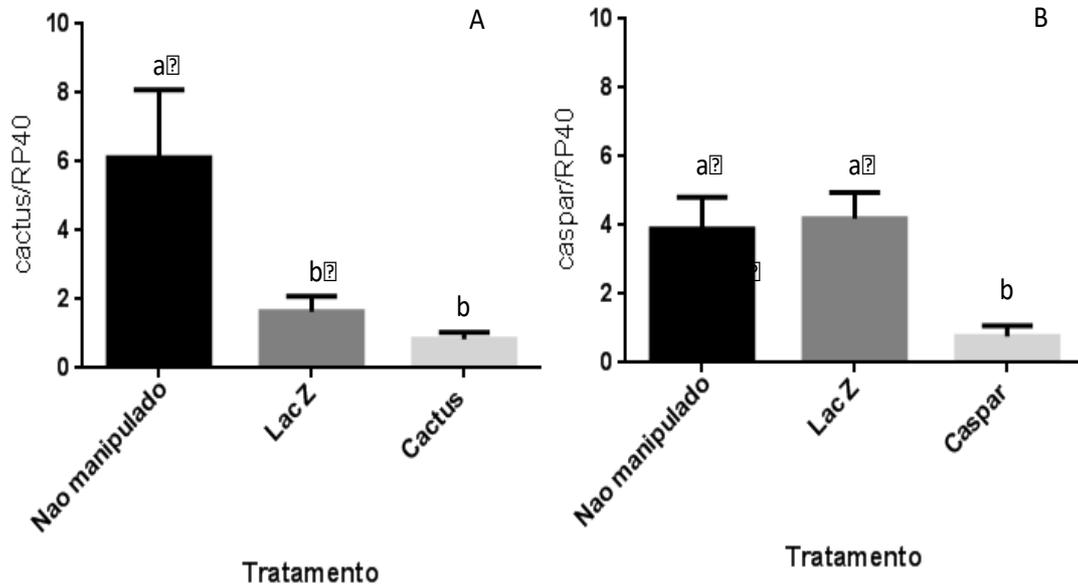
O grupo mais afetado com as injeções foi o grupo Cactus (Toll), em que foi observada a sobrevivência de 84,9% dos mosquitos 72h após serem injetados. Contudo, mesmo ocorrendo uma considerável mortalidade nos demais grupos, a sobrevivência para os grupos LacZ (dsRNA controle) e Caspar (IMD) não foram muito diferentes nessas 72h, 90,4% e 89,9, respectivamente. As curvas apresentaram-se diferentes significativamente ($X^2 = 21,91$; $P < 0,0001$) (Figura 28).

Figura 28. Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após injeções de diferentes dsRNAs



Quando avaliado o efeito do silenciamento utilizando dsRNA por injeções verificou-se que quando o alvo do silenciamento foi o gene Cactus houve uma redução significativa em comparação aos mosquitos que compuseram o controle não manipulado (86,3%). Nos grupos de mosquitos injetados com dsRNA LacZ (dsRNA controle) essa redução foi de 73,2% em relação ao controle não manipulado, mas de apenas 46% comparado com os mosquitos injetados com dsRNA Cactus. Sendo essa diferença significativa ($F = 5,85$; $P = 0,0078$), entretanto não houve diferença significativa entre esses tratamentos ($P > 0,05$) (Figura 29A). Já quando o alvo foi o gene Caspar, o grupo injetado com LacZ (dsRNA controle) não diferiu do grupo controle não manipulado e houve uma redução de 81,5 e 80,5% na expressão desse gene nos mosquitos injetados com dsRNA Caspar em relação ao controle não manipulado e controle de dsRNA (LacZ), respectivamente ($F = 7,09$; $P = 0,0033$) (Figura 29B).

Figura 29. Níveis de transcrição relativos de Cactus (A), um regulador negativo Toll e Caspar (B), um regulador negativo IMD, em fêmeas adultas de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) injectados com dsRNA

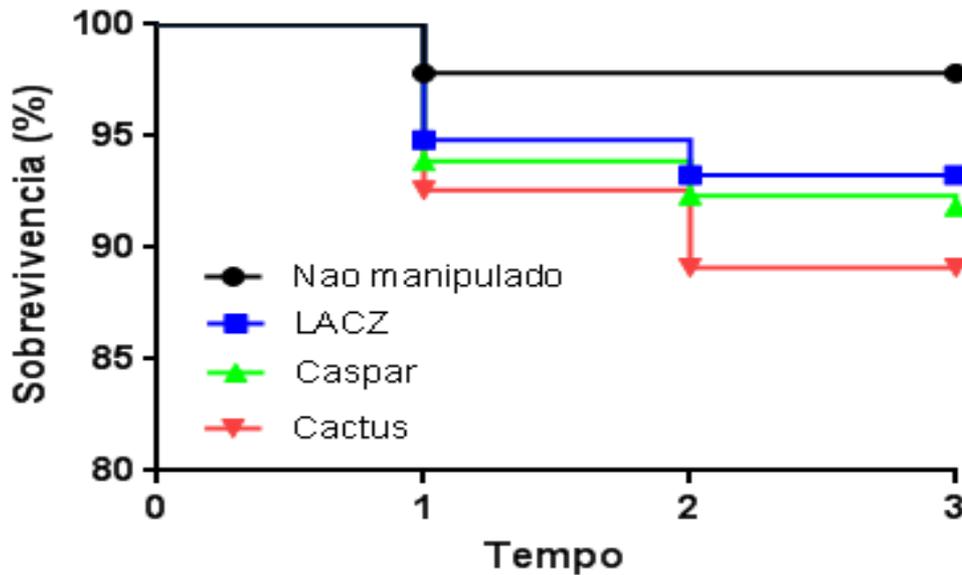


ANOVA, as barras indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre colunas ($p < 0,05$). RP40 = ubiquitina/60S proteína ribossômica L40 de *An. darlingi*; $n = 10$ (pool com 5 mosquitos/amostra)

O segundo método de aplicação de dsRNA foi feito por ingestão e a mortalidade foi menor do que o método clássico de aplicação por injeções de dsRNA, porém foi maior do que o grupo controle não manipulado desse experimento.

A sobrevivência por ingestão foi afetada em todos os grupos manipulados: LacZ (93,2%), Caspar (91,8%) e Cactus (89,1%). Nesse método de aplicação o grupo Cactus, da mesma forma que foi observado nas injeções, foi novamente o que apresentou maior mortalidade ($X^2 = 11,5$; $P = 0,009$) (Figura 30).

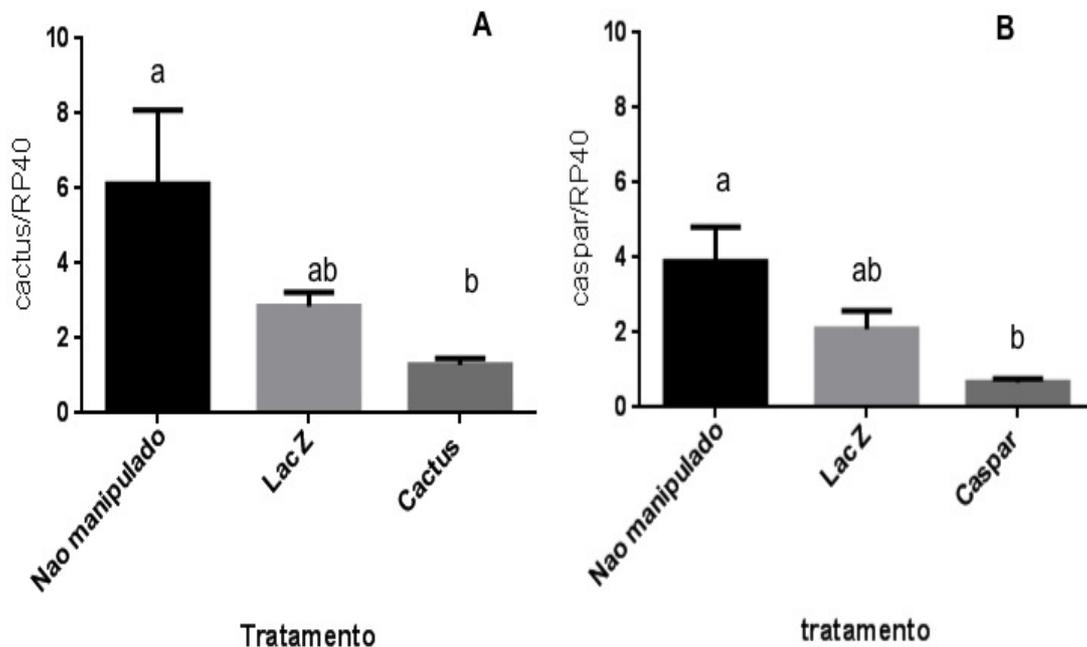
Figura 30. Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após ingestão de diferentes dsRNAs em solução açucarada a 10%



Quando verificado o nível de silenciamento através dessa técnica observou-se que nos experimentos que objetivaram silenciar o gene Cactus houve uma redução significativa de cerca de 78,8% na expressão desse gene entre o grupo não manipulado (controle) e o grupo que ingeriu dsRNA Cactus ($F = 4,45$; $P = 0,021$), mas não se observou diferença significativa entre o dsRNA controle e os demais grupos (Figura 31A).

De forma geral, tanto o gene Caspar quanto o gene Cactus apresentaram níveis de silenciamento altos por ingestão e semelhantes ao silenciamento feito por injeções. A avaliação da expressão de Caspar e Cactus levou a diminuição significativa da expressão desse gene em relação ao grupo controle não manipulado ($F = 7,33$; $P = 0,003$ e $F = 4,45$; $P = 0,021$) respectivamente (Figura 31B). No entanto, a ingestão do dsRNA controle (Lac Z) não apresentou diferenças entre os dsRNAs específicos (Figura 31).

Figura 31. Níveis de transcrição dos genes Cactus (A) e Caspar (B) analisado por PCR em tempo real em adultos de *Anopheles darlingi* após a alimentação com dsRNA em solução açucarada a 10%

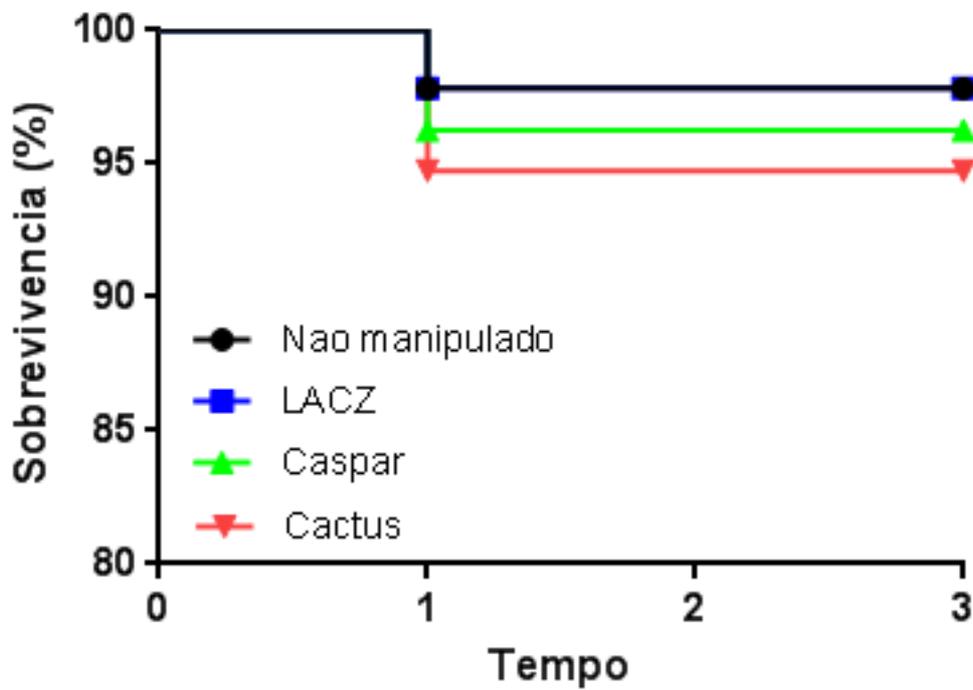


ANOVA, as barras indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre colunas ($p < 0,05$). RP40 = ubiquitina/60S proteína ribossômica L40 de *An. darlingi*; $n = 10$ (pool com 5 mosquitos/amostra)

Por fim, foi avaliado o terceiro método que consiste na aplicação tópica de dsRNAs utilizando o protocolo adaptado de Pridgeon et al (2008). Nesse caso, a mortalidade nos grupos LacZ, Caspar e Cactus foi de 97,8%, 96,2% e 94,7%, respectivamente, e ocorreu logo nas primeiras 24h o que foi mantido até 72h, o mesmo que observamos no grupo controle não manipulado (sobrevivência de 98,8% nas primeiras 24h até 72h) ($X^2=3,8$; $P= 0,28$).

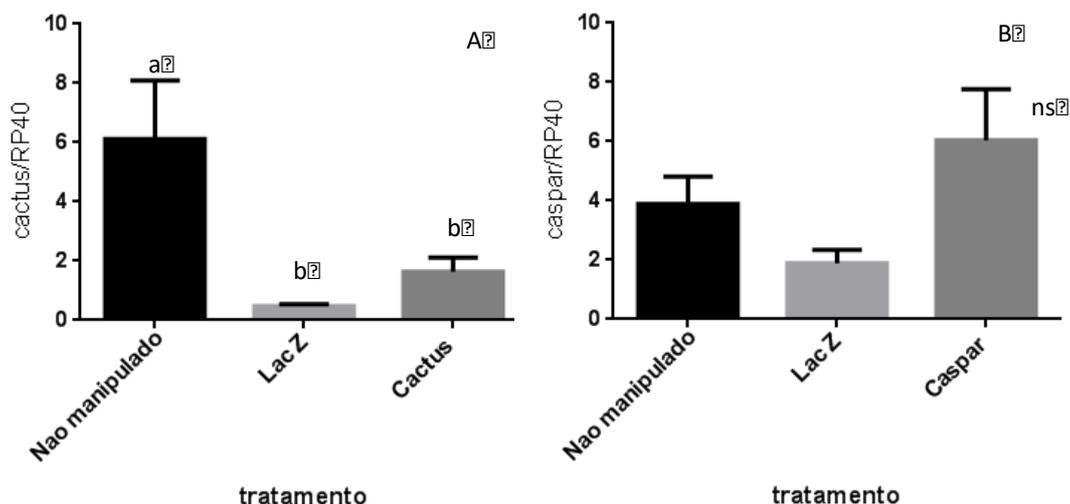
Dos três métodos de aplicação de dsRNA testados a mortalidade para a aplicação tópica foi significativamente menor. Além disso, a mortalidade que foi observada nos grupos foi muito semelhante ao controle (Figura 32).

Figura 32. Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após aplicação tópica de diferentes dsRNAs



Posteriormente, quando observado o nível de silenciamento obtido com essa técnica foi verificado que o grupo Cactus e o grupo que recebeu o dsRNA controle (Lac Z) foram significativamente diferentes do controle não manipulado ($F= 6,41$; $P=0,005$), enquanto Caspar não apresentou diferenças significativas ($F=3,22$; $P=0,05$) (Figura 33).

Figura 33. Níveis de transcrição do gene Cactus (A) e Caspar (B) analisado por PCR em tempo real em adultos de *Anopheles darlingi* após aplicação tópica de dsRNAs



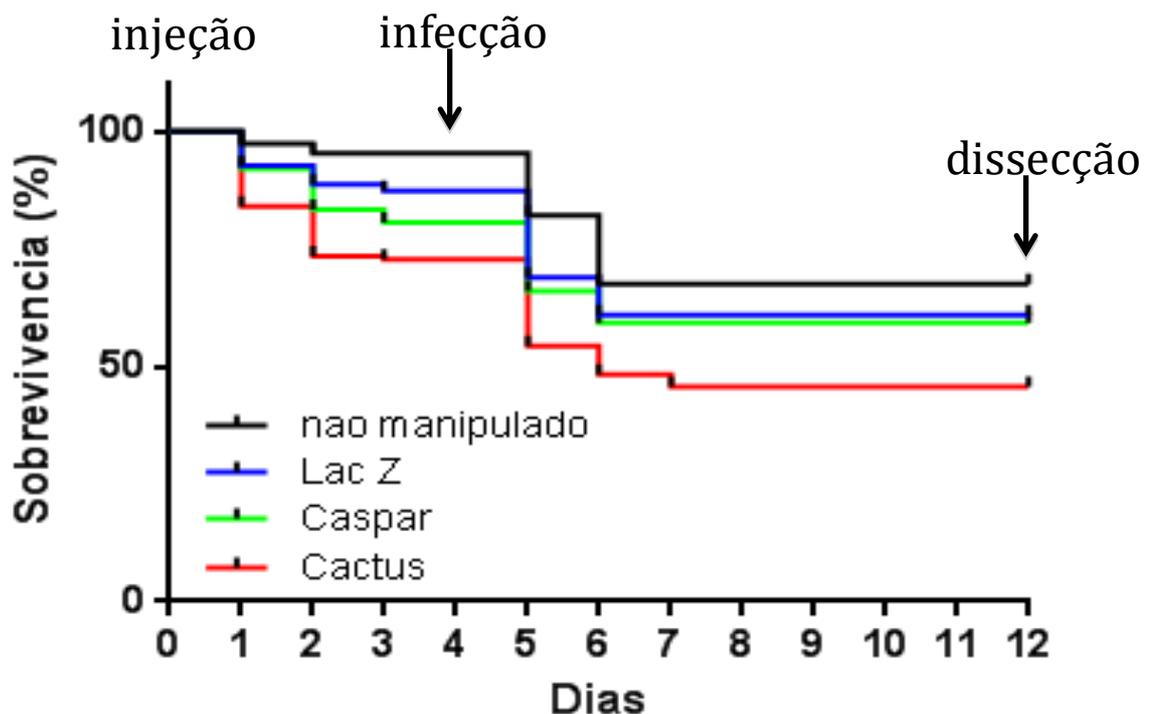
ANOVA, as barras indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre colunas ($p < 0,05$). RP40 = ubiquitina/60S proteína ribossômica L40 de *An. darlingi*; $n = 10$ (pool com 5 mosquitos/amostra); NS = não significativo ($P > 0,05$)

5.2 Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após Injeção de dsRNA e Infecção pelo *Plasmodium vixax*

A sobrevivência diária diminuiu do momento da injeção de dsRNA até a dissecação (Figura 34), as curvas apresentaram-se diferentes significativamente ($X^2 = 21,91$; $P < 0,0001$). Foi observado nesse experimento que antes da infecção (três dias após as injeções), 28% dos mosquitos injetados com o dsRNA de Cactus tinham morrido à medida que apenas 5% dos mosquitos do grupo experimental não manipulados havia morrido (Figura 34).

O intervalo mais crítico para a sobrevivência dos mosquitos, após a infecção por *P. vivax*, foi de 24 a 48 horas, em que a sobrevivência dos mosquitos diminuiu para 67% no grupo não manipulado enquanto nos grupos injectados com os dsRNA de Caspar, LacZ e Cactus foi de 59, 60 e 48%, respectivamente (Figura 34). Não obstante, 48 horas após a infecção, os mosquitos não manipulados tinham o dobro da diminuição diária na sobrevivência em comparação aos grupos injetados citados acima.

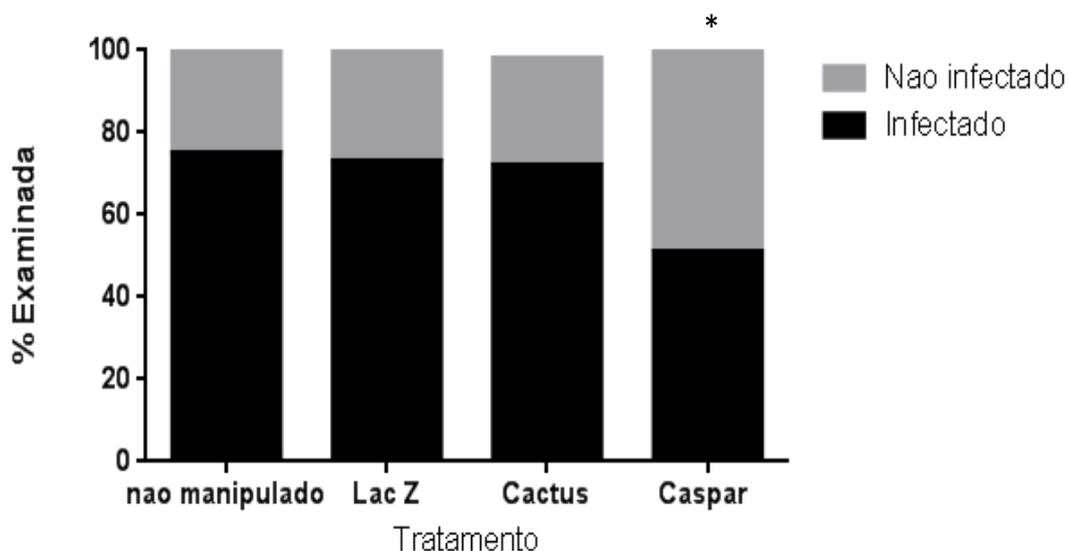
Figura 34. Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após injeção de diferentes RNAi e infecção com sangue infectado por *Plasmodium vivax*



5.3 Análise do Efeito do Silenciamento de Caspar e Cactus na Infecção de *Anopheles darlingi* e Produção de Oocistos de *Plasmodium vivax*

Quando consideramos o número de mosquitos infectados entre os diferentes tratamentos, *i.e*, não manipulados, os que receberam apenas dsRNA controle (LacZ) e os silenciados para Cactus e Caspar, apenas grupo injetado com dsRNA de Caspar diferiu significativamente ($X^2 = 46,93$; $P < 0,001$) em relação aos demais apresentando número proporcional de mosquitos não infectados (49%) e infectados, enquanto nos demais grupos a maior parte dos mosquitos foi infectada (70% ou mais) (Figura 35).

Fig 35. Porcentagem de *Anopheles darlingi* infectados por *Plasmodium vivax* em (Diptera: Culicidae) depois de silenciar os reguladores negativos da via Toll (Cactus) e IMD (Caspar)



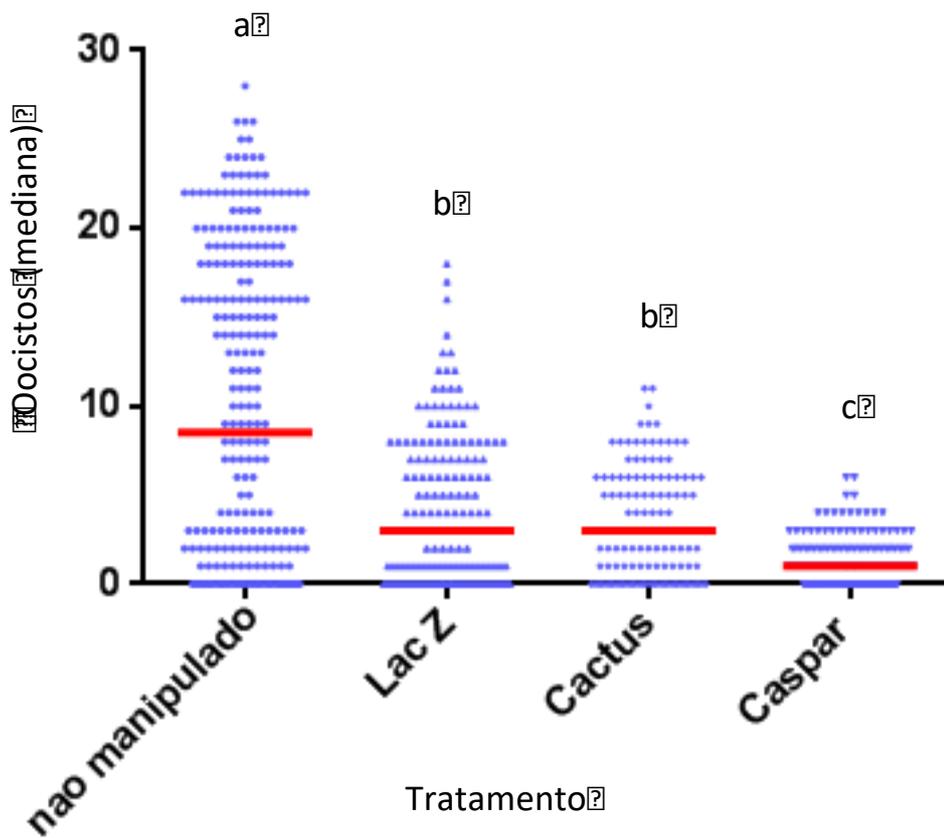
* indica diferença significativa ($P < 0,05$) na frequência de mosquito infectados e não infectados em relação aos demais grupos

A comparação do número de oocistos entre os diferentes tratamentos apresentou diferença significativa ($H = 201,1$, $P < 0,0001$)

Sendo que, a menor mediana de oocistos foi observada no grupo silenciado para Caspar (1 oocisto/mosquito), seguido por Cactus (3

oocistos/mosquito), LAcZ (3 oocistos/mosquito) e não manipulados (8,5 oocistos/mosquito) (Figura 36).

Figura 36. Número de oocistos de *Plasmodium vivax* em *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) após silenciamento de Cactus (TOLL) e Caspar (IMD)



ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). linhas vermelhas indicam a mediana de oocistos. N = 258 (não manipulados), 176 (LacZ), 140 (Cactus) e 213 (Caspar).

6. DISCUSSÃO

6.1 Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* e silenciamento dos genes Caspar e Cactus utilizando diferentes métodos de aplicação de dsRNA

Sabe-se que reguladores negativos Caspar e Cactus exercem papéis fundamentais na resposta imune de *D. melanogaster* (SILVERMAN et al., 2003; AGGARWAL & SILVERMAN, 2008). Além disso, vários estudos têm demonstrado que a utilização desses mecanismos pode ser promissora no que tange o bloqueio da infecção por *Plasmodium* sp em *An. gambiae* (GARVER et al., 2009; GUPTA et al., 2009, CIRIMOTICH et al., 2010, DIMOPOULOS et al., 2010; KAMBRIS et al., 2010). Entretanto, nada se conhece a respeito das ativações dessas vias (*i.e.*, IMD e TOLL) na relação parasito – vetor envolvendo *An. darlingi* e *P. vivax*, sendo esse um estudo pioneiro na área.

Para avaliar o silenciamento desses reguladores negativos em mosquitos e o impacto na taxa de infecção por *Plasmodium* sp a maior parte dos trabalhos utiliza injeções de dsRNA, contudo essa técnica é muito laboriosa e pode afetar de forma significativa a sobrevivência dos mosquitos (GARVER et al., 2009; GARVER et al., 2012). Portanto, para diminuir o impacto da mortalidade dos mosquitos, mantendo níveis de silenciamento dos genes (Caspar e Cactus) iguais ou melhor ao padrão ouro de aplicação de dsRNA (Injeção), avaliamos alternativas para a aplicação de dsRNA (Ingestão e Aplicação Tópica) no silenciamento dos genes de interesse (Caspar e Cactus) (Figura 28).

A mortalidade é consideravelmente maior para o método de aplicação de dsRNA por injeções especialmente no grupo Cactus. Contudo, o método de aplicação de dsRNA por ingestão é menos impactante em relação a mortalidade dos mosquitos, em comparação ao primeiro método citado, e os níveis de transcrição dos genes é muito semelhante (Figuras 28, 29, 30 e 31).

O silenciamento de Cactus observado por Garver e Dimopoulos (2009) resultou na regulação da transcrição cinco vezes mais genes do que quando o gene Caspar foi silenciado, sugerindo a via TOLL pode estar associada com uma variedade de processos de desenvolvimento e proliferação de hemócitos, e esta gama de efeitos é refletido por um grande grupos de genes funcionais que podem influenciar o silenciamento e prejudicar a sobrevivência dos insetos (BELVIN et al., 1996; QUIU et al., 1998; PAL et al., 2007).

Semelhantes observações também foram feitas em larvas de *D. melanogaster* (Dif/Dorsal) silenciadas, além de outros genes da via do TOLL, estes demonstraram que quando silenciados ocorre a expressão de uma grande variedade de genes que não estão relacionados com genes o sistema imune, enquanto que o silenciamento de genes da via IMD afeta a expressão de genes do sistema imune, o que a torna muito mais específica (PAL et al., 2007). Assim, a via TOLL parece ter uma sinalização mais geral e versátil, enquanto a via IMD é mais específica a resposta imunológica, causando menor mortalidade dos mosquitos por afetar uma variedade menor de genes, o que prejudica em menor intensidade o *fitness* desses mosquitos.

Whyard e colaboradores (2009) sugerem que a técnica de aplicação de dsRNA por ingestão pode ser concebido como pesticida sob medida, uma vez que o dsRNA é altamente específico e pode matar seletivamente organismos invertebrados quando alimentados com dsRNA espécie específico visando o silenciamento de v-ATPase. Observaram em experimentos feitos com diversos organismos invertebrados que ocorre uma alta taxa de mortalidade desses organismos quando alimentados com RNAi específico (79-96%). Esses resultados de silenciamento seletivo dos genes de interesse corroboram com o que foi observado no presente trabalho, em que a ingestão de RNAi induziu o silenciamento dos genes nos mosquitos quando alimentados com dsRNA específico (Figura 31).

Yu e colaboradores (2013) afirmam que é necessário um tempo maior para absorção do dsRNA após a ingestão (~ 7 dias), assim é possível detectar a redução da transcrição do gene alvo com muito mais segurança, sugerindo que é requisito acumular moléculas de dsRNA para desencadear o

RNAi. Interessante que, mesmo com um tempo menor para observar a transcrição dos genes alvos (3 dias) observamos o silenciamento semelhante ao provocado por injeções de dsRNA (Figuras 29 e 31).

Coy et al (2012) alimentaram *Ae. aegypti* com dsRNA e obtiveram redução significativa de 2,4-2,5 vezes na expressão do gene da subunidade A da ATPase vacuolar em comparação ao controle. O dsRNA foi dissolvido em uma solução de sacarose a 10% e oferecido para os mosquitos durante 24 horas, sendo a concentração utilizada de 1µg/µl. No presente trabalho, os mosquitos se alimentaram somente por cerca de 30 minutos, resultando em graus de ingurgitamento diferentes, o que sugere que a ampliação do tempo de alimentação possa melhorar ainda mais o silenciamento dos genes de interesse (Figura 31).

Lopez-Martinez et al. (2012), observaram que o silenciamento feito através da utilização oral dsRNA utilizado para larvas de *Culex pipiens* (L.), foi alto e eficiente, atingindo 77% de silenciamento. No entanto, Hunter (1999) observou no nematódeo *C. elegans*, que a ingestão de dsRNA é menos eficaz na indução de redução da expressão gênica do que a injeção e esses dados não corroboram com os nossos, em que a expressão por ingestão foi tão significativa quanto as injeções (Figuras 29 e 31).

Para melhorar ainda mais o efeito do silenciamento por ingestão de dsRNA estes podem ser encapsulados em nanopartículas misturadas a alimentação dos insetos, isto causa maior estabilidade da partícula de dsRNA, aumentando a eficácia do RNAi (ZANGH et al., 2010).

No entanto, Araujo et al. (2006) aplicaram duas injeções de 15 µg/µL do dsRNA de NP2 em larvas de quarto estágio *R. prolixus* e demonstraram a redução na expressão do gene em 75%, já a alimentação de 1 µg/µL do mesmo dsRNA em ninfas de segundo estágio reduziu a expressão gênica em 42%. A aplicação de dsRNA por ingestão é menos traumática para as ninfas do que injeções. Após a ingestão, ninfas permaneceram saudáveis e a mortalidade foi consideravelmente inferior. Esse método apresenta outra grande vantagem, por ser mais fácil de executar no primeiro e segundo instar

de ninfas em que para a injeção seria necessário um equipamento ainda mais especializado e isso poderia resultar em uma alta taxa de mortalidade.

O método de aplicação tópica de dsRNA foi a técnica menos impactante em relação a mortalidade dos mosquitos. No entanto, não foi efetiva para o silenciamento de Caspar (Figuras 32 e 33).

Wang e colaboradores (2011) demonstraram que o método de aplicação de dsRNA através de pulverização direta em larvas da traça *Ostrinia furnacalis* é eficiente, sendo capaz de penetrar o tegumento de todas as partes do inseto através da interação com a cutícula quitinosa, não somente através de alvos específicos do intestino após a alimentação com dsRNA ou aplicação por ingestão, atingindo os genes e silenciando de forma específica, atingindo o silenciamento de 71-89%. Com esse método de aplicação de dsRNA específico na concentração de 50 µg/µl alcançaram significativamente o retardo no crescimento e desenvolvimento (~ 5 dias) desses insetos, além de níveis elevados de mortalidade (73-100%).

Larvas *Culex pipiens* (L.) foram desidratadas em uma solução de NaCl e, em seguida, re-hidratadas com dsRNA, concentração de 3,5 - 4 µg/µl, específico de expressão da proteína do gene de codificação de choque térmico 90, com isso foi observado o silenciamento de 77% desse gene, e isso persistiu da fase de pupa até a fase adulta (até o terceiro dia de vida) (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2012).

Pridgeon et al (2008) aplicaram gotículas de 0,5 µl dos dsRNA no terço do tórax de *Ae. aegypti* obtendo silenciamento significativo do gene *AaelAP1*, mas não mencionaram a concentração.

Durante experimentos com as diferentes espécies de larvas de borboleta *Spodoptera littoralis* e *Spodoptera exigua*, foi demonstrado que a penetração de dsRNA na concentração de 66 µg diluídos em 0,5 µl de acetona foi significativamente diferente (67% e 42%, respectivamente). Essa diferença acontece, pois, a penetração dos dsRNAs depende em grande medida da sua retenção e o transporte para o local alvo em combinação com a estabilidade metabólica no corpo do inseto, o que sugere que talvez sejam necessários ajustes da metodologia com insetos de espécies diferentes

(SMAGGHE et al., 1997). Apesar disso, os nossos resultados para aplicação tópica sugerem que mesmo pequenas concentrações, em relação a outros trabalhos, são capazes de causar o silenciamento de genes de interesse. No entanto, tal resultado parece não ser específico, visto que o dsRNA controle (LacZ) também é capaz de induzir o silenciamento de Cactus em *An. darlingi* (Figura 33) de forma semelhante ao observado com as injeções para esse gene (Figura 29).

De maneira global, a indução do silenciamento dos genes Caspar e Cactus, pelas técnicas avaliadas (injeção, ingestão ou aplicação tópica, exceto para Caspar) foi possível em *An. darlingi* em relação com os níveis de transcrição em mosquitos não manipulados, mas o efeito no bloqueio da infecção por plamódios para os métodos de ingestão e aplicação tópica, além do efeito inespecífico dos dsRNA controle ainda precisam ser avaliados.

6.2 Sobrevivência diária de *Anopheles darlingi* após Injeção de dsRNA e Infecção pelo *Plasmodium vixax*

Embora os efeitos nocivos da resposta inflamatória em mamíferos estejam bem estabelecidos, a situação é menos clara com os invertebrados e até mesmo com o modelo mais estudado desse grupo, *D. melanogaster*. Em alguns casos, a ausência de reguladores basais leva a uma vida útil reduzida, o que, no entanto, não pode ser atribuída especificamente a ativação das vias de sinalização do sistema imune e reguladores negativos, uma vez que estes reguladores podem agir sobre múltiplos alvos e podem desencadear uma resposta a outros reguladores dentro da mesma via (LEE & FERRANDON, 2011).

A via IMD tem uma resposta rápida, que é provavelmente mais eficaz contra patógenos, tais como bactérias (KLEINO & SILVERMAN, 2014). No entanto, o controle desta via resulta em vida útil reduzida, propondo que a

conservação de uma imunidade ativa é fisiologicamente custosa a longo prazo (Figura 27) (DEVEALE et al, 2004; LIBERT et al, 2006).

A mortalidade após 12 dias foi significativamente maior nos grupos injetados com dsRNA Cactus aos demais (Figura 34). Nos mosquitos injetados com dsRNA Cactus houve mortalidade de 29% dos mosquitos logo após 24h, corroborando o que foi encontrado por Garver e colaboradores (2009), que relataram que o silenciamento de Cactus em *An. gambiae* diminuiu significativamente o *fitness* desse mosquito, causando diminuição da longevidade e produção de ovos (50% de diminuição), o que pode estar ligado ao grande número de genes ativados após o silenciamento desse gene.

O custo em relação a diminuição do *fitness* dos mosquitos que leva a alta taxa de mortalidade após o silenciamento gênico, principalmente de Cactus da via TOLL (GARVER et al, 2009), pode reduzir o potencial de transmissão desse inseto, dado que a sobrevivência diária é um importante componente da capacidade vetorial (GARRET-JONES, 1964).

Outros estudos, mais especificamente, com *D. melanogaster*, sobre a relação entre o tempo de vida e ativação de defesa imunológica têm mostrado que a montagem de uma resposta imune acelera o envelhecimento dos insetos, reduzindo significativamente o tempo de vida desses insetos (LIBERT et al., 2006; ROBB & FORBES, 2006).

Em *Drosophila*, a via de TOLL é importante para uma resposta antiviral capaz de reduzir o título viral em 50%, sugerindo que a ativação constitutiva da via de TOLL é capaz de retardar a replicação viral. No entanto, observa-se que a competição entre o curso da replicação de vírus e resposta imune do hospedeiro podem causar efeitos que aumentam a mortalidade dos insetos (ZAMBON et al., 2005).

A mortalidade dos mosquitos 72h após as injeções, período anterior as infecções, foi reduzido (Figura 34), pois a cinética de silenciamento de genes mediada por dsRNA sugere que a indução das vias através de silenciamento de reguladores negativos persistisse durante um certo período de tempo e

depois diminui ao longo do tempo que os dsRNAs são degradados (GARVER et al, 2009). Além disso, Frolet et al. (2006) sugerem que um reforço molecular da imunidade basal (ativação das vias imunes) antes da infecção faz com que haja um perfil diferente da transcrição de genes do sistema imune do que quando acontece a infecção.

Observamos, também, que ocorreu uma considerável mortalidade, em todos os grupos experimentais após a infecção (Figura 27). Vários estudos mostram que a mortalidade que ocorre em anofelinos observada depois de um repasto sanguíneo com amostras infectas por *Plasmodium* são consequência da presença desses parasitas. A presença dos mesmos provoca vários danos aos tecidos do estômago e das glândulas salivares dos vetores ao atravessarem estas, além de alterações fisiológicas como diminuição nos níveis de aminopeptidase e o esgotamento das reservas dos mosquitos como a baixa concentração de aminoácidos, o que pode alterar até mesmo danos na vitelogênese e esgotamento de reservas nutricionais para a geração subsequente (AHMED et al., 1999; FERGUSON e READ, 2002; KOELLA & SORENSEN, 2002).

Sabe-se que a resposta imune dos mosquitos é dependente do sexo, idade e estado reprodutivo (CHUN et al, 1995; SCHWARTZ & KOELLA, 2002). No entanto, a eficácia do controle dos parasitas após a infecção, também dependerá em larga medida da eficácia da resposta imune desses mosquitos em situações naturais, isto é, na medida em que a resposta imunitária depende de fatores não genéticos (BOETE & KOELLA, 2002), tais como condições de criação das larvas: mosquitos que foram bem nutridos como larvas têm uma resposta de melanização mais forte do que os mosquitos sub-nutridos (SUWANCHAICHINDA & PASKEWITZ, 1998). Por não existir colônia de *An. darlingi*, no Brasil, e no nosso trabalho utilizarmos fêmeas de mosquitos F1, em que não são conhecidas as situações nutricionais da sua matriz, isso pode ter desencadeado a considerável diminuição da sobrevivência dos mosquitos do grupo controle não manipulado (Figura 34).

Os presentes resultados corroboram com o que Ferguson e Read (2002) observaram. Nesse caso, os autores relataram que a sobrevivência de *An. stephensi* é significativamente reduzida após a alimentação com sangue infectado com *P. chabaudi*, quando comparada com o grupo controle não manipulado. Além disso, notaram que a carga parasitária (número de oocistos) e a taxa de infecção potencializa a mortalidade, no entanto isso está relacionado com a virulência dos parasitas, *i. e.*, a mortalidade do vetor variou significativamente entre os genótipos dos parasitas.

A mortalidade proveniente da infecção, também, foi observada por Anderson e colaboradores (2000), que afirmam que a patologia induzida por infecções de plasmódio, principalmente onde ocorrem muitos oocistos, aumenta a mortalidade de *An. gambiae* infectados com *P. falciparum* (37,5% de mortalidade), o que corresponde a quase o triplo da mortalidade observada no grupo controle do presente estudo (13%) (Figura 34). Além do que, ocorrem alterações no comportamento alimentar associado à infecção por malária, o que também contribui para maior mortalidade de mosquitos infectados em relação aos indivíduos não infectados.

A resposta imunitária provocada pela presença do agente patogénico (*Plasmodium* sp) provoca grande gasto de energia e esgota os recursos utilizados para o desenvolvimento destes mosquitos. Além disso, as alterações no comportamento destes vetores podem também aumentar a mortalidade (SANGARE et al., 2014). Nos mosquitos infectados ocorre uma mudança no comportamento e na sua fisiologia, que altera a vitelogenese e a capacidade de se alimentar. *An. stephensi* infectados com *P. yoelii* apresentam 53% menos capacidade de se alimentar do que os mosquitos não infectados, o que leva a diminuição do tempo de vida desses mosquitos. Conclui-se que as mudanças no comportamento alimentar de mosquitos mediadas pela infecção pelo parasita são sensíveis a presença do parasita e que essas mudanças têm implicações importantes para a epidemiologia da malária (ANDERSON et al., 1999).

6.3 Efeito do Silenciamento de Caspar e Cactus na Infecção e Produção de Oocistos de *Plasmodium vivax* em *Anopheles darlingi*

De forma geral, nossos resultados sugerem que a frequência de mosquitos infectados no grupo injetado com dsRNA de Caspar foi menor do que nos demais grupos e resultados semelhantes foram observados para diferentes espécies de anofelinos infectados com *P. falciparum* (Garver et al, 2009).

O gene Caspar é um regulador negativo de IMD importante no controle de *P. falciparum* em outras espécies de anofelinos como *An. gambiae*, *An. albimanus* e *An. stephensi*, como demonstrado no trabalho de Garver e colaboradores (2009). Nesse trabalho, os autores relataram que ao infectar essas espécies de mosquitos após injeções do dsRNA de Caspar e Cactus ocorria a ativação da via IMD com muito mais eficiência para o bloqueio da infecção por *P. falciparum*, enquanto o tratamento com dsRNA para Cactus era mais eficiente para o controle de *P. berghei* (GARVER et al., 2009). Garver et al (2012) demonstraram que silenciando apenas Caspar em *An. gambiae* resultou em uma resposta suficientemente robusta contra *P. falciparum*. Além disso, o efeito do silenciamento foi efetivo em limitar a infecção do mosquito por esse plasmódio em experimentos infectando artificialmente os mosquitos com baixa, média e alta quantidade de gametócitos.

Outro argumento relevante diz respeito ao silenciamento do homólogo de Caspar no vetor da leishmaniose visceral, *Lutzomyia longipalpis* (TELLERIA et al., 2012). O silenciamento de Caspar levou a redução significativa do número de *Leishmania mexicana* e a porcentagem de insetos infectados por *Leishmania infantum* foi bastante reduzida (85% para 45%). Assim como em mosquitos, a resposta é robusta, mas depende também da espécie do parasito. Com isso, a investigação desse gene parece adequada para avaliação do sistema imune de *An. darlingi* contra *P. vivax*.

No entanto, existe certa dificuldade em avaliar e interpretar esses experimentos, pois como pode ser observado na metodologia, os mosquitos

F1 utilizados nos experimentos foram oriundos de fêmeas de campo e, a fonte de infecção, do sangue infectado por *P. vivax* de pacientes locais, levando certamente a uma significativa variação genética e fenotípica, o que deve estar associado aos resultados obtidos. Em alguns sistemas como *An. darlingi/P. vivax*, não há, ainda, colônias do mosquito no Brasil ou culturas do parasito, mas dada a importância desse sistema vetor/parasito na Amazônia é importante que sejam avaliados.

Por um outro lado, a maioria dos experimentos relacionados aos diferentes trabalhos na literatura são realizados utilizando-se colônias e culturas de células com alto grau de endocruzamento ou endogamia e redução da pressão seletiva, levando a perda de variabilidade genética e do *fitness*. Sendo assim, os modelos desenvolvidos em laboratório devem ser validados em situações de campo, pois há significativas diferenças na regulação gênica entre populações de campo e laboratório após a infecção por bactérias, por exemplo (AGUILAR et al., 2005; GARVER et al., 2009; GARVER et al., 2012; TELLERIA et al., 2012).

Em relação ao número de oocistos, os resultados sumarizados desses experimentos indicam diferenças significativas no número de oocistos entre os mosquitos injetados com dsRNA de Caspar, Cactus e os grupos controles (Não Manipulados, e dsRNA Controle LacZ), corroborando o papel de Caspar em outros sistemas vetor/parasito envolvendo *Anopheles* e *Plasmodium* (GARVER et al., 2009 e 2012). No entanto, não foi observado diferença significativa entre o grupo injetado com Cactus e o controle para injeção de dsRNA (LacZ), o que não foi observado em outro trabalho semelhante com *An. gambiae*, *An. stephensi*, *An. albimanus* (GARVER et al., 2009).

Telleria e colaboradores (2012), observaram que ao aplicar os dsRNAs Caspar (dsRNA tratamento) e GFP (dsRNA controle) em *Lutzomyia longipalpis* a expressão de Caspar foi três vezes menor do que o controle não injetado e somente duas vezes menor do que o dsRNA controle (GFP). Essa redução na expressão de Caspar levou a uma diminuição de 85 para 45% de flebotómos infectados com *Leishmania infantum*, no entanto a aplicação de GFP (dsRNA controle), também, levou a redução desses insetos com o

parasita de 95 para 85%, resultados que corroboram com o que encontramos nos mosquitos injetados com dsRNA Caspar. Esses autores observaram que o número de parasitas no intestino foi reduzido com as injeções de dsRNA específico (Caspar e Cactus) e dsRNA controle (LacZ) e o mesmo foi observado nos nossos resultados (Figuras 35 e 36).

Ferguson & Read (2002), observaram que *Anopheles stephensi* infectados com *Plasmodium chabaudi* as interações genótipo e meio ambiente foram importantes para a taxa de infecção. Usando linhagens CR e ER de *P. chabaudi*, obtiveram a taxa de infecção de 50 e 65%, e o número de oocistos de 92 e 30, respectivamente. A taxa de infecção encontrada para a primeira linhagem corrobora com os nossos resultados, em que no grupo controle não manipulado 70% dos mosquitos foram infectados, por outro lado a carga parasitária (número de oocistos) observada foi muito maior nas duas linhagens do que a encontramos para *Anopheles darlingi* (Mediana= 8,5 oocistos) (Figuras 35 e 36). Os autores, também, observaram que a mudança ou privação na dieta podia diminuir significativamente a taxa de infecção e carga de parasitária.

Além da grande variabilidade genética dos mosquitos, alguns fatores ambientais como alimentação podem influenciar significativamente a expressão da resistência genética e alterar profundamente padrões de doença e resposta do hospedeiro à seleção. Diferentes dietas para *An. stephensi* infectados com *P. yoelli* alteraram a carga média de infecção e, em particular, a sua variação hereditária nos mosquitos, o que sugere que o ambiente afeta a expressão e a evolução da resistência dos mosquitos na natureza (LAMBRECHTS et al. 2014). A maior parte das pesquisas com sistema imune de mosquitos investiga a taxa de infecção de mosquitos e parasitas provenientes de colônia e cultivo, respectivamente. Contudo, mosquitos selvagens como *An. darlingi* e parasitas não provenientes de cultivo, como *P. vivax*, representam uma relação parasito-mosquito mais próxima possível da realidade, embora isso seja de difícil interpretação e apresente uma carga de infecção muito variável entre os indivíduos.

No trabalho realizado por Rios-Velásquez e colaboradores (2013) com diferentes anofelinos (*An. darlingi*, *An. albitalis*, *An. nuneztovari* e *An. triannulatus*. E *An. aquasalis*) infectados com *P. vivax*, foi demonstrado uma taxa de infecção e número de oocistos entre as espécies de mosquitos muito variável. Os mosquitos *An. darlingi* infectados totalizaram 18,3% e a carga parasitária corresponde a mediana de 7 de oocistos. A taxa de infecção observada no presente trabalho foi muito maior do que a observada por Rios-Velásquez e colaboradores (2013) (70%), contudo a carga parasitaria foi muito semelhante (Mediana= 8,5) (Figura 36). Os autores, também, observaram que a taxa de infecção foi aumentada significativamente, para essa espécie de mosquito, com o aumento do número de gametócitos e a inativação do soro, o que sugere que fatores do complemento bem como o sistema imune dos mosquitos podem influenciar na infecção.

Vijay et al. (2011) em trabalho feito com *An. culicifacies* infectados com *P. vivax*, sugerem que a capacidade de resposta inata de mosquitos refratários a infecção pode representar função ancestral do sistema imunitário do mosquito contra o parasita, por isso algumas espécies apresentam mais suscetibilidade a infecção do que outras.

O silenciamento de Caspar (IMD) e Cactus (TOLL) causou uma grande diminuição do número de oocistos, principalmente quando o gene Caspar foi silenciado (Figura 30).

De forma geral, observamos um baixo número de oocistos durante os experimentos, mesmo nos mosquitos não manipulados, o que corrobora com o que normalmente é observado em condições de campo, i.e., a maioria dos mosquitos não apresentam nenhum oocisto e poucos apresentando entre 6-10. Já em laboratório o número de oocistos segue uma distribuição uniforme com vários indivíduos, portanto um grande número de oocistos. Apesar disso, mesmo anofelinos de laboratório podem apresentar grande variação no número de plasmódios colonizando seus intestinos (MAROIS, 2011). Na verdade, a carga de infecção em mosquitos *An. darlingi* é muito semelhante ao observado em mosquitos do campo da mesma espécie (RIOS-VELÁSQUEZ et al., 2013).

A formação de oocistos também foi analisada nas espécies *An. stephensi*, *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, vetores de *P. gallinaceum*, e foi observado maiores números de oocistos em *An. gambiae* quando comparado a *Aedes aegypti*. Com isso, é notável que os mecanismos de resposta à infecção com *Plasmodium* dependem das espécies envolvidas, *i.e.*, *Plasmodium*, mosquitos e populações (genótipos) (ALAVI et al., 2003).

Nossos resultados fornecem uma base na compreensão molecular das vias de sinalização do sistema imune (IMD e Toll), através dos reguladores negativos (Caspar e Cactus, respectivamente), bem como seus papéis na regulação da resposta imune do vetor *Anopheles darlingi* contra *Plasmodium vivax*. Contudo, torna-se imprescindível mais investigações sobre as cascatas de sinalização do sistema imunológico e seu papel na sobrevivência de *Plasmodium vivax* e a influência desses reguladores na competência vetorial de *Anopheles darlingi*.

CONCLUSÕES

1. As diferentes técnicas utilizadas para entrega do dsRNA, i.e., injeção, ingestão e aplicação tópica, de Caspar e Cactus são capazes de induzir o silenciamento significativo desses genes e causam diferente impacto na sobrevivência de *An. darlingi*.
2. As injeções de dsRNAs específicos foram capazes de reduzir a expressão dos genes Caspar e Cactus, mas as injeções de dsRNA de Cactus em *An. darlingi* causaram diminuição significativa da sobrevivência do mosquito.
3. A frequência de mosquitos infectados por *P. vivax* foi apenas alterada após o silenciamento de Caspar, mas a injeção de dsRNAs causam redução significativa do número de oocistos, principalmente no grupo injetado com dsRNA de Caspar.

PERSPECTIVA

1. Realizar experimentos de infecção, a fim de investigar se os métodos de administração alternativa de RNAi, principalmente ingestão, que demonstrou silenciamento significativo em ambos os genes (Caspar e Cactus), realmente é eficiente para o bloqueio de *P. vivax* em *Anopheles darlingi*,
2. Verificar como os genes Caspar e Cactus funcionam na presença de oocistos jovens, maduros e tardios.
3. Analisar o efeito do silenciamento de Caspar e Cactus no bloqueio de esporozoítos.
4. Conferir se o silenciamento de genes da via Jack-STAT é eficiente no bloqueio de *P. vivax* em *Anopheles darlingi*.
5. Analisar se o encapsulamento em lipossomas de RNAi pode auxiliar no aumento do silenciamento gênico.
6. Investigar novas moléculas que ativem de forma eficiente as vias do sistema imune de *Anopheles darlingi* (IMD, TOLL e Jack-STAT).

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, K. F.; RUS, C.; VRIESEMA-MAGNUSON, D.; ERTURK-HASDEMIR, N. PAQUETTE, O.; SILVERMAN N. Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. **PLoS Pathogens**, v. 4: 100-120, 2008.

AGGARWAL, K.; SILVERMAN, N. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. **BMB Reports**, v. 41: 267–77, 2008.

AGUILAR, R.; DONG, Y.; WARR, E.; DIMOPOULOS, G. *Anopheles* infection responses: laboratory models versus field malaria transmission systems. **Acta Tropica**, v. 95: 285-291, 2005.

AHMED, A. M; MAINGON, R. D.; TAYLOR, P. J; HURD, H. The effects of infection on the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 36: 10-13, 1999.

ALAVI, Y.; ARAI, M.; MENDOZA, J.; TUFET-BAYONA, M.; SINHA, R.; FOWLER, K.; BILLKER, O.; FRANKE-FAYARD, B.; JANSE, CJ.; WATERS, A.; SINDEN, R. E. The dynamics of interactions between Plasmodium and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **International Journal for Parasitology**, v. 33: 933-943, 2003.

ANDERSON, R. A.; KNOLS, B. G., KOELLA, J. C. *Plasmodium falciparum* sporozoites increase feeding-associated mortality of their mosquito hosts *Anopheles gambiae* s.l. **Parasitology**, v. 4 :329-33, 2000.

ANDERSON, R. A.; KOELLA, J. C.; HURD, H. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. **The Royal Society**, v. 266: 1430-1442,1999.

ANSTEY, N. M.; RUSSEL, B.; YEO, T.W.; PRICE, R.N. The pathophysiology of *vivax* malária. **Trends in Parasitology**, v. 5: 220-227, 2009.

ARAUJO, R. N.; SANTOSA, A, A.; PINTO, F. S. A.; GONTIJO, N. F. A.; LEHANE, M.J.; PEREIRA, M.H. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by RNAi ingestion or injection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36: 683-693, 2006.

BAHIA, A. C.; KUBOTA, M. S.; TEMPONE, A. J.; PINHEIRO, W. D.; TADEI, W. P.; SECUNDINO, N. F. C.; TRAUB-CSEKO, Y. M.; PIMENTA, P. F. P. *Anopheles aquasalis* Infected by *Plasmodium vivax* Displays Unique Gene Expression Profiles when Compared to Other Malaria Vectors and Plasmodia. **Plos One**, v. 53: 95-97, 2010.

BELVIN, M.P.; ANDERSON, K. V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 12: 393-416, 1996.

BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M.J. **Biology of the Insect Midgut: Structure and Ultra- structure of the Insect Midgut**. London: Chapman & Hall, pp. 3-30, 1996.

BLANDIN, S. A.; LEVASHINA, E. A. Phagocytosis in mosquito immune responses, **Immunological reviews**, v. 219: 8-16, 2007.

BLANDIN, S.; LEVASHINA, E. Mosquito immune responses against malaria parasites. **Current Opinion in Immunology**, v. 16: 16-20, 2004.

BOETE, C.; KOELLA, J.C. A Theoretical Approach to Predicting the Success of Genetic Manipulation of Malaria Mosquitoes in Malaria Control. **Malaria Journal**, v. 1: 3, 2002.

BUCHON, N.; BRODERICK, N. A.; POIDEVIN, M.; PRADERVAND, S.; LEMAITRE, B. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. **Cell Host & Microbe**, v. 5: 200–211, 2009.

CASTILLO, J. C.; ROBERTSON, A. E.; STRAND, M. R. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular**, v. 36: 891-903, 2006.

CHARLES, C. A. & JONNISON, F. N. **Introdução ao estudo dos insetos**. 7^a ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2011.

CHEN, Y.; WENG, Z. H.; ZHENG, L. Innate immunity against malaria parasites in *Anopheles gambiae*. **Insect Science**, v. 15: 45-52, 2008.

CHRISTENSEN, B. M.; LI, J.; CHEN, C. C.; NAPPI, A. J. Melanization immune responses in mosquito vectors. **Trends Parasitology**, v. 21: 192-199, 2005.

CHRISTOPHIDES, G. K.; ZDOBNOV, E.; BARILLAS-MURY, C.; BIRNEY, E.; BLANDIN, S.; BLASS, C.; BREY, P. T.; COLLINS, F. H.; DANIELLI, A.; DIMOPOULOS, G.; HETRU, C.; HOA, N. T.; HOFFMANN, J. A.; KANZOK, S. M.; LETUNIC, I.; LEVASHINA, E. A.; LOUKERIS, T. G.; LYCETT, G.; MEISTER, S.; MICHEL, K.; MOITA, L. F.; MÜLLER, H. M.; OSTA, M. A.; PASKEWITZ, S. M.; REICHHART, J. M.; RZHETSKY, A.; TROXLER, L.; VERNICK, K. D.; VLACHOU, D.; VOLZ, J.; MERING, C. V.; XU, J.; ZHENG, L.; BORK, P.; KAFATOS, F. C. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 298: 159-165, 2002.

CHUN, J., RIEHLE, M.; PASKEWITZ, S. M. Effect of Mosquito Age and Reproductive Status on Melanization of Sephadex Beads In *Plasmodium*-Refractory and Susceptible Strains of *Anopheles gambiae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, 11-17, 1995.

CIRIMOTICH, C. M.; DONG, Y.; GARVER, L. S.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. Mosquito immune defenses against *plasmodium* infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34: 387-395, 2010.

COLLINS, F. H.; SAKAI, R. K.; VERNICK, K. D.; PASKEWITZ, S.; SEELEY, D. C.; MILLER LH, et al. Genetic selection of a *Plasmodium* refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 234: 234: 607-610, 1986.

CONSOLI, R. A. G. B. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

COY, M. R.; SANSCRAINTE, N. D.; CHALAIRE, K. C.; INBERG, A.; MAAYAN, I.; GLICK, L.; PALDI, N.; BECNEL, J. J. Gene silencing in adult *Aedes aegypti* mosquitoes through oral delivery of double-stranded RNA. **Journal of Applied Entomology**, v. 10: 741-748, 2012.

DEANE, L. M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81: 5-14, 1986.

DEANE, L. M.; CAUSEY, O. R.; DEANE, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 1: 827- 965, 1948.

DESBROCHE, N.; BELTRAMO, C., E GUZZO, J. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lac-tic acid bacterium *Oenococcus oeni*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60: 325-333, 2005.

DIEHLMANN, H. Laboratory Rearing of Mosquitoes Using a Hemotek Feeding System. **Proceedings of the 3rd International Conference of Urban Pests**, v. 5: 10-13 1999.

DIMOPOULOS, G.; MÜLLER, H. M.; LEVASHINA, E.; KAFATOS, F. C. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. **Current Opinion in Immunology**, v.13: 79-88, 2001.

DIMOPOULOS, G.; MÜLLER, H. M.; LEVASHINA, E.; KAFATOS, F.C. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. **Current Opinion in Immunology**, v. 13: 79-88, 2001.

DIMOPOULOS, G.; RICHMAN, A.; MÜLLER, H. M.; KAFATOS, F. C. 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**, v. 94: 11508-11513, 1997.

DIMOPOULOS, G.; RICHMAN, A.; MÜLLER, H.M.; KAFATOS, F.C. 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**, v. 94: 08-13, 1997.

DIMOPOULOS, G.; SEELEY, D.; WOLF, A.; KAFATOS, F. C. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. **The EMBO Journal**, v. 21: 6115-6123, 1998.

DONG, Y.; AGUILAR, R.; XI, Z.; WARR, E.; MONGIN, E.; DIMOPOULOS, G. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. **PLoS Pathogens**, v. 6: e52, 2006. doi:10.1371/journal.ppat.0020052

DOSTERT, C.; JOUANGUY, E.; IRVING, P.; TROXLER, L.; GALIANA-ARNOUX, D.; HETRU, C. et al. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. **Nature Immunology**, v. 6: 946–953. 2005.

DREXLER, A. L.; VODOVOTZ, Y.; LUCKHART, S. *Plasmodium* development in the mosquito: biology bottlenecks and opportunities for mathematical modeling. **Trends in Parasitology**, v. 24: 333–336, 2008.

FERGUSON, H. M.; READ, A. R. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? **Trends in Parasitology**, v. 18: 256-260, 2002.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, 806-811, 1998.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. Vol. II. São Paulo: Edusp, 2002.

FROLET, C.; THOMA, M.; BLANDIN, S.; HOFFMANN, J. A.; LEVASHINA, E. A. Boosting NF-kappaB-dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts development of *Plasmodium berghei*. **Immunity**, v. 25: 677-685, 2006.

GAMA, R. A.; SILVA, I. M.; GEIER, M.; EIRAS, A. E. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 6: 8-13, 2013.

GARVER L. S.; BAHIA, A. C.; DAS, S.; SOUZA-NETO, J. A.; SHIAO, J. *Anopheles* Imd Pathway Factors and Effectors in Infection Intensity-Dependent Anti- *Plasmodium* Action. **PLoS Pathogens**, v. 8: 100-107, 2012.

GARVER, L. S.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. **PLoS Pathogens**, v. 5: 100- 105, 2009.

GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; KATSURAGAWA, T. H.; RIBOLLA, P. E. M. PEREIRA-DA-SILVA, L. H. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian western Amazon) II: perennial transmission with high anopheline densities are associated with human environmental changes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102: 271-76, 2007.

GIL, L. H.; ALVES, F. P.; ZIELER, H.; SALCEDO, J. M. V.; DURLACHER, R. R.; CUNHA, R. P. A.; TADA, M. S.; CAMARGO, L.M. A.; CAMARGO, E. P.; PEREIRA-DA-SILVA, L. H. Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia. **Journal of Medical Entomology**, v. 5: 636-641, 2003.

GUPTA, L. A.; MOLINA-CRUZ, S. KUMAR.; RODRIGUES, J.; DIXIT, R.; ZAMORA, R. E.; BARILLAS-MURY, C. The STAT pathway mediates late-phase immunity against *Plasmodium* in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Cell Host Microbe**, v. 5: 498-507, 2009.

HILLYER, J. F. Integrated Immune and Cardiovascular Function in Pancrustacea: Lessons from the Insects. **Integrative and Comparative Biology**, v. 55: 843-855, 2015.

HILLYER, J. F. **Invertebrate Immunity: Mosquito immunity**, v. 708: 218-238, 2010.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT S. L.; CHRISTENSEN, B. M. The antibacterial innate immune response by the mosquito *Aedes aegypti* is mediated by hemocytes and independent of Gram type and pathogenicity. **Microbes and infection**, v. 6: 448-459, 2004.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and *Plasmodium* sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Parasitology**, v. 89: 62-69, 2003.

HILLYER, J. F.; STRAND, M. R. Mosquito hemocyte-mediated immune responses. **Curr Opin Insect Sci**, v.3: 14-21, 2014.

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. **Nature Immunology**, v. 3: 121-126, 2002.

HUME, J. C.; TUNNICLIFF, M.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C.; DAY, K. P. Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 6: 139-142, 2007.

HUNTER, C. P. Genetics: a touch of elegance with RNAi. **Current Opinion in Immunology**, v. 9: 440-442, 1999.

KAMBRIS, Z.; BLAGBOROUGH, A.M.; PINTO, S.B.; BLAGROVE, M.S.C.; GODFRAY, H.C.J.; SINDEN, R.E.; SINKINS, S.P. *Wolbachia* Stimulates Immune Gene Expression and Inhibits *Plasmodium* Development in *Anopheles gambiae*. **PLoS Pathogens**, 6: e1001143, 2010. doi:10.1371/journal.ppat.1001143

KANEKO, T.; SILVERMAN, N. Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. **Cellular Microbiology**, v. 7: 461-469, 2005.

KATSURAGAWA, T. H.; CUNHA, R. P.; SOUZA, D. C.; GIL, L. H.; CRUZ, R. B.; SILVA, A. A.; TADA, M. S.; PEREIRA, S. L. H. Malaria and hematological aspects among residents to be impacted by reservoirs for the Santo Antonio and Jirau Hydroelectric Power Stations, Rondonia State, Brazil]. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25: 1486-1492, 2009.

KATSURAGAWA, T. H.; FONTES, C. J. F.; Gil, L. H. S.; LIMA, A. A.; FREITAS, E. M.; SANTOS, T. M.; NASCIMENTO F. M. T.; SANTOS, J.; JUSTINIANO, A. P.; SILVA, J. M.; RODRIGUES, A. F.; TADA, M. S.; PEREIRA DA SILVA, L. H. Selective Intermittent Preventive Treatment of *vivax* Malaria: Reduction of Malaria Incidence in an Open Cohort Study in Brazilian Amazon. **Malaria Research and Treatment**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

KLEIN, T. A.; LIMA, J. B.; TADA, M. S.; MILLER, R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45: 463-470, 1991.

KLEINO, A & SILVERMAN, N. UnZIPping Mechanisms of Effector-Triggered Immunity in Animals. **Cell Host & Microbe**, v. 11: 320-322, 2012.

KOELLA, J. C.; SORENSEN, F. L. Effect of adult nutrition on the melanization immune response of the malaria vector *Anopheles stephensi* **Medical and Veterinary Entomology**, v. 16: 316-320, 2002.

KRYWINSKI, J.; BESANSKY, N. J. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. **Annual Review of Entomology**, v. 48: 111-139, 2003.

KUMAR, S.; GUPTA, L.; HAN, Y. S.; BARILLAS-MURY, C. Inducible Peroxidases Mediate Nitration of *Anopheles* Midgut Cells Undergoing Apoptosis in Response to *Plasmodium* Invasion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279: 53475–53482, 2004.

LAI, S. C.; CHEN, C. C.; HOU, R. F.; Immunolocalization of prophenoloxidase in the process of wound healing in the mosquito *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 39: 266-274, 2002.

LAMBRECHTS, L.; JEAN-MARC C.; SNOUNOU, G.; KOELLA, J. C. Environmental influence on the genetic basis of mosquito resistance to malaria parasites. **Proceedings of the Royal Society**, v. 273: 1501-1506, 2006.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32: 1295-1309, 2002.

LEE, K. Z.; FERRANDON, D. Negative regulation of immune responses on the fly. **The EMBO Journal**, v. 30: 988–990, 2011.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster* **Annual Review of Immunology**, v. 25: 697-743, 2007.

LEVASHINA, E. A. Immune responses in *Anopheles gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34: 673-678, 2004.

LEVASHINA, E. A.; LANGLEY, E.; GREEN, C.; GUBB, D.; ASHBURNER, M.; HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. **Science**, v. 285: 1917-1919, 1999.

LIBERT, S.; CHAO, Y., CHU, X.; PLETCHER, S. D. Trade-offs between longevity and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster* are mediated by NFkappaB signaling. **Aging Cell**, v. 5: 533-543, 2006.

LOPEZ-MARTINEZ, G.; MEUTI, M.; DENLINGER, D. L. Rehydration Driven RNAi: A Novel Approach for Effectively Delivering dsRNA to Mosquito Larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 49: 215-218, 2012.

LOPEZ-MARTINEZ, S.; GIANCARLO, A.; MEGAN, M.; DENLINGER, D. L. Rehydration Driven RNAi: A Novel Approach for Effectively Delivering RNAi to Mosquito Larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 49: 215-218, 2012.

MACHADO, R. L. D.; COUTO, A. A. R. D.; CAVASINI, C. E.; CALVOSA, V. S. P.; Malaria outside the Brazilian Amazonian region: the situation in Santa Catarina State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36: 581-586, 2003.

MAILLET, F.; BISCHOFF, V.; VIGNAL, C.; HOFFMANN, J.; ROYET, J. The *Drosophila* peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation. **Cell Host Microbe**, v. 3: 293-303, 2008.

MARCONDES, C.B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001.

MARINOTI, O. et al. The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. **Journal of Nucleic Acids**, v. 6: 1-14, 2013.

MAROIS, E. The multifaceted mosquito anti-Plasmodium response. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14: 429-435, 2011.

MEISTER, S.; AGIANIAN, B.; TURLURE, F.; RELOGIO, A.; MORLAIS, I.; KAFATOS, F. C.; CHRISTOPHIDES, G. K. *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. **PLoS Pathogens**, v. 5: 500-512, 2009.

MICHEL, K.; KAFATOS, F. C. Mosquito immunity against *Plasmodium*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, 677-689, 2005.

MINISTERIO DA SAÚDE. Manual para Profissionais de Saúde na Atenção Básica . **Ações de Controle da Malária**. 2006.

MITRI, C.; JACQUES, J. C.; THIERY, I.; RIEHLE, M. M.; XU, J.; BISCHOFF, E.; MORLAIS, I.; NSANGO, S. E.; VERNICK, K. D.; BOURGOUIN, C. Fine pathogen discrimination within the APL1 gene family protects *Anopheles gambiae* against human and rodent malaria species. **PLoS Pathogens**, v. 5: 100-105, 2009.

MORAIS, S. A.; URBINATTI, P. R.; SALLUM, M. A. M.; KUNIY, A. A.; MORESCO, G. G.; FERNANDES, A.; NAGAKI, S. S.; NATAL, D. Brazilian Mosquito (Diptera: Culicidae) Fauna. I. *Anopheles* Species from Porto Velho, Rondônia State, Western Amazon, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6: 331-335, 2012.

MOURÃO, F. R.; ALAN CAVALCANTI C.; SILVA, R. A.; SOUZA, E. B. A vigilância da malária na Amazônia Brasileira. **Biota Amazônia**, v. 4: 161-168, 2014.

MS/SVS - Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

MULLEN, G. R.; DURDEN, L. A. **Medical and veterinary entomology**. 2 ed. Academic Press, 2009.

NAPPI, A.; POIRIE, M.; CARTON, Y. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. **Advances in parasitology**, v. 70: 99-121, 2009.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 9ª ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAIUL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, 9: e115, 2010. doi: 10.1186/1475-2875-9-115

PAL, S.; WU, J.; WU, L. P. Microarray analyses reveal distinct roles for Rel proteins in the *Drosophila* immune response. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32: 50-60, 2007.

PERANDIN, F.; MANCA, N.; CALDERARO, A. et al. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis. **Microbiology**, v. 42: 1214-1219, 2004.

PIMENTA PF, TOURAY M, MILLER L. The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41: 608 -624, 1994.

PRIDGEON, J. W.; ZHAO, L.; BECNEL, J. J.; STRICKMAN, D. D.; CLARK, G. G.; LINTHICUM, K. J. Topically Applied *AaeIAP1* Double-Stranded RNA Kills Female Adults of *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45: 414-420, 2008.

QIU, P.; PAN, P. C.; GOVIND, S. A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. **Development**, v. 125: 1909-1920, 1998.

RACHOU, R.G. Anofelinos do Brasil. Comportamento das espécies vetoras de malária. **Revista Brasileira de Malariologia**, v. 10: 145-181, 1958.

REY, L. **Parasitologia** – Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RICHMAN, A. M.; DIMOPOULOS, G.; SEELEY, D.; KAFATOS FC. *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. **The EMBO journal**, v. 20: 6114-6119, 1997.

RIOS-VELÁSQUEZ, C. M.; KEILLEN, M.; SIMÕES, R. C.; IZZO, T.; SANTOS, E. V.; PESSOA, F. A. C.; LIMA, J. B. P.; MONTEIRO, W. M.; SECUNDINO, N. F. C.; LACERDA, M. V. G.; TADEI, W. P.; PIMENTA, P. F. P. Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 12: 460-468, 2013.

ROBB, T.; FORBES, M. Age-dependent induction of immunity and subsequent survival costs in males and females of a temperate damselfly. **BMC Ecology**, v. 6: 15, 2006. doi: 10.1186/1472-6785-6-15

SANGARE, I.; DABIRE, R.; YAMEOGO, B.; MICHALAKIS, Y.; COHUET, A. Stress dependent infection cost of the human malaria agent *Plasmodium falciparum* on its natural vector *Anopheles coluzzii*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25: 57–65, 2014.

SCHRIEFER, M. E.; SACCI, J. R. J. B.; WIRTZ, R. B.; AZAD, A. F. Detection of Polymerase Chain Reaction-Amplified Malarial DNA in Infected Blood and Individual Mosquitoes. **Experimental Parasitology**, v. 73: 311-316, 1991.

SCHWARTZ, A.; KOELLA, J.C. Melanization of *Plasmodium falciparum* and C-25 Sephadex Beads by Field Caught *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) From Southern Tanzania. **Journal Of Medical Entomology**, v. 39: 84-88, 2002.

SECUNDINO, N. F. C.; EGER-MANGRICH, I.; BRAGA, E. M.; SANTORO, M. M.; PIMENTA, P. F. P. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic matrix: formation,

structure and chemical composition. **Journal of Medical Entomology**, v. 42: 928-38, 2005.

SEVERO, M. S.; LEVASHINA, E. A. Mosquito defenses against *Plasmodium* parasites. **Current Opinion in Insect**, v. 3:30-36, 2014.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 2: 19-25, 2001.

SILVA, C. C. A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biociências e Desenvolvimento**, v. 24: 68-72, 2002.

SILVERMAN, N.; ZHOU, R.; ERLICH, R. L.; HUNTER, M. BERNSTEIN, E.; SCHNEIDER, D.; MANIATIS, T. Immune activation of NF-kappaB and JNK requires *Drosophila* TAK1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278: 48928-48934, 2003.

SINKA, M. E.; BANGS, M. J.; MANGUIN, S.; RUBIO-PALIS, Y.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; COETZEE, M.; MBOGO, C. M.; HEMINGWAY, J.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; GETHING, P. W.; KABARIA, C. W.; BURKOT, T. R.; HARBACH, R. E.; HAY, S. I. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites and Vectors**, v. 5: 69-75, 2012.

SIVEP-MALÁRIA- **Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica da Malária**, 2016.

SMAGGHE, G.; AUDA, M.; LAECKE, K. V.; DEGHEELE, D. Significance of penetration and metabolism on topical toxicity of diflubenzuron in *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera exigua*. **Entomologia Experimentalis Applicata**, v. 82: 255-260, 1997.

SMITH, R. C.; JOEL VEGA-RODRÍGUEZ, MARCELO JACOBS-LORENA. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109: 644-661, 2014.

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

SU, X.; HAYTON, K.; WELLEMS, T. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. **Nature Reviews Genetics**, v. 8: 497-506, 2007.

SUWANCHAICHINDA, C.; PASKEWITZ, S.M. Effects of Larval Nutrition, Adult Body Size, and Adult Temperature on the Ability of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) To Melanize Beads. **Journal Of Medical Entomology**, v. 35, 157-161, 1998.

TADA, M. S.; FERREIRA, R. G. M. ; KATSURAGAWA, T. H.; DALLA, M. R. C.; COSTA, J. D. N.; ALBRECHT, L.; WUNDERLICH, G.; PEREIRA-DASILVA, L. H. Asymptomatic infection with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Brazilian Amazon Basin: to treat or not to treat? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 621-629, 2012.

TADEI, W.P.; THATCHER, BD.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES, I.B.; RA-FAEL, M.S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59: 325-335, 1998.

TAYLOR, L. H. Infection rates in, and the number of *Plasmodium falciparum* genotypes carried by *Anopheles* mosquitoes in Tanzania. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93: 659-662, 1999.

TELANG, A.; LI, Y.; NORIEGA, F. G.; BROWN, M. R. Effects of larval nutrition on the endocrinology of mosquito egg development. **The Journal of experimental biology**, v. 209: 645-255, 2006.

TELLERIA, E. L.; SANT'ANNA, M. R. V.; ORTIGÃO-FARIAS, J. R.; PITALUGA, A. N.; DILLON, V. M.; BATES, P. A.; TRAUB-CSEKO, Y. M.; DILLON, R. J. Caspar-like Gene Depletion Reduces *Leishmania* Infection in

Sand Fly Host *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 6: 12985-12993, 2012.

THEOPOLD, U.; LI, D.; FABBRI, M.; SCHERFER, C.; SCHMIDT, O. The coagulation of insect hemolymph. **Cell and Molecular Life Sciences**, v. 59: 363-372, 2002.

VIJAY, S.; RAWAT, M.; ADAK, T.; DIXIT, R.; NANDA, N. Parasite Killing in Malaria Non-Vector Mosquito *Anopheles culicifacies* Species B: Implication of Nitric Oxide Synthase Upregulation. **Plos one**, v. 6: 5-10, 2011.

VLASHOU, D.; SCHLEGELMILCH, T.; CHRISTOPHIDES, G. K.; KAFATOS, F. C. Functional Genomic Analysis of Midgut Epithelial Responses in *Anopheles* during *Plasmodium* Invasion. **Current Biology**, v. 15: 1185-1195, 2005.

WANG, Y.; ZHANG, H.; LI, H.; MIAO, X. Second-Generation Sequencing Supply an Effective Way to Screen RNAi Targets in Large Scale for Potential Application in Pest Insect Control. **PLoS ONE**, v. 6: 18620-18644, 2011.

WHITE, N. J. *Plasmodium Knowlesi*: The fifth human malaria parasite. **Clinical Infect Diseases**, v. 46: 168-172, 2008.

WHITTEN, M. M. A.; SHIAO, S. H.; LEVASHINA, A. Mosquito midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. **Parasite Immunology**, v. 28: 121-130, 2006.

WHO - World Health Organization. 2013. **World Malaria Report 2013**.
Disponível em:
http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr2013_no_profiles.pdf?ua=1

WHO. World health organization. **World Malaria risk areas**, 2014.

WHYARD, ST.; SINGH, A. D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39: 824-832, 2009.

YU, N.; CHRISTIAENS, O.; LIU, J.; NIU, J.; CAPPELLE, K.; CACCIA, S.; HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. **Insect Science**, v. 20: 4-14, 2013.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; ZHU, K.Y. Chitosan/doublestranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). **Insect Molecular Biology**, v. 19, 683-693, 2010.

ZIAUDDIN, J. & SCHNEIDER, D. S. Where Does Innate Immunity Stop and Adaptive Immunity Begin? **Cell Host & Microbe**, v. 12: 10-18, 2012.

ZOTTI, M. J. & SMAGGHE, G. RNAi Technology for Insect Management and Protection of Beneficial Insects from Diseases: Lessons, Challenges and Risk Assessments, **Neotropical Entomol**, v. 44: 197-213, 2015.