

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA CAPACIDADE DE INFECÇÃO DE *Anopheles aquasalis*
COM *Plasmodium gallinaceum* COMO UM POSSÍVEL MODELO
EXPERIMENTAL EM MALÁRIA**

ORIENTADO: **Bruno Coelho Rocha**

ORIENTADOR: **Dr. Luciano Andrade Moreira**

CO-ORIENTADOR: **Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes**

BELO HORIZONTE
Janeiro – 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Bruno Coelho Rocha

ESTUDO DA CAPACIDADE DE INFECÇÃO DE *Anopheles aquasalis* COM
Plasmodium gallinaceum COMO UM POSSÍVEL MODELO EXPERIMENTAL EM
MALÁRIA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética na área de concentração Genética Molecular, de Microorganismos e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Luciano Andrade Moreira

Co-orientador: Dr. Álvaro Cantini Nunes

Belo Horizonte

Janeiro de 2010

Rocha, Bruno Coelho.

Estudo da capacidade de infecção de *Anopheles aquasalis* com *Plasmodium gallinaceum* como um possível modelo experimental em malária. [manuscrito] / Bruno Coelho Rocha. – 2010.

95 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Luciano Andrade Moreira. Co-orientador: Álvaro Cantini Nunes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Anofeles – Teses. 2. Plasmodium – Teses. 3. Malária – Teses. 4. Genética – Teses. I. Moreira, Luciano Andrade. II. Nunes, Álvaro Cantini. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616.936



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

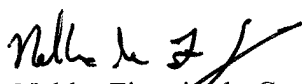


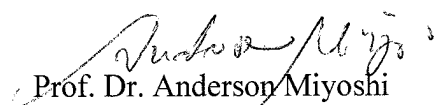
"Estudo da capacidade de infecção de Anopheles aquasalis com Plasmodium gallinaceum como possível modelo experimental em malária"

Bruno Coelho Rocha

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes - Co - Orientador
UFMG


Prof. Dr. Nelder Figueiredo Gontijo -
Parasito/UFMG


Prof. Dr. Anderson Miyoshi
UFMG

Belo Horizonte, 29 de janeiro de 2010.

“O combustível que impulsiona a ciência é a ignorância. A ciência é como uma fornalha faminta que deve ser alimentada de lenha retirada da floresta de ignorância que a cerca. No processo, a clareira que chamamos de conhecimento se expande, mas quanto mais se expande, maior é o perímetro e mais ignorância aparece.”

Matt Ridley

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelos recursos financeiros que viabilizaram o desenvolvimento deste Projeto.

À Pós-graduação da Genética pela possibilidade de realizar o curso de pós-graduação.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou por permitir a viabilização do trabalho na instituição.

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde PDTIS-FIOCRUZ pela utilização de suas instalações.

À equipe da biblioteca do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo suporte para o acesso a diversos artigos científicos.

Ao meu orientador, Dr. Luciano Andrade Moreira, pelo exemplo como pessoa e pesquisador, pelas sugestões e incentivo em todas as etapas do trabalho e por acreditar no meu potencial.

Ao Dr. Álvaro Cantini, meu co-orientador, pela disponibilidade em ajudar quando necessário.

À Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, pelas discussões e auxílio no desenvolvimento de alguns experimentos.

À Dra. Luzia Helena Carvalho pela coordenação do laboratório e do insetário, na ausência do Dr. Luciano, pelo constante apoio e pelo exemplo como pesquisadora.

À todos os amigos do LAMAL por criarem o ambiente de confiança e companheirismo gerando um ambiente agradável para a realização dos trabalhos.

Aos técnicos do insetário, Walison e Fernanda Rezende, pelo trabalho na manutenção das colônias de mosquitos e auxílio nos experimentos de infecção.

À Dra. Fernanda Barbosa Nogueira pelo suporte técnico nos experimentos do PCR em tempo real.

Ao Geraldo pela ajuda técnica e pelas conversas e apostas sobre futebol.

Aos meus amigos pela amizade e incentivo.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e pelo exemplo como pessoa.

A minha família pela confiança depositada em mim.

A Carol pelo exemplo de organização, pelo incentivo constante, amor, carinho, amizade, alegria e pela companhia nos sábados, domingos e feriados no laboratório.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 SITUAÇÃO ATUAL DA MALÁRIA.....	15
1.2 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO	16
1.2.1 <i>Ciclo biológico no hospedeiro vertebrado.....</i>	<i>16</i>
1.2.2 <i>Ciclo biológico no hospedeiro invertebrado.....</i>	<i>18</i>
1.3 ESPÉCIES VETORAS	20
1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE MALÁRIA.....	22
1.5 INTERAÇÃO PARASITO VETOR.....	24
1.5.1 <i>Fatores químicos.....</i>	<i>25</i>
1.5.2 <i>Fatores físicos</i>	<i>25</i>
1.5.3 <i>Fatores genéticos da refratariedade.....</i>	<i>26</i>
1.6 SISTEMA IMUNE DOS MOSQUITOS	27
1.6.1 <i>Reconhecimento de patógenos.....</i>	<i>27</i>
1.6.2 <i>Modulação e amplificação dos sinais</i>	<i>29</i>
1.6.3 <i>Vias de transdução de sinais.....</i>	<i>29</i>
1.6.4 <i>Respostas efectoras.....</i>	<i>30</i>
1.6.5 <i>Resposta celular.....</i>	<i>31</i>
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. METODOLOGIA.....	35
4.1 COLÔNIAS DE <i>A. AQUASALIS</i> E <i>A. FLUVIATILIS</i>	35
4.2 MANUTENÇÃO DO <i>PLASMODIUM GALLINACEUM</i>	35

4.3	INFECÇÃO DOS MOSQUITOS COM <i>P. GALLINACEUM</i>	36
4.4	CULTIVO DE OOCINETOS DE <i>P. GALLINACEUM</i>	37
4.5	INJEÇÃO DOS OOCINETOS NOS MOSQUITOS.....	38
4.6	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DOS MOSQUITOS.....	40
4.7	DOSAGEM DO RNA.....	40
4.8	SÍNTESE DO CDNA.....	41
4.9	AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR.....	41
4.10	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TEP1 EM <i>A. AQUASALIS</i>	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	INFECÇÃO DOS MOSQUITOS COM <i>P. GALLINACEUM</i>	46
5.2	DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR RT-PCR.....	51
5.3	INFECÇÃO ATRAVÉS DA INJEÇÃO DOS OOCINETOS NOS MOSQUITOS.....	53
5.4	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE TEP1.....	56
6.	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
	ANEXOS.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de risco da malária por município de infecção na Amazônia Legal.....	16
Figura 2: Ciclo assexual do <i>Plasmodium</i> no seu hospedeiro vertebrado.....	17
Figura 3: Ciclo sexual do <i>Plasmodium</i> no seu hospedeiro invertebrado.....	20
Figura 4: Oocinetos de <i>P. gallinaceum</i>	48
Figura 5: Gradiente de temperatura de anelamento do iniciador Pg93.	51
Figura 6: Expressão de RNA mensageiro de genes do mosquito e do parasito após a infecção com <i>P. gallinaceum</i>	53
Figura 7: Positividade de aves após infecção com cultura de oocinetos.	55
Figura 8: Análise da expressão de RNA mensageiro do gene TEP1 após infecção com <i>P. gallinaceum</i>	57
Figura 9: Expressão de TEP1 em <i>A. aquasalis</i> infectados com <i>P. gallinaceum</i> e em <i>A. aquasalis</i> não infectados.....	60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR e de PCR em tempo real.....42
- Tabela 2:** Infecção de *Aedes fluviatilis* e *Anopheles aquasalis* com *Plasmodium gallinaceum*.47
- Tabela 3:** Acompanhamento da parasitemia das aves que foram picadas por fêmeas de *A. aquasalis* e *A. fluviatilis* injetadas com *P. gallinaceum*. 55
- Tabela 4:** Eficiência dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real. ..58
- Tabela 5:** Quantificação relativa da expressão de TEP1 em mosquitos *A. aquasalis* infectados e não-infectados através de PCR em tempo real.59

LISTA DE ABREVIATURAS

- APL1C – *Anopheles Plasmodium responsive Leucine-rich repeat protein 1*
- cDNA – DNA complementar
- C_T – *Threshold cycle*
- CTL - *C-Type Lectins*
- CTLMA2 - *c-type lectin mannose-binding*
- CSP – Proteína circunsporozoíta
- DAPI – 4'6'-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato
- DEPC – Dietilpirocarbonato
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- DTT – Ditioneitol
- GNBP – *Gram-negative binding protein*
- IPA – Índice Parasitário Anual
- Imd – *Immune deficiency*
- JAK/STAT – *Janus Kinase Signal Transducer and Activators of Transcription*
- LRR - *Leucine-Rich Repeat*
- LRIM1 – *Leucine rich immune protein 1*
- MP – Matriz Peritrófica
- NOS – Óxido Nítrico Sintetase
- PABA - Ácido para-aminobenzóico
- PAMPs - Padrões moleculares associados à patógenos
- Pb – Pares de base
- PBS – Tampão Fosfato Salina
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- Pg93 – Proteína *Plasmodium gallinaceum* 93
- PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões
- RNA – Ácido Ribonucléico
- RNAi – RNA de interferência
- RNA_m – Ácido Ribonucléico mensageiro
- RP49 – Proteína Ribossomal rp49 de mosquitos
- RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase conjugada com a transcriptase reversa
- Serpinas - *Serino protease inhibitors*

TEP - *Thioester-containing proteins*

T_m – Temperatura de anelamento

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo

QTLs – *Quantitative Trait Locus*

RESUMO

A malária é uma doença que ainda causa milhares de mortes em várias regiões do planeta. Uma das estratégias de controle é o combate ao vetor do parasito, o mosquito do gênero *Anopheles*. Vários modelos experimentais são utilizados em estudos envolvendo a interação parasito-vetor devido à capacidade dos parasitos de infectarem diferentes hospedeiros vertebrados. Entretanto, ainda não existe um modelo experimental que permita o desenvolvimento completo do *Plasmodium* em anofelinos brasileiros. O *Plasmodium gallinaceum* é um parasito capaz de se desenvolver em diversas espécies de mosquitos de até seis gêneros diferentes. Além disso, esse modelo de malária aviária oferece algumas vantagens como o baixo custo, a facilidade de manutenção das aves e a reprodutibilidade deste sistema. Vários fatores estão associados à capacidade do parasito de se desenvolver no mosquito, como as barreiras físicas, químicas e os fatores genéticos, dentre eles os genes envolvidos com a resposta imune do mosquito. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi investigar a competência vetorial de *Anopheles aquasalis* em resposta à infecção com *P. gallinaceum*, para utilizá-lo como um possível modelo experimental. Não foi possível observar a presença de oocistos de *P. gallinaceum* em *A. aquasalis* uma semana após a infecção. Porém a presença de oocinetos foi visualizada 24 horas após a alimentação infectante. Na tentativa de excluir fatores relacionados ao intestino, injetou-se oocinetos produzidos por cultivo diretamente na hemolinfa dos mosquitos. Não foram observados oocistos em nenhum tecido dos mosquitos injetados e os *A. aquasalis* não conseguiram infectar aves sadias enquanto os *A. fluviatilis* (controle positivo) obtiveram sucesso na infecção de novas aves. Por último foi avaliada a expressão do gene TEP1 nos anofelinos. Através do PCR em tempo real foi observado que TEP1 é 3,4x mais expresso em mosquitos infectados em relação aos não infectados, sugerindo que a expressão de TEP1 esteja envolvida na resposta imune do *A. aquasalis* ao *P. gallinaceum* sendo um possível gene candidato à refratariedade observada nesse mosquito. O presente trabalho forneceu dados iniciais para o desenvolvimento de um modelo experimental em anofelinos brasileiros.

ABSTRACT

Malaria is one of the major public health problems in the world. Different antimalarial strategies have been developed including the mosquito control. Several experimental models are used in studies involving parasite-vector interaction due to the ability of parasites infecting different vertebrate hosts. However in Brazil, still lacks an experimental model that allows the complete development of *Plasmodium* in Brazilian Anophelines. *Plasmodium gallinaceum* is a parasite that can develop in several species of mosquitoes. Moreover, this avian malaria has some advantages such as low cost, easy of maintenance of the birds and the reproducibility of this system. Several factors are associated with the vectorial capacity of the parasite, as the physical, chemical and genetic factors, including the immunity genes of the mosquito. Thus, the aim of this project was to investigate the vector competence of *Anopheles aquasalis* in response to infection with *P. gallinaceum*. No *P. gallinaceum* oocysts were observed in *A. aquasalis* midgut one week after infection, although it was possible to visualize the presence of ookinetes 24h after the infective blood meal. In an attempt to exclude factors related to the midgut, ookinetes from culture were injected into the mosquito's hemolymph. No oocysts were observed in any mosquito tissue and *A. aquasalis* failed to infect naïve chicks while *A. fluviatilis* (positive control species) promoted successful infections. Finally it was evaluated the *Anopheles* TEP1 gene expression. It was observed through real-time PCR that TEP1 is 3.4x more expressed in infected mosquitoes compared to those not infected, but this difference was not significant. These results suggest that the expression of TEP1 is involved in the immune response of *A. aquasalis* and it is a possible candidate gene for refractoriness observed in this mosquito. The present study provided initial data for the development of an experimental model in Brazilian anophelines.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Situação atual da Malária

A Malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* em diferentes hospedeiros vertebrados, sendo que somente quatro espécies são parasitos do homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* (Garnham, 1966). Porém, recentemente, *Plasmodium knowlesi* também foi encontrado em humanos no sudeste asiático (Cox-Singhi e Singh, 2008; Jongwutiwes *et al.*, 2008; Van den Eede *et al.*, 2009).

Anualmente estima-se que ocorram de 300-500 milhões de casos globalmente, e um milhão de mortes, principalmente entre crianças com menos de cinco anos de idade na África Sub-Sahariana. Além disso, aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco (Greenwood *et al.*, 2008; WHO, 2008).

No Brasil, cerca de 500 mil casos são relatados por ano sendo que 99% destes se concentram na região da Amazônia legal (**Figura 1**). A alta transmissão de malária nessa região está associada, além das condições sócio-econômicas e ambientais, com a ocupação intensa e desordenada dos espaços peri-urbanos, ao desmatamento para extração de madeira, criação de gado, agricultura e assentamentos não-oficiais (Marques *et al.*, 1986; SVS, 2007; SVS, 2008). Outro fator colaborador se deve ao aumento na construção de tanques artificiais para a piscicultura, o que promove a disseminação dos criadouros do mosquito vetor (SVS, 2007).

O controle da doença, a cada ano, vem se tornando mais difícil devido ao aumento da resistência dos parasitos às drogas antimaláricas disponíveis, da resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas, além da ausência de uma vacina eficaz (Hartl, 2004; Winstanley *et al.*, 2004). Desse modo, tornam-se necessários mais estudos que ampliem o conhecimento sobre a doença e a interação parasito-vetor para que novas alternativas visando o controle sejam desenvolvidas.

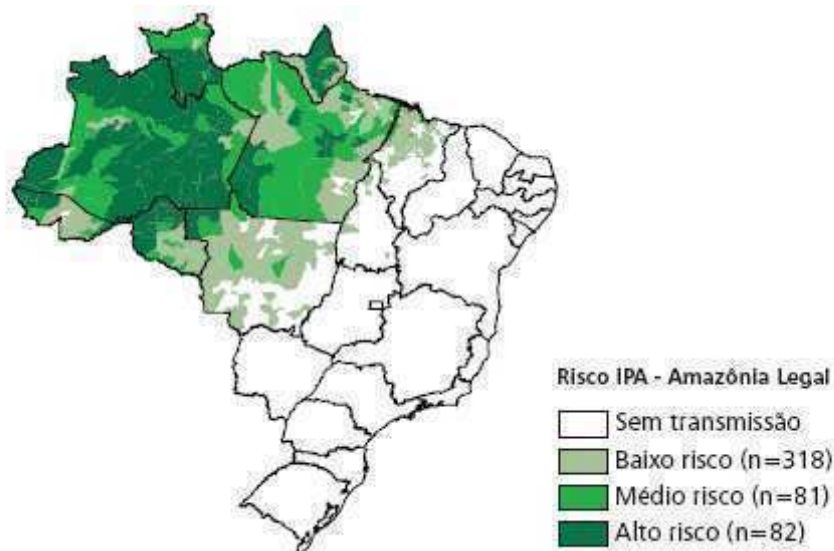


Figura 1: Mapa de risco da malária por município de infecção na Amazônia Legal. Área de transmissão brasileira, em 2007, segundo Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS, 2008). Municípios classificados segundo o IPA (Índice parasitário anual): baixo risco ($IPA < 10$), médio risco ($10 > IPA < 50$) e alto risco ($IPA > 50$).

1.2 Ciclo biológico do parasito

Os parasitos possuem um ciclo heteroxênico necessitando obrigatoriamente, de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. A fase assexuada ocorre nos hospedeiros vertebrados enquanto a reprodução sexuada ocorre nos hospedeiros invertebrados. Ao longo do desenvolvimento do parasito são encontradas uma multiplicidade de formas altamente especializadas e morfológicamente distintas, que se alternam entre formas invasoras e replicativas (Hall *et al.*, 2005).

1.2.1 Ciclo biológico no hospedeiro vertebrado

Durante o repasto sangüíneo no hospedeiro vertebrado, o mosquito infectado deposita esporozoítos na derme e estas formas infectantes do parasito podem migrar para a corrente sangüínea ou vasos linfáticos. Ao invadir os vasos sanguíneos, os esporozoítos chegam ao fígado, onde infectam os hepatócitos e dão origem aos esquizontes. Estes, quando maduros, se

diferenciam em milhares de merozoítos, as formas invasivas que parasitam as hemácias circulantes (Garnham, 1966). Sturm *et al.* (2006) mostraram que os merozoítos são encontrados em vesículas denominadas merossomos os quais são capazes de transportar centenas de merozoítos para a corrente sanguínea. Estas vesículas seriam como um mecanismo de defesa para evitar a fagocitose de merozoítos logo que deixassem o fígado, aumentando assim as chances de invasão de eritrócitos e de sobrevivência dos parasitos além de protegê-los contra as células de Kupfer do fígado (**Figura 2**).

Ao invadir as hemácias, os merozoítos se multiplicam até romperem as células podendo invadir novas hemácias dando início ao ciclo eritrocítico do parasito. Porém, alguns merozoítos passam por um desenvolvimento diferencial se transformando nas formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos, que serão transferidos durante o repasto sanguíneo para as fêmeas dos mosquitos, iniciando então o ciclo sexual dos plasmódios (**Figura 2**).

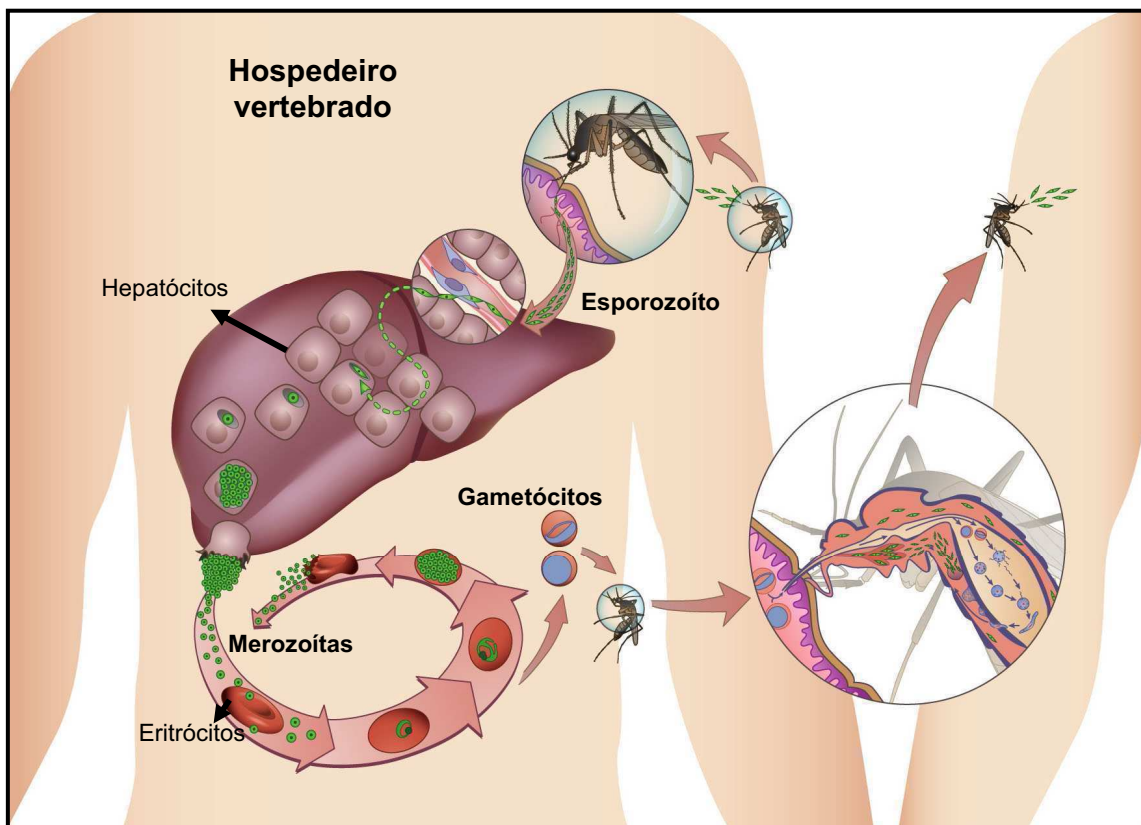


Figura 2: Ciclo assexual do *Plasmodium* no seu hospedeiro vertebrado. Adaptado de www.imm.ul.pt

1.2.2 Ciclo biológico no hospedeiro invertebrado

No seu ciclo sexual, o parasito também apresenta diferentes formas especializadas e morfológicamente distintas que permitem uma transmissão eficiente para o hospedeiro vertebrado.

O ciclo do parasito se inicia com a ingestão de sangue infectado pelo vetor. A mudança drástica de ambientes entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado provoca a diferenciação, no lúmen do intestino médio dos mosquitos, dos gametócitos em gametas machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos). A transformação dos gametócitos ocorre *in vivo* devido a uma queda de temperatura de no mínimo 5°C e a presença de uma molécula derivada do hospedeiro invertebrado, o ácido xanturênico, um subproduto do metabolismo do triptofano (Billker *et al.*, 1998; Sinden, 1999). Na primeira hora após a alimentação, os microgametócitos formados passam por rápidos e consecutivos ciclos de divisões nucleares acompanhados por extremas mudanças morfológicas e dão origem a oito microgametas móveis em um evento denominado de exflagelação. Nos próximos trinta minutos ocorre a fecundação e a formação do zigoto diplóide (**Figura 3**).

Durante as próximas horas, o zigoto, uma célula de morfologia esférica, irá se transformar em um oocineto, uma célula alongada, com diferenciação antero-posterior e móvel. Esta forma possui organelas presentes no complexo apical chamadas de micronemas que contém proteínas envolvidas no reconhecimento da célula hospedeira, adesão e motilidade (Dubremetz *et al.*, 1998). Os oocinetos completam sua maturação ainda inseridos no bolo alimentar no intestino do hospedeiro invertebrado entre 18 a 24 horas após a alimentação. Durante a maturação do oocineto, dentro do núcleo, ocorre a meiose gerando ao oocineto um conteúdo genético correspondente a quatro vezes o genoma haplóide. (Sinden, 1999).

Após a sua maturação, os oocinetos estão aptos a iniciar o processo de invasão. A primeira barreira que o oocineto enfrenta em sua migração para a saída do intestino médio do mosquito é a matriz peritrófica (MP), uma estrutura acelular que recobre o intestino médio abdominal e é constituída por proteínas, proteoglicanos e quitina (Lehane, 1997). Uma vez que os oocinetos conseguem

atravessar essa barreira eles entram em contato com as microvilosidades das células epiteliais para iniciar o processo de invasão do epitélio intestinal.

Muito pouco se conhece sobre os detalhes do processo de invasão e alguns modelos já foram propostos na tentativa de entender esse evento. O modelo descrito por Shahabuddin e Pimenta (1998), sugere que oocinetos de *Plasmodium gallinaceum* invadem um tipo celular específico no intestino de *Aedes aegypti*. Uma outra hipótese, chamada de teoria da bomba relógio, propõe que a invasão dos oocinetos de *Plasmodium berghei* ocorre, obrigatoriamente, nos pontos onde as membranas celulares apicais de células adjacentes se encontram. Em seguida, essas células invadidas entram em processo de apoptose levando a perda das microvilosidades e a fragmentação do DNA genômico (Han *et al.*, 2000). Esse modelo também foi observado em oocinetos de *P. falciparum* atravessando o epitélio de *Anopheles stephensi* (Baton e Ranford-cartwright, 2004) e com *P. gallinaceum* invadindo *Aedes aegypti* (Gupta *et al.*, 2005). O processo de reparo do epitélio intestinal, após a invasão do parasito, ocorre através de um mecanismo que envolve o acúmulo de actina no lado basal da célula e em seguida nas partes laterais formando um cone de actina. Ao mesmo tempo, o conteúdo celular é expelido no lúmen intestinal e as células vizinhas começam a se interagir mantendo a integridade do epitélio preservada (Gupta *et al.*, 2005).

Após a invasão, o oocineto sai das células epiteliais e entra em contato com a lâmina basal. Esse contato induz a transformação do oocineto em oocisto, uma forma séssil. Em cada oocisto, são ativadas as maquinarias de replicação do DNA e de síntese de proteínas para a amplificação assexuada do número de parasitos gerando a produção de milhares de esporozoítos. Como consequência desse evento, a cápsula do oocisto se torna mais fina e fragmentada, possibilitando o aparecimento de perfurações, por onde os esporozoítos escapam (Meis *et al.*, 1992).

Esses esporozoítos caem na hemolinfa e cerca de 10% a 20% conseguem invadir as glândulas salivares atravessando o epitélio e se alojando no lúmen destas juntamente com a saliva (Rosenberg e Rungsiwongse, 1991). No próximo repasto sangüíneo, o mosquito é capaz de inocular as formas infectantes, e, conseqüentemente, iniciar o ciclo assexuado no hospedeiro vertebrado (**Figura 3**).

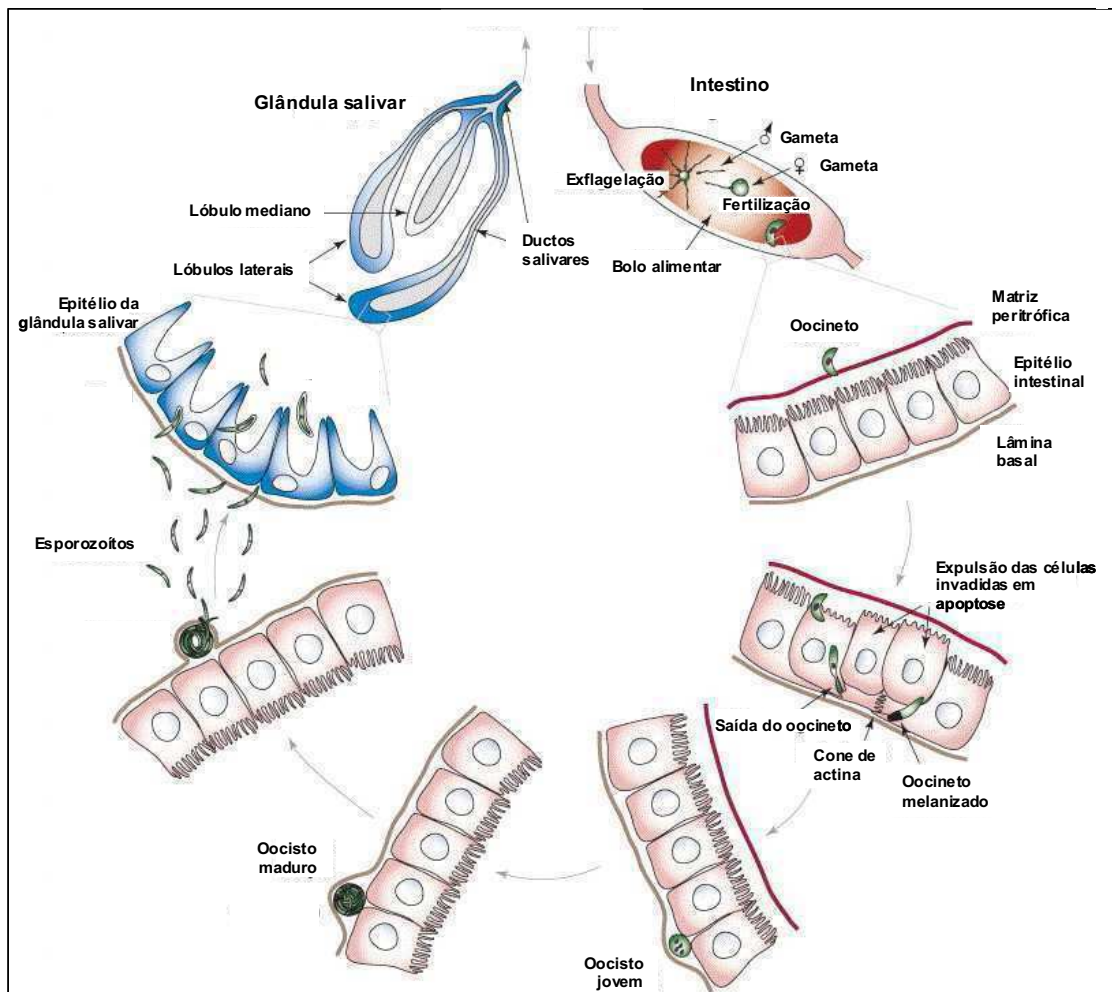


Figura 3: Ciclo sexual do *Plasmodium* no seu hospedeiro invertebrado. Adaptado de Vlachou *et al.*, 2006.

1.3 Espécies vetoras

Os mosquitos transmissores da malária humana são insetos do gênero *Anopheles*. Esses mosquitos pertencem à família Culicidae que compreende três subfamílias: Toxorhynchitinae, Culicinae e Anophelinae. As espécies de importância médica estão presentes nas subfamílias Culicinae e Anophelinae, enquanto a Toxorhynchitinae apresenta cerca de 70 espécies e são mosquitos grandes que não se alimentam de sangue. A subfamília Anophelinae se divide nos gêneros *Anopheles*, *Chagasia* e *Bironella* (Gwadz e Collins, 1996). O gênero *Anopheles* compreende seis subgêneros, sendo que o subgênero *Cellia*

é composto pelos principais vetores de malária humana nos continentes africanos e asiáticos enquanto na América do Sul os principais vetores pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (Consoli e Oliveira, 1998; Deane, 1986).

Os anofelinos têm ampla distribuição no mundo. Na África, o mosquito *Anopheles gambiae* Giles, 1902 é o principal vetor da malária humana, atuando na transmissão do *P. falciparum* que causa a forma mais grave da doença. (Gwadz e Collins, 1996), sendo que na Ásia e no Oriente Médio o mosquito *Anopheles stephensi* Liston, 1901 é o vetor de maior importância.

Já nas Américas, os mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus* são considerados os mais importantes vetores do parasito da malária, sendo representados por *Anopheles darlingi* Root, 1926, por representantes do complexo *Albitarsis* (Motoki *et al.*, 2009), por *Anopheles aquasalis* Curry, 1932, dentre outros (Consoli e Oliveira, 1998; Tadei e Thatcher, 2000).

O *A. darlingi* é considerado o principal vetor da malária no Brasil apresentando comportamento altamente antropofílico (Deane, 1989; Tadei *et al.*, 1998). Está presente em grande parte do interior do país, além de amplamente distribuído na América do Sul (Zimmerman, 1992; Consoli e Oliveira, 1998).

O *A. aquasalis* é encontrado em locais onde existem águas salobras, assim, sua distribuição ocorre numa faixa litorânea longa desde São Paulo até a Costa Rica, no lado Atlântico, e desde este país até o Golfo de Guaiaquil, no Equador, na costa do pacífico (Consoli e Oliveira, 1998). Ocorre também em algumas ilhas do Caribe aonde casos de malária já foram associados à presença do *A. aquasalis* (Rawlins *et al.*, 2008). Além das ilhas do Caribe, outros países apresentam casos dessa espécie infectada com *Plasmodium* como no nordeste da Venezuela (Grillet, 2000), no Panamá (Loaiza *et al.*, 2008) e nas Guianas (Laubach *et al.*, 2001).

No Brasil o *A. aquasalis* é considerado vetor primário da malária nas zonas áridas do Nordeste, em Belém, Amapá e na Amazônia, além de ter sido várias vezes detectado com infecção natural nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo (Consoli e Oliveira, 1998), bem como foi considerado vetor de malária importada no estado do Espírito Santo (Meneguzzi *et al.*, 2009). Ao contrário do *A. darlingi*, cuja colonização em laboratório ainda não foi possível,

os procedimentos de manutenção da colônia para *A. aquasalis* já estão bem estabelecidos, possibilitando estudos com essa espécie (Silva *et al.*, 2006).

Outra espécie que também possui um importante papel na transmissão da malária é o *Anopheles albitarsis* Lynch- Arribáizaga, 1878. Na verdade, este mosquito faz parte de um complexo de várias espécies crípticas que não podem ser distinguidas morfológicamente na fase adulta. Fazem parte deste complexo: *Anopheles albitarsis*, *Anopheles oryzalimnetes*, *Anopheles marajoara*, *Anopheles deaneorum*, *Anopheles janconnae*, e *Anopheles albitarsis* F, sendo que algumas destas já foram encontradas infectadas com *P. falciparum* ou *P. vivax* (Li e Wilkerson, 2005; Lehr *et al.*, 2005; Motoki *et al.*, 2009; Zimmerman, 1992; Wilkerson *et al.*, 1995).

Vários outros anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus* são hoje considerados vetores secundários ou vetores potenciais que na ausência dos seus hospedeiros preferenciais ou nas épocas de elevada densidade, podem se alimentar no homem em maior frequência.

1.4 Modelos experimentais de malária

Alguns parasitos do gênero *Plasmodium* são capazes de infectar uma variedade de hospedeiros vertebrados, dentre eles, aves, primatas não humanos, roedores, répteis e humanos. Dessa maneira vários modelos experimentais foram criados para permitir estudos desses parasitos.

O modelo experimental dos roedores vem sendo utilizado há mais de 40 anos em diferentes áreas como na quimioterapia, imunologia, desenvolvimento de vacinas e em estudos da biologia do parasito, assim com na sua interação com os mosquitos (Cox, 1988). Os principais parasitos de roedores são *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelli*, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium vinckei*. Essas quatro espécies foram isoladas de ratos provenientes da África e foram adaptadas a se desenvolverem em roedores de laboratório (camundongos, ratos e hamsters). *P. berghei* e *P. yoelli* são os mais estudados e possuem diferentes linhagens. Os vetores mais utilizados nos modelos de roedores são o *Anopheles stephensi* e o *Anopheles gambiae*, principalmente

em estudos de interação parasito hospedeiro (Levashina *et al.*, 2001, Jaramillo-Gutierrez *et al.*, 2009).

Outro modelo utilizado é o de primatas não humanos, porém este modelo possui algumas limitações devido ao alto custo de manutenção dos animais em laboratório. Entretanto, quando disponível, tem a vantagem de causar a doença com as mesmas características que em humanos (Gwadz e Collins, 1996). As duas espécies mais utilizadas nesses modelos experimentais são *Plasmodium cynomolgi* e *Plasmodium knowlesi* sendo que a primeira consegue infectar um grande número de vetores entre eles *Anopheles dirus*, *Anopheles freeborni*, *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae*. Já o *P. knowlesi* consegue completar seu ciclo somente em *A. dirus*. Ele até consegue produzir oocistos e esporozoítos em *A. freeborni* e em *A. gambiae*, porém os esporozoítos não conseguem invadir as glândulas salivares desses mosquitos (Coatney *et al.*, 1971).

Um grande número de espécies de mosquito é capaz de transmitir a malária aviária quando infectado com *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium juxtannucleare* entre outras espécies de plasmódios aviários (Huff, 1965). O vetor natural do *P. gallinaceum* foi descrito por Niles *et al.*, (1965) como sendo o mosquito *Mansonia crassipes*. Em condições de laboratório, dois mosquitos têm sido empregados como os principais vetores de malária aviária. São eles o *Aedes aegypti* e o *Aedes fluviatilis* (Eyles, 1951; Táson de Camargo e Krettli, 1978). Além desses, alguns anofelinos já foram descritos como capazes de se infectar com *P. gallinaceum* como, por exemplo, *Anopheles quadrimaculatus* (Cantrell e Jordan 1949; Eyles, 1952), *A. freeborni* (Eyles, 1952), *A. stephensi* (Alavi *et al.*, 2003) e a linhagem G3 de *A. gambiae* (Alavi *et al.*, 2003; Vernick *et al.*, 1995). O modelo de malária aviária oferece algumas vantagens como o baixo custo, a facilidade de manutenção das aves e a reprodutibilidade deste sistema (Collins *et al.*, 1986).

1.5 Interação parasito vetor

O parasito apresenta durante seu ciclo no hospedeiro invertebrado duas formas invasivas, o oocineto e o esporozoíto, que são os responsáveis pelo sucesso da migração do *Plasmodium*, permitindo completar o ciclo no vetor. Porém, durante esse ciclo, ele sofre algumas perdas consideráveis devido a barreiras impostas pelo mosquito.

Após a alimentação com sangue infectado, os mosquitos podem ingerir mais de mil gametócitos sendo que somente cerca de 50 a 100 se transformam em oocinetos e, destes, poucos se diferenciam em oocistos. A partir daí os oocistos conseguem produzir milhares de esporozoítos, mas somente alguns vão conseguir invadir a glândula salivar e se tornarem aptos para infecção do hospedeiro vertebrado (Baton e Ranford-cartwright, 2005). Esses são os principais gargalos enfrentados pelo parasito nos tecidos dos mosquitos e vários estudos vêm sendo realizados a fim de elucidar os mecanismos que causam a resistência ou susceptibilidade do parasito ao vetor (Sinden e Billingsley, 2001).

Existem vários fatores que podem determinar a refratariedade e susceptibilidade de uma espécie de mosquito ao parasito. Além disso, esses fatores variam entre uma espécie de *Plasmodium* em diferentes espécies de mosquitos, assim como entre diferentes parasitos no mesmo vetor, o que demonstra que essa interação é espécie-específica (Sinden *et al.*, 2004).

Arai *et al.*, (2001) demonstraram que em uma linhagem mutante de *A. aegypti* que não produz o ácido xanturênico, o *P. gallinaceum* não consegue se desenvolver no intestino, uma vez que os microgametócitos não conseguem realizar o evento da exflagelação impedindo a formação dos zigotos.

O desenvolvimento do parasito também é afetado por diversos componentes presentes no sangue proveniente do hospedeiro vertebrado como o bicarbonato, ácido láctico, proteínas do sistema complemento, anticorpos contra o parasito, entre outros (Grotendorst *et al.*, 1986; Kaslow, 1993; Shahabuddin e Costero, 2001).

1.5.1 Fatores químicos

Assim que os mosquitos ingerem o sangue infectado ocorre a secreção de enzimas proteolíticas como as tripsinas, carboxipeptidases e as aminopeptidases no intestino dos insetos. Estas enzimas têm a capacidade de danificar os oocinetos recém formados (Gass e Yeates, 1979). Entretanto a tripsina também é essencial na ativação da pró-quitinase do parasito, uma enzima utilizada pelo *Plasmodium* para atravessar a matriz peritrófica (Shahabuddin *et al.*, 1993). Portanto, a cinética da síntese e secreção dessas enzimas digestivas afeta tanto os estágios imaturos de oocineto quanto os estágios maduros.

O papel dessas enzimas proteolíticas varia dependendo do modelo utilizado. Shahabuddin *et al.*, (1995) demonstraram que a inibição da atividade de tripsina em *A. aegypti* reduz a susceptibilidade ao *P. gallinaceum* enquanto Feldmann *et al.*, (1990) não encontraram diferença na atividade de tripsina entre linhagens susceptíveis e refratárias ao *P. falciparum* de *A. stephensi*. Porém estudando outra enzima proteolítica, a aminopeptidase, eles relataram um aumento da atividade enzimática dela nas linhagens refratárias.

1.5.2 Fatores físicos

A matriz peritrófica (MP), como já foi mencionado anteriormente, é uma estrutura semipermeável extracelular produzida pelo epitélio intestinal, algumas horas após a alimentação sanguínea do mosquito e é formada por quitina, proteínas e proteoglicanos, que protege o intestino médio (Lehane, 1997; Peters, 1992) contra a infecção no mosquito. Ela funciona como uma barreira física contra os oocinetos maduros que sobreviveram às ações das enzimas digestivas.

Porém os parasitos desenvolveram um mecanismo para escapar da MP. Eles utilizam a tripsina produzida pelo mosquito para ativação de pró-quitinases que vão hidrolisar as quitinas presentes na MP (Huber e Cabib, 1991; Vinetz *et al.*, 2000). Para atravessar a MP, a secreção de quitinases é essencial para a penetração desta barreira por *P. falciparum* e *P. gallinaceum*, mas parece ser

menos importante para *P. berghei* (Shahabuddin *et al.*, 1996; Sinden *et al.*, 2004). Além disso, Shahabuddin *et al.*, 1993 mostraram que a inibição das quitinases do *Plasmodium* impediu a formação de oocistos, sugerindo que a MP atua realmente como uma barreira física contra o parasito. Do mesmo modo o *knockout* do gene da quitinase de *P. falciparum* levou a uma redução no número de oocistos nos intestinos de *A. freeborni* (Tsai *et al.*, 2001).

Após atravessar a matriz peritrófica, o parasito se depara com a segunda barreira física, o epitélio intestinal. O *Plasmodium* entra em contato com as microvilosidades das células epiteliais e se adere a elas para iniciar o processo de invasão que já foi discutido anteriormente.

A próxima barreira enfrentada pelo parasito é o epitélio da glândula salivar. Esse processo de invasão é considerado ineficiente, pois dos milhares de esporozoítos liberados pelos oocistos, somente alguns conseguem invadir a glândula salivar. Rosenberg, (1985) demonstrou que esporozoítos de *P. knowlesi* conseguem invadir as glândulas salivares de *A. dirus* porém não invadem as de *A. freeborni*, conferindo um mecanismo de refratariedade para essa última espécie.

1.5.3 Fatores genéticos da refratariedade

Fatores genéticos presentes nos mosquitos também influenciam no controle dos níveis de transmissão do parasito. A identificação dessa base genética na refratariedade dos mosquitos ao *Plasmodium* vem sendo realizada há bastante tempo. Inicialmente, Collins *et al.*, (1986) descreveram a encapsulação dos oocinetos maduros através da melanização de uma linhagem de laboratório refratária de *A. gambiae* (L35). Vernick *et al.*, (1995) demonstraram um outro mecanismo genético para a eliminação do *P. gallinaceum*, a lise do oocineto dentro das células epiteliais do intestino.

Posteriormente estudos de mapeamento genético foram conduzidos para identificação de regiões do DNA dos mosquitos que estariam associadas com esses mecanismos de refratariedade (*Quantitative Trait Loci* - QTLs). Zheng *et al.*, (1997) e Zheng *et al.*, (2003) encontraram a presença de vários QTLs em linhagens de laboratório de *A. gambiae* (L35) relacionados a

encapsulação melanótica dos oocinetos. Blandin *et al.*, (2009) identificaram QTLs relacionados aos dois mecanismos genéticos propostos anteriormente.

Em mosquitos de campo, diferentes QTLs também foram descritos (Niaré *et al.*, 2002; Menge *et al.*, 2006; Riehle *et al.*, 2006). Entretanto, os QTLs não estavam relacionados à melanização uma vez que os *A. gambiae* de campo não apresentam esse fenótipo quando infectados com *P. falciparum*.

Acredita-se que existam alguns genes que são considerados como mais importantes na determinação genética da refratariedade, uma vez que diferentes QTLs de diversos estudos se sobrepõem na mesma região cromossômica (Zheng *et al.*, 2003). Entretanto a identificação de QTLs com localizações diferentes também sugere a atuação de outros genes no mecanismo de refratariedade (Menge *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2003).

Apesar dessas regiões cromossômicas associadas à refratariedade ao *Plasmodium* serem conhecidas, pouco se sabe a respeito das bases moleculares envolvidas nesse mecanismo de proteção dos mosquitos.

1.6 Sistema imune dos mosquitos

Vários genes presentes nos QTLs já identificados estão relacionados a genes do sistema imune de mosquitos (Blandin *et al.*, 2009; Riehle *et al.*, 2006). A obtenção da seqüência do genoma de *A. gambiae* (Holt *et al.*, 2002) e a utilização da metodologia de silenciamento de genes *in vivo* através do RNA de interferência (RNAi), possibilitaram vários estudos sobre a interação parasito e vetor ao nível molecular (Yassine e Osta, 2009).

1.6.1 Reconhecimento de patógenos

O sistema imune dos mosquitos possui importante relação com a competência vetorial dos mesmos. O início da resposta imune do mosquito ocorre quando moléculas solúveis ou presentes na superfície das células dos mosquitos, através de seus receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), reconhecem e se ligam a padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) comuns entre os microorganismos.

Diversas famílias desses receptores de reconhecimento de padrões já foram estudadas como as CTL (*C-Type Lectins*), TEP (*Thioester-containing proteins*), GGBP (*Gram-negative binding protein*) e LRR (*Leucine-Rich Repeat*) (Christophides *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2006). Esses PRRs têm a função de opsonizar facilitando a fagocitose dos microorganismos, ativar vias sinalizadoras que levam a respostas efetoras contra os patógenos e inicializar cascatas como a da melanização (Christophides *et al.*, 2002).

A família TEP apresenta similaridade de seqüência com fatores do complemento de vertebrados e com a família das $\alpha 2$ macroglobulinas. Dentro dessa família, TEP1 é a que vem sendo mais estudada. É uma glicoproteína que apresenta uma grande similaridade estrutural com a proteína C3 do sistema de complemento dos vertebrados (Baxter *et al.*, 2007). É secretada na hemolinfa aonde será clivada por proteases que até o momento ainda não foram identificadas. Após sua maturação, a porção carboxi-terminal de TEP1 se liga covalentemente à superfície de bactérias *Gram-negativas* e *Gram-positivas*, através de seu motivo tioéster, promovendo a fagocitose dos mesmos (Blandin *et al.*, 2008; Levashina *et al.*, 2001).

Foi demonstrado que TEP1 também atua contra oocinetos de *P. berghei* no lado basal do epitélio intestinal. O silenciamento de TEP1 de linhagens susceptíveis e refratárias de *A. gambiae* aumentou consideravelmente o número de oocistos viáveis de *P. berghei* (Blandin *et al.*, 2004) e de *P. falciparum*, demonstrando a sua participação no controle da infecção, porém não foi possível determinar a ligação de TEP1 nos oocinetos de *P. falciparum* (Dong *et al.*, 2006).

Outros dois genes da família LRR, o APL1C (*Anopheles Plasmodium responsive Leucine-rich repeat protein 1*) e o LRIM1 (*Leucine-rich immune protein 1*), tiveram o mesmo fenótipo apresentado por TEP1 nas linhagens de *A. gambiae* susceptíveis e refratárias quando foram silenciados (Blandin *et al.*, 2004; Riehle *et al.*, 2006; Riehle *et al.*, 2008). Povelones *et al.*, (2009) observaram que LRIM1 e APL1C circulantes na hemolinfa do mosquito formam um complexo de alto peso molecular e este complexo interage com TEP1. O silenciamento de LRIM1 ou APL1C leva a deposição de TEP1 nos tecidos dos mosquitos ao invés da superfície dos oocinetos, sugerindo que essas duas

proteínas atuam controlando a especificidade de ligação de TEP1 (Fraiture *et al.*, 2009).

Também foi demonstrado que LRIM1 e APL1C de *Anopheles quadriannulatus* promovem a melanização e lise de oocinetos dos parasitos, contribuindo para o fenótipo refratário dessa espécie que não é considerada um vetor. Quando esses genes foram silenciados nessa espécie, o mosquito se tornou susceptível ao *P. berghei* (Habtewold *et al.*, 2008).

Entretanto, os silenciamentos de outras PRRs tiveram o efeito oposto desse complexo. O *knockdown* de CTL4 e CTLMA2 resultou em um aumento de parasitos melanizados e uma redução do número de oocistos viáveis no intestino dos mosquitos, sugerindo que o produto desses genes atua protegendo o parasito contra o sistema imune do mosquito (Osta *et al.*, 2004).

1.6.2 Modulação e amplificação dos sinais

Em insetos, após o reconhecimento dos patógenos pelos PRRs ocorre a estimulação de uma cascata de serino-proteases que vai amplificar o sinal levando a ativação de uma resposta efetora. Membros dessa família possuem o domínio N-terminal CLIP. Ensaios de RNAi permitiram classificar estes membros em três grupos: CLIPs envolvidos na melanização de oocinetos de *P. berghei*; na lise do oocineto; e em defesa contra bactérias (Volz *et al.*, 2005; Waterhouse *et al.*, 2007).

A amplificação do sinal pelas serino-proteases é estreitamente regulada por Serpinas (*Serino protease inhibitors*). O silenciamento das mesmas está relacionado principalmente ao mecanismo de melanização, embora esteja claro que em alguns casos possuem importância também para a lise do parasito (Abraham *et al.*, 2005; Michel *et al.*, 2005)

1.6.3 Vias de transdução de sinais

As vias de transdução de sinais comunicam o reconhecimento dos patógenos e a amplificação desses sinais com a ativação transcricional. Em insetos, respostas contra microorganismos ocorrem principalmente por duas

vias, Toll e Imd, que controlam a regulação da maioria dos genes do sistema imune e se mostram bem conservadas em mosquitos. Os fatores de transcrição Rel1 e Rel2 dessas vias atuam no combate ao parasito (Yassine e Osta, 2009).

Evidências do papel de Rel2 no controle do parasito vieram através de dois experimentos. O silenciamento de Rel2 aumentou o número de oocistos de *P. berghei* (Meister *et al.*, 2005), enquanto a deleção de Caspar, um inibidor da via Rel2, reduziu o número de oocistos de *P. berghei* e de *P. falciparum* (Garver *et al.*, 2009). Rel1 também participa desse controle como foi demonstrado quando o silenciamento de Cactus, um inibidor da via Rel1, impediu completamente o desenvolvimento de *P. berghei* (Frolet *et al.*, 2006; Garver *et al.*, 2009) e reduziu o número de oocistos de *P. falciparum* (Garver *et al.*, 2009). Esses dois fatores de transcrição regulam a expressão basal de TEP1, LRIM1 e APL1C, impedindo o desenvolvimento do parasito.

Outra via de ativação presente nos mosquitos é a via JAK/STAT que também contribui para o controle do parasito. O gene STAT-A regula a expressão de óxido nítrico sintetase (NOS) em resposta à infecção bacteriana e ao *Plasmodium* (Gupta *et al.*, 2009).

1.6.4 Respostas efetoras

Após o reconhecimento dos patógenos, a modulação, a amplificação e a transdução dos sinais, ocorre a transcrição de genes relacionados às respostas efetoras. Duas categorias de sistemas efetores estão bem estabelecidas: a síntese de peptídeos antimicrobianos e a melanização. Os peptídeos antimicrobianos são majoritariamente produzidos no corpo gorduroso e nos hemócitos (Christophides *et al.*, 2002). A melanização é uma defesa do sistema imune que induz a deposição de melanina na superfície do parasito. Porém somente em alguns casos já citados anteriormente esse evento vem a ocorrer (Blandin *et al.*, 2004).

1.6.5 Resposta celular

Além dos componentes humorais, o sistema imune dos mosquitos também possui componentes celulares. A resposta celular é mediada por hemócitos que atuam fagocitando os esporozoítos presentes na hemolinfa dos mosquitos, além deles estarem associados à encapsulação celular (Hillyer *et al.*, 2007). Esta encapsulação consiste na agregação de hemócitos ao redor do patógeno, seguida pela deposição de melanina, formando-se uma cápsula (Michel e Kafatos 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença que ainda causa milhares de mortes em várias partes do planeta (Greenwood *et al.*, 2008; WHO, 2008). Uma das estratégias de controle é o combate ao vetor do parasito, o mosquito do gênero *Anopheles*. Essas medidas consistem principalmente na aplicação de inseticidas, entretanto, devido ao uso indiscriminado, há um aumento na resistência dos mosquitos aos inseticidas (Hartl, 2004).

Com isso, novas estratégias estão sendo utilizadas como a busca por vacinas de bloqueio de transmissão e modificações genéticas, através da introdução de genes exógenos, que permitem aos mosquitos bloquear o desenvolvimento do parasito, reduzindo assim a competência vetorial (Dinglasan e Jacobs-Lorena, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008).

A interação parasito-vetor é bastante complexa e determina, por exemplo, que das mais de 400 espécies de mosquitos anofelinos existentes, apenas cerca de 40 são importantes vetores da malária humana no mundo. Diferentes espécies de anofelinos e, até mesmo linhagens diferentes dentro de uma espécie, possuem características distintas quando infectados com uma mesma espécie de *Plasmodium* (Jaramillo-Gutierrez *et al.*, 2009). Desta forma, as relações que determinam a competência vetorial de um mosquito são muito importantes para uma maior compreensão sobre a transmissão da doença.

Existem vários mecanismos que causam a refratariedade e susceptibilidade de determinado mosquito ao parasito (Collins *et al.*, 1986; Vernick *et al.*, 1995). O conhecimento desses eventos pode ajudar a desenvolver novas estratégias de controle. O estudos de genes relacionados a imunidade permite a identificação destes e a sua atuação na geração do fenótipo da refratariedade (Dong *et al.*, 2006). Assim, possibilita o desenvolvimento de mosquitos refratários ao parasito.

Para esses estudos, em primeiro lugar utilizam-se modelos de malária para a busca de genes responsáveis por gerar esse fenótipo. Vários modelos já estão bem estabelecidos, porém no Brasil, o único modelo experimental em que se consegue fechar o ciclo do parasito (nos hospedeiros vertebrados e invertebrados) envolve o *Plasmodium gallinaceum* e os mosquitos culicíneos do gênero *Aedes* spp. (Táson de Camargo e Krettli, 1978).

Apesar da importância do *Anopheles aquasalis* como vetor, principalmente na região costeira do Brasil, e de sua relativa facilidade de manutenção em colônia, existem poucos estudos relacionados ao processo de interação parasito-vetor e pouco se sabe sobre sua competência vetorial e sua susceptibilidade à infecção com diferentes espécies de *Plasmodium*.

Portanto é necessário o desenvolvimento de um modelo que mais se aproxime à combinação parasito/mosquito vetor da malária humana, para que estudos mais direcionados possam ser realizados. Com a obtenção de, por exemplo, esporozoítos de *Plasmodium* em nossas espécies de mosquitos seria possível beneficiar pesquisas na área de desenvolvimento de vacinas de bloqueio de transmissão. Além disso, seria possível o estudo, com maior especificidade, da interação parasito-vetor para que novas estratégias de controle sejam obtidas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a competência vetorial de *Anopheles aquasalis* em resposta à infecção com *Plasmodium gallinaceum*, para utilizá-lo como um possível modelo experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de infecção utilizando o *A. aquasalis* como vetor;
- Avaliar possíveis barreiras impostas pelo mosquito durante o ciclo do parasito, para determinação da refratariedade.
- Comparar os níveis de expressão de TEP1 na resposta imune, em *A. aquasalis* infectados com *P. gallinaceum* e em mosquitos controle não infectados.

4. METODOLOGIA

4.1 Colônias de *A. aquasalis* e *A. fluviatilis*

Ambas as espécies de mosquitos foram mantidas em um insetário a uma temperatura média de 27°C, umidade relativa do ar média de 80% e fotoperíodo de 12 horas. As larvas de *A. aquasalis* foram mantidas em água desclorada misturada com água do mar filtrada (proporção de 10:1 v/v) e alimentadas com ração de peixe (Tetramim e Goldfish Colour, Alcon) trituradas, peneiradas e misturadas na proporção de 1:1. As larvas de *A. fluviatilis* foram mantidas em bandejas com água desclorada e alimentadas com ração para peixes (Goldfish Colour, Alcon). As pupas eram coletadas diariamente das bandejas e colocadas em copos de plásticos dentro de gaiolas onde emergiam os mosquitos. Os mosquitos foram alimentados com solução de sacarose a 10% (p/v) e as fêmeas foram, semanalmente, alimentadas com sangue de camundongos Swiss Webster, previamente anestesiados com 5mg de Thiopentax (Tiopental sódico) por via intraperitoneal. Três dias após a alimentação sangüínea, um recipiente de plástico escuro, contendo papel de filtro e água, para *A. aquasalis*, ou somente água, para *A. fluviatilis* era colocado no interior das gaiolas para que as fêmeas realizassem a postura dos ovos. Após 48h, os recipientes eram retirados das gaiolas e os ovos transferidos para bandejas plásticas com água.

4.2 Manutenção do *Plasmodium gallinaceum*

A cepa 8A de *P. gallinaceum*, proveniente do isolado original de Brumpt, 1937 foi mantida através de sucessivas passagens sanguíneas entre aves (*Gallus gallus*) de cerca de 5 dias de idade. Acompanhou-se a parasitemia das aves através de esfregaços sanguíneos que foram corados com Giemsa. Para a passagem sanguínea foram usadas aves com parasitemia de até 25%. Uma alíquota, de aproximadamente 300µL, do sangue destas aves foi retirada e inoculada, por via intramuscular, em aves jovens (3- 7 dias).

O ciclo sexual do parasito era realizado, a cada 5 passagens sanguíneas, através da alimentação dos *A. fluviatilis* em aves infectadas. Após o estabelecimento da infecção nos mosquitos, estes eram usados, após 15 dias, para transmitirem o *P. gallinaceum* a aves jovens, reiniciando o ciclo assexual. A manutenção do ciclo deste parasito utilizando o *Aedes fluviatilis* como vetor já vem sendo utilizado no laboratório a mais de 30 anos (Táson de Camargo e Krettli, 1978).

4.3 Infecção dos mosquitos com *P. gallinaceum*

Para os experimentos de infecção, os mosquitos, logo após a sua eclosão, foram mantidos com uma solução de sacarose 10% (p/v) suplementada com 0,5g/L de ácido para-aminobenzóico (PABA) e 0,025% (v/v) de gentamicina. (Beier *et al.*, 1994; Peters e Ramkaran, 1980). Cerca de 200 mosquitos com três a cinco dias de idade foram privados de solução açucarada por cerca de 8h antes de serem alimentados em aves infectadas com parasitemia ascendente entre 4%-25% e apresentando gametócitos. As aves foram imobilizadas e colocadas na parte de cima da gaiola dos mosquitos por cerca de 20 minutos e 24 horas após a alimentação as fêmeas alimentadas foram transferidas para novas gaiolas. Os mosquitos infectados foram mantidos nas mesmas condições da colônia.

Um dia após a infecção, os intestinos de aproximadamente 10 mosquitos de cada espécie foram dissecados em PBS (137mM NaCl, 27mM KCl, 10mM NaH₂PO₄, 1,76mM KH₂PO₄, pH 7,4), com o auxílio de pinças e de uma lupa Stemi DV4 (Zeiss), para a verificação da presença de oocinetos. Após a dissecação, os intestinos foram abertos e o bolo alimentar foi retirado e transferido para uma lâmina aonde foi realizado um esfregaço sanguíneo. Em seguida, o esfregaço foi corado com Giemsa para a observação dos oocinetos sob um microscópio óptico (aumento de 1000x).

Grupos de 10 fêmeas de cada espécie foram retiradas das gaiolas nos tempos de 1, 3, 5 e 7 dias após a alimentação infectante. As fêmeas retiradas foram anestesiadas, em gelo, e seus intestinos foram dissecados em PBS 1x gelado e estéril e imediatamente transferidos para um tubo estéril contendo

100µL de Trizol (Invitrogen) em um banho de gelo seco e etanol. Após a coleta dos 10 intestinos de cada espécie, as alíquotas eram armazenadas à -70°C.

Sete dias após a alimentação infectante, outro grupo de mosquitos infectados foi anestesiado, em gelo, e então seus intestinos foram dissecados em PBS 1x e corados com mercúrio-cromo (2%) para a contagem de oocistos sob um microscópio óptico (aumento de 100x).

4.4 Cultivo de oocinetos de *P. gallinaceum*

O protocolo para o cultivo de oocinetos foi modificado a partir de Kaushal *et al.*, (1983). Aves de 2 semanas foram infectadas através de passagem sanguínea e tiveram suas parasitemias acompanhadas por esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa. Após cerca de uma semana, quando as aves apresentavam parasitemias ascendentes de 20-70%, o sangue das aves foi coletado com seringas heparinizadas, por punção cardíaca e imediatamente transferido para tubos Falcon de 50 mL, previamente aquecidos a 37°C. Em seguida, o sangue foi rapidamente misturado, em uma proporção 1:1 a uma solução inibidora de ativação estéril 1x (TRIS 8mM, NaCl 140mM, Glicose 10mM, pH 7,35) e os tubos foram centrifugados a 1600 x *g* por 10 minutos para a separação do plasma e compactação das hemácias. Posteriormente, as hemácias foram ressuspensas em uma solução de exflagelação (16% soro de galinha inativado, 0,3% NaHCO₃, ácido xanturênico 50µM) em um volume igual ao do sangue coletado, para a estimulação da exflagelação dos microgametócitos. Para permitir a fecundação dos macrogametas recém formados, as amostras foram incubadas por 40 minutos à temperatura ambiente. Durante esse período de incubação, uma alíquota de 10µL foi aplicada em uma lâmina de microscopia e observada em um microscópio óptico em aumento de 400x para observação de qualquer sinal de exflagelação.

Após os 40 minutos, as amostras foram transferidas, cuidadosamente, para tubos Falcon de 50mL com 20mL de Histopaque® -1077 (Sigma) e centrifugadas a 1600 x *g* por 30 minutos para a separação dos zigotos das demais células através de um gradiente de densidade. A camada contendo os

zigotos foi coletada e transferida para um novo tubo estéril de 50mL, acrescida de solução inibidora de ativação (completando-se o volume para 50mL) e centrifugada a 1600 x g por 3 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspenso em 10mL de solução inibidora de ativação e transferido para um tubo Falcon de 15mL aonde os restos celulares e células leucocitárias foram retirados da solução através de uma reação de aglutinação com 500µL de uma solução 1mg/mL de aglutinina de germen de trigo (Sigma-Aldrich). A solução de aglutinina foi acrescentada ao tubo e este foi agitado por 2 minutos, deixado em posição vertical por 20 minutos para a sedimentação dos resíduos celulares, e centrifugado a 150 x g por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante, contendo os zigotos purificados, foi transferido para um novo tubo de 50mL e uma alíquota de 10µL foi retirada para a contagem de parasitos em uma câmara de Neubauer.

Após a contagem do número de zigotos, o restante do sobrenadante foi centrifugado a 1600 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e o sedimento, contendo zigotos e macrogametas não fecundados, foi ressuspenso em meio 199 pH 8,2 contendo L-glutamina 2mM, Glicose 10 mM, 500U/mL penicilina, 50µg/mL estreptomicina para uma contagem final de $1,5 \times 10^6$ zigotos por mL. Os parasitos foram mantidos em cultura a 26°C por até 24 horas. A presença de oocinetos maduros foi confirmada, após 20h horas em cultivo, por contagem de parasitos em uma câmara de Neubauer.

A viabilidade dos oocinetos ao final do cultivo foi averiguada pelo método de exclusão com Azul de Tripán. Uma alíquota de 10µL da cultura foi retirada após 22 horas e misturada com 10µL de Azul de Tripán (Sigma) e as células foram contadas em uma câmara de Neubauer.

4.5 Injeção dos oocinetos nos mosquitos

Após a contagem do número de oocinetos, o tubo contendo a cultura, foi centrifugado a 1600 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e o sedimento foi ressuspenso em 1mL de PBS 1x estéril e transferido para um microtubo de 1,5mL. Após nova centrifugação a 3.220 x g por 5 minutos à temperatura

ambiente, o sedimento foi ressuspensionado com meio 199 para uma concentração final de 20 oocinetos por nL.

Uma solução contendo oocinetos (46nL) foi injetada no tórax das fêmeas de 3 a 5 dias de idade de *A. fluviatilis* e *A. aquasalis*, previamente anestesiadas sob gelo, com auxílio de um microinjetor *Nanoject II* (Drummond) e de uma lupa Stemi DV4 (Zeiss). Os mosquitos foram transferidos para novas gaiolas e mantidos sob as mesmas condições da colônia. Diariamente, os mosquitos foram observados e os insetos mortos foram removidos da gaiola.

Uma semana após a injeção dos oocinetos, intestinos, carcaças contendo o corpo gorduroso e glândulas salivares de cerca de 15 fêmeas de cada espécie foram dissecadas para verificar a presença de oocistos por fora desses tecidos, uma vez que os parasitos injetados na hemolinfa podem se aderir a qualquer tecido do mosquito.

Quinze dias após a injeção foi realizado o isolamento de esporozítos de *P. gallinaceum* para a confirmação da presença nos mosquitos injetados. Dez mosquitos de cada espécie foram seccionados, separando-se o tórax e a cabeça. Em seguida esse material foi colocado em microtubos de 0,5mL furados no fundo com uma agulha e preenchidos com lã de vidro. Adicionou-se 100µL de meio RPMI 1640 (Gibco), pH 7,4 (2mM glutamina, 25mM HEPES, 11mM glicose, 25mM NaHCO₃, e 40µ/ml de gentamicina) em cada tubo que depois foi centrifugado à 3000 x g por 5 minutos dentro de tubos microtubos de 1,5mL para a coleta do material. O procedimento foi repetido duas vezes trocando os tubos de 1,5mL. Com os 300µL de meio obtido foi realizado mais uma centrifugação à 3000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo os esporozoítos, foi ressuspensionado em 50µL de meio RPMI 1640. Uma alíquota de 10µL foi retirada e colocada em uma câmara de Neubauer para a confirmação da presença de esporozoítos nos mosquitos.

O restante dos mosquitos injetados, após 15 dias, foi utilizado para picar aves saudáveis de sete dias de idade, durante 20 minutos, para a verificação da capacidade de infecção dos mosquitos injetados. A parasitemia dessas aves foi acompanhada durante duas semanas através de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Em alguns casos, quando não foram encontrados parasitos nas aves foi realizada uma segunda passagem com 500µL de sangue

para novo grupo de aves sadias. Novamente a parasitemia foi acompanhada até a confirmação de positividade das aves.

4.6 Extração de RNA total dos mosquitos

Todas as amostras de mosquitos coletadas nos diferentes tempos após a infecção foram maceradas em 200 μ L de Trizol (Invitrogen) com o auxílio de um pistilo de plástico. Após homogeneização e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, 40 μ L de clorofórmio foram acrescentados à mistura, seguido de vigorosa agitação e incubação à temperatura ambiente, por 3min. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15min a 4°C, sendo a fase aquosa, contendo o RNA, cuidadosamente transferida para microtubos estéreis de 1,5 mL, resfriados em gelo. O RNA foi precipitado adicionando-se à fase aquosa 100 μ L de álcool isopropílico, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10min e centrifugação a 12.000 x g, por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 200 μ l de etanol 75% seguido pela centrifugação a 7.500 x g por 5min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco ao ar. O RNA total foi ressuspendido em 20 μ L de água tratada com 0,1% de DEPC (Dietilpirocarbonato), sendo posteriormente armazenado a -70°C.

4.7 Dosagem do RNA

Logo após a extração dos RNAs, uma alíquota de 2 μ L de cada amostra foi retirada e diretamente dosada em um leitor NanoDrop ND-1000. A pureza do RNA total foi determinada pelo valor da razão dos valores de leitura das absorbâncias a 260/280 nm e consideramos um RNA puro quando esta razão variou de 1,8 a 2.

4.8 Síntese do cDNA

Amostras de RNA total (1µg) foram, inicialmente, tratadas com a enzima RQ1 DNase (Promega). Foram utilizadas 2U da enzima, 2µL do tampão da enzima (400mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM MgSO₄, 10mM CaCl₂) e água tratada com 0,1% de DEPC para completar um volume final de 20 µL. Essas reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em seguida foram adicionados 2µL de solução de parada da reação (*Stop Solution*) e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 65°C para inativação da DNase.

Após o tratamento com DNase, foram acrescentados a cada reação 2µL de uma solução de dNTPs (10 mM) e 2 µL do iniciador Oligo dT (10 mM). As reações foram incubadas a 65°C por 2 minutos, colocadas em gelo, acrescentadas de 8µL de tampão 5x (TRIS-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 50 mM, pH 8,0) para a enzima M-MLV RT e de 4µL de DTT (100 mM) e os tubos foram homogeneizados, incubados por 2 minutos a 42°C e divididos em dois tubos contendo 19µL em cada. Para a síntese do cDNA foi adicionado a um dos tubos 200U (1µL) da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega), enquanto no outro tubo foi adicionado 1 µL de água tratada com 0,1% de DEPC para a verificação de possíveis contaminações com DNA. As amostras foram incubadas por 50 minutos a 42°C e em seguida, a transcriptase reversa foi inativada a 70°C por 15 minutos.

4.9 Amplificação por RT-PCR

As reações de amplificação foram realizadas a partir das diferentes amostras de cDNA (RT-PCR) utilizando iniciadores para os genes do RNA ribossomal do mosquito, RP49 (Gentile *et al.*, 2005), para o gene do sistema imune do mosquito, TEP1 (Levashina *et al.*, 2001), e para o gene expresso preferencialmente nos esporozoítos de oocistos maduros de *P. gallinaceum*, Pg93 (Lacrue *et al.*, 2005) (**Tabela 1**). As amplificações para o RP49 e Pg93 foram realizadas em um termociclador automático (Eppendorf) em 35 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos para anelamento dos iniciadores a 61°C, 1 minuto a 72°C para extensão dos fragmentos) precedidos por 5 minutos de

aquecimento a 94°C e seguidos por uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C. Para Pg93, inicialmente, foi realizado um gradiente de temperatura com uma variação entre 54,1°C a 62°C para determinação da temperatura de anelamento ideal dos iniciadores deste gene, sendo que a escolhida para o RT-PCR foi a de 54,1°C. Para esse gradiente utilizou-se DNA genômico de *P. gallinaceum*.

Para o gene TEP1 as condições de ciclagem foram um pouco alteradas. Iniciou-se com 5 minutos de aquecimento a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos de anelamento a 60°C e 30 segundos de extensão a 72°C. Por fim uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C foi realizada.

Os seguintes componentes foram adicionados a todas as reações: tampão 10x (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,4, 1,5mM MgCl₂, 1mg/mL gelatina), 2mM dNTPs, 2µM de cada iniciador (10µM para TEP1), e 1U de Taq DNA polimerase recombinante (INVITROGEN). Foram utilizados como molde 0,3 - 0,5µg de cDNA ou controles negativos de acordo com o gene a ser amplificado. Para TEP1 foi utilizado 2µL do cDNA diluído 3 vezes (0,2µg).

Os produtos das amplificações foram visualizados em géis de agarose 2% corados com 5µg/mL de brometo de etídeo (Invitrogen).

Tabela 1: Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR e de PCR em tempo real.

Iniciador	Sequência	T _m
RP49F	5'-GTGAAGAAGCGGACGAAGAAGTT-3'	61°C
RP49R	5'-TGCATCATCAGCACCTCCAGC-3'	
Pg93F	5'-GAAAAGATAAACACAAAAATGATAG-3'	54,1°C
Pg93R	5'-CTTTATATCTTAACCTTTTATCGC-3'	
TEP1_16F	5'-CCTGCATGTCCGTATGGAATAC-3'	60°C
TEP1_176R	5'-CTTTCTTACCGCGTTTCGTTG-3'	
RP49 qPCR F	5'-GCTATGATAAGCTCGCTCCTGC-3'	60°C
RP49 qPCR R	5'-TCATCAGCACCTCCAGCTC-3'	

4.10 Quantificação da expressão de TEP1 em *A. aquasalis*

Foram analisados no PCR em tempo real três *pools* de amostras de diferentes infecções contendo carcaças e abdomens de dez mosquitos infectados e de mosquitos não infectados com o *P. gallinaceum*. Todas as amostras de cDNAs foram diluídas 3x. Foi utilizada a condição padrão de ciclagem (95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto), o reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix* e iniciadores para o gene endógeno, RP49, e para o gene alvo, TEP1 (**Tabela 1**). O equipamento *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) foi utilizado para a realização do PCR em tempo real.

Primeiramente foi construída uma curva padrão para os genes alvo e para o RP49 com as amostras de mosquitos não infectados utilizando-se diferentes diluições (1; 1:5; 1:25; 1:125; 1:625) do cDNA. Todas as reações foram testadas em triplicata. Os valores obtidos foram analisados no software *7000 System Sequence Detection (Applied Biosystems)* para geração da curva padrão e a eficiência dos iniciadores para os genes RP49 e de TEP1 foram calculadas a partir da inclinação (*slope*) das curvas geradas. A fórmula utilizada para o cálculo da eficiência da amplificação dos genes foi:

$$E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$$

O método utilizado para a análise da expressão de TEP1 em *A. aquasalis* foi o da quantificação relativa. Para isso, o gene alvo (TEP1) foi normalizado com o controle endógeno (RP49), e as amostras de mosquitos infectados foram normalizadas com as amostras do calibrador (mosquitos não infectados).

O cálculo da expressão de TEP1 foi realizado pelo software *Q-Gene* (Muller *et al.*, 2002). Esse programa utiliza os valores dos C_{Ts} (ciclo do PCR no qual a curva de amplificação cruza a linha de corte) do gene alvo e do endógeno, e a eficiência dos iniciadores para o cálculo da expressão de TEP1. Primeiro calcula-se a média dos C_{Ts} dentre as réplicas de cada amostra. Em

seguida a média da expressão normalizada é obtida através da seguinte fórmula aonde E é a eficiência dos iniciadores:

$$\frac{\left(E_{\text{RP49}}\right)^{CT_{\text{RP49, média}}}}{\left(E_{\text{TEP1}}\right)^{CT_{\text{TEP1, média}}}}$$

O erro padrão derivado da obtenção das médias do C_T também foi calculado no programa *Q-Gene* através da equação diferencial de Gauss. Com todos esses cálculos em mãos, pode ser encontrado o valor que demonstra, com base no calibrador, quantas vezes o gene alvo é expresso. Neste caso o valor não possui unidade e a quantidade expressa é em relação ao calibrador.

Após essa análise o valor gerado pelos três experimentos desenvolvidos foi avaliado em um programa estatístico (*GraphPad Prism, v.5*) para observar se houve diferença significativa da expressão de TEP1 em *A. aquasalis* infectado com *P. gallinaceum*. Utilizou-se o teste *D'Agostino & Pearson* para verificar a normalidade das amostras e em seguida fez-se o teste-T de *student*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos de interação do *Plasmodium* com seus respectivos hospedeiros invertebrados vêm sendo realizados há bastante tempo (Gupta *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2008; Rosenberg, 1985; Sinden, 1999). Vários modelos experimentais são utilizados nesses estudos devido à capacidade dos parasitos de infectarem diferentes hospedeiros vertebrados. Muitos dos avanços discutidos são obtidos através de estudos baseados nesses modelos experimentais que promovem custo mais reduzido e facilidades operacionais.

O *Plasmodium gallinaceum* é um parasito capaz de se desenvolver em diversas espécies de mosquitos de até seis gêneros diferentes: *Aedes*, *Culex*, *Armigeres*, *Culiseta*, *Mansonia* e *Anopheles* (Eyles, 1952; Garnham, 1966; Niles *et al.*, 1965; Vargas e Beltrán, 1941). A espécie de vetor mais utilizada experimentalmente é o *Aedes aegypti* aonde cerca de 100% dos mosquitos se tornam infectados pelo *P. gallinaceum*. O nível de susceptibilidade a esse parasito varia bastante de acordo com a espécie de mosquito utilizada, sabendo-se que os gêneros *Aedes* e *Armigeres* são melhores hospedeiros que *Anopheles* e *Culex* (Garnham, 1966). Isto explica a dificuldade de se encontrar estudos utilizando infecção de *P. gallinaceum* em anofelinos. Os trabalhos publicados apresentam taxas de infecções baixas além de uma baixa diversidade de espécies infectadas (Alavi *et al.*, 2003; Cantrell e Jordan 1949; Eyles, 1952; Vernick *et al.*, 1995). Porém através de cruzamentos entre linhagens de *Anopheles quadrimaculatus* susceptíveis foi possível selecionar um mosquito com praticamente a mesma capacidade de infecção do *A. aegypti* (Eyles, 1952). Sendo assim o *P. gallinaceum* pode se tornar um bom modelo utilizando vetores do gênero *Anopheles*.

Outro aspecto favorável à utilização desse parasito é que diversas pesquisas demonstraram a proximidade evolucionária entre o *P. gallinaceum* e o *P. falciparum* através de análises filogenéticas dos genes que codificam a proteína circunsporozoíta (CSP) e a proteína relacionada a trombospondina (TRAP) (McCutchan *et al.*, 1996; Templeton e Kaslow, 1997). Entretanto outros autores utilizando regiões mitocondriais e ribossomais do parasito não encontraram essa proximidade filogenética (Escalante e Ayala, 1994; Rich *et al.*, 2009).

Além disso, já foi demonstrado que o *P. gallinaceum* conseguiu se desenvolver na mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*. Para isso foi necessário o cultivo do parasito e a injeção dos oocinetos na hemolinfa da mosca. Com esse sucesso do desenvolvimento do parasito, foi possível estudar diversos aspectos genéticos da competência vetorial assim como processos de interação parasito vetor (Schneider e Shahabuddin, 2000).

5.1 Infecção dos mosquitos com *P. gallinaceum*

A geração de um modelo experimental de malária no Brasil, que possa sustentar o desenvolvimento do parasito até a produção de esporozoítos, se consiste de extrema necessidade. Seguindo o fato de que o *P. gallinaceum* consegue se desenvolver em uma variedade de espécies de mosquitos e de mosca, a capacidade de infecção em *A. aquasalis* foi testada neste trabalho.

Para cada um dos nove experimentos de infecção realizados foi utilizado uma ave para infectar tanto o *A. aquasalis* quanto o *A. fluviatilis* (controle positivo utilizado). A parasitemia de cada ave variou entre as diferentes infecções de 4% a 25% (**Tabela 2**).

Não foi possível observar a presença de oocistos de *P. gallinaceum* em *A. aquasalis* enquanto, o *A. fluviatilis* se infectou em todos os experimentos, apresentando diferentes médias de oocisto por intestino, para cada experimento (**Tabela 2**). Em *A. fluviatilis*, observou-se uma variação de 2,4 a 107,1 no número médio de oocistos, por intestino. Além disso, houve uma diferença nas parasitemias das aves de cada experimento que foi desde 4% até 25%, entretanto essa diferença não se mostrou relacionada ao sucesso da infecção.

Estudos anteriores demonstraram que aves com parasitemias abaixo de 6% e em ascendência produzem gametócitos mais infectivos, melhorando a infecção dos mosquitos (Carvalho *et al.*, 1992), porém os resultados aqui obtidos apresentaram ótimas infecções com parasitemias elevadas e em ascensão, como no experimento 7 onde a maior média do número de oocistos por intestino de *A. fluviatilis* encontrada foi obtida em uma infecção com a parasitemia da ave em 21% (**Tabela 2**).

Tabela 2: Infecção de *Aedes fluviatilis* e *Anopheles aquasalis* com *Plasmodium gallinaceum*

Experimento de infecção	Parasitemia da ave na infecção	Espécies de mosquitos	Número de mosquitos dissecados	Nº de oocistos/intestino (Média)
1	25%	<i>A. fluviatilis</i>	5	2,4
		<i>A. aquasalis</i>	25	0
2	15%	<i>A. fluviatilis</i>	15	15,3
		<i>A. aquasalis</i>	25	0
3	20%	<i>A. fluviatilis</i>	8	64,75
		<i>A. aquasalis</i>	30	0
4	8%	<i>A. fluviatilis</i>	14	5,2
		<i>A. aquasalis</i>	10	0
5	8%	<i>A. fluviatilis</i>	13	49,5
		<i>A. aquasalis</i>	19	0
6	8%	<i>A. fluviatilis</i>	16	52,3
		<i>A. aquasalis</i>	31	0
7	21%	<i>A. fluviatilis</i>	16	107,1
		<i>A. aquasalis</i>	14	0
8	13,5%	<i>A. fluviatilis</i>	17	99,2
		<i>A. aquasalis</i>	33	0
9	4,6%	<i>A. fluviatilis</i>	16	50,8
		<i>A. aquasalis</i>	15	0

A presença de oocinetos maduros e imaturos de *P. gallinaceum*, 24 horas após a infecção, foi visualizada em ambas as espécies de mosquitos através de esfregaços do bolo intestinal corados com Giemsa. Os oocinetos imaturos possuem o núcleo localizado mais na região posterior e uma forma conhecida como *retort*, uma extensão do zigoto que era esférico (Sinden *et al.*, 1985). Enquanto nos oocinetos maduros o núcleo migra para a região central e as extremidades se tornam arredondadas e em forma de banana (Garnham, 1966). Além disso, é possível observar na sua morfologia externa pigmentos de hemozoína presentes no citoplasma tanto em oocinetos imaturos como nos maduros (**Figura 4**).

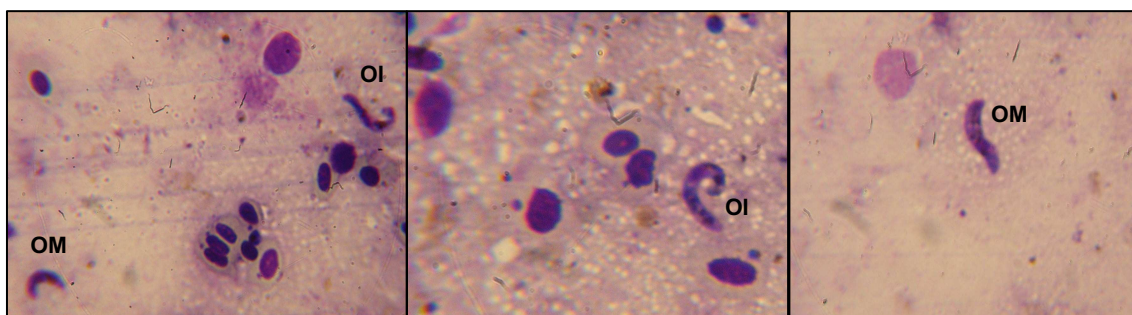


Figura 4: Oocinetos de *P. gallinaceum*. Esfregaços de intestinos de *A. aquasalis*, corados com Giemsa, 24 horas após alimentação infectante, mostrando oocinetos maduros (OM) e imaturos (OI) de *P. gallinaceum*. Aumento de 1000x.

Nos esfregaços de intestinos dissecados 24 horas após a infecção foram detectados oocinetos de *P. gallinaceum* em ambas as espécies de mosquitos sugerindo que eventos anteriores a maturação dos oocinetos, como a exflagelação dos microgametócitos, não determina a refratariedade de *A. aquasalis*. O ácido xanturênico, um subproduto do metabolismo do triptofano, foi identificado como o fator de ativação da exflagelação e a alteração da sua concentração pode afetar o desenvolvimento do parasito (Billker *et al.*, 1998). No mosquito *A. stephensi*, o número de oocistos de *P. falciparum* aumentou quando a concentração do ácido xanturênico foi aumentada (Bhattacharyya e Kumar, 2001). Além disso, foi demonstrado que o *P. gallinaceum* não é afetado com alterações na concentração do ácido xanturênico sendo capaz de se desenvolver tanto em anofelinos quanto em culicíneos, ao contrário de outras espécies de *Plasmodium*, como o *P. berghei* que só se desenvolve em

Anopheles (Alavi *et al.*, 2003; Arai *et al.*, 2001). Billker *et al.*, (2004) mostraram que o ácido xanturênico induz um aumento na concentração do íon cálcio (Ca^{2+}) que é necessário para a gametogênese.

Estudos anteriores mostraram que o ácido para-aminobenzóico (PABA) também influencia no desenvolvimento do parasito no intestino dos mosquitos. A suplementação de PABA, em uma concentração de até 0,05%, à solução de açúcar antes da alimentação infectante em *A. stephensi* aumentou significativamente o número de oocistos de *P. berghei* e *P. yoelli* (Peters e Ramkaran, 1980). Zhang *et al.*, (1992) demonstraram que o PABA pode ser utilizado pelo *P. falciparum* para a biossíntese do folato, necessário para o desenvolvimento do parasito.

Além desses ácidos, outras substâncias possuem a capacidade de influenciar o desenvolvimento do parasito nos mosquitos, como a insulina e a gentamicina. Tanto o hormônio quanto o antibiótico em determinadas concentrações aumentaram o número de oocistos de *P. falciparum* em *A. stephensi* e em *A. gambiae* (Beier *et al.*, 1994). A gentamicina, assim como outros antibióticos, reduz o número de bactérias presente nos intestinos dos mosquitos, diminuindo a imunidade contra o parasita (Beier *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2009). Já a utilização de concentrações elevadas de insulina induziu a um efeito imunossupressor nos mosquitos permitindo levando a um aumento do número de oocistos de *P. falciparum* (Beier *et al.*, 1994).

Baseado nesses experimentos utilizou-se uma solução de glicose suplementada com 0,05% de PABA e 0,025% de gentamicina para alimentar os mosquitos antes de todas as infecções realizadas. Entretanto não foram observados oocistos de *P. gallinaceum* em *A. aquasalis*, nem um aumento significativo do número de oocistos em *A. fluviatilis*.

Vernick *et al.*, (1995) relataram que a invasão dos oocinetos de *P. gallinaceum* ocorre 28 horas após a infecção. Sendo assim, os oocinetos visualizados nos esfregaços sanguíneos podem ainda ser alvos de enzimas digestivas assim como do sistema imune do *A. aquasalis*, uma vez que nesse mosquito não foi observado a presença de oocistos.

Vários estudos demonstram uma redução do número de oocinetos maduros em relação ao número de oocistos encontrados independente da combinação de parasito e vetor utilizado (Alavi *et al.*, 2003; Baton e Ranford-

cartwright, 2005; Poudel *et al.*, 2008). Porém neste trabalho, o *P. gallinaceum* não conseguiu formar oocistos em *A. aquasalis*. Isto pode ser devido a pelo menos dois fatores: os oocinetos não conseguem invadir a matriz peritrófica e o contato com o epitélio intestinal foi raro, sugerindo que este evento pode ser mediado por receptores espécie-específicos (Sinden *et al.*, 2004). Além disso, caso os oocinetos consigam invadir as células intestinais, eles podem ser destruídos antes de formarem oocistos viáveis (Vernick *et al.*, 1995). Provavelmente essa morte do parasito ocorre através da ativação do sistema imune do mosquito que será discutido em outro tópico.

Para atravessar a matriz peritrófica, os oocinetos de *Plasmodium* secretam pró-quitinases, que serão ativadas por tripsinas produzidas pelo mosquito, e em seguida, vão hidrolisar a quitina presente na MP (Huber e Cabib, 1991; Vinetz *et al.*, 2000). Vários autores acreditam que a MP possa ser uma barreira física, uma vez que a inibição das quitinases de *P. falciparum* e *P. gallinaceum* impediu o desenvolvimento desse parasito no intestino dos mosquitos (Shahabuddin *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 2001), sujeitando os mesmos às enzimas digestivas. A importância da MP foi mostrada pela alimentação de mosquitos com uma quitinase exógena, evitando-se a formação da matriz e, conseqüentemente acelerando-se o processo de digestão do sangue (Villalon *et al.*, 2003). Uma possível tentativa neste modelo envolveria a remoção da matriz em *A. aquasalis* para testar essa hipótese.

A associação do parasito com o epitélio intestinal é o evento inicial para o processo de invasão. A presença de carboidratos na superfície das células epiteliais auxilia na penetração do parasito (Zieler *et al.*, 2000). Ensaio de adesão *in vitro* demonstraram que oocinetos de *P. gallinaceum* se ligam com alta afinidade às células de *Aedes aegypti* (Zieler e Dvorak, 2000). Porém esta adesão dos oocinetos às microvilosidades não foi visualizada em *A. aquasalis* (Ferreira, 2002). Esta mesma autora relatou a manutenção da integridade celular de *A. aquasalis* e a presença de *P. gallinaceum* entre as células epiteliais sugerindo que o parasito realiza uma migração lateral invadindo células vizinhas até o oocineto atingir a lâmina basal conforme descrito por Han *et al.*, (2000).

5.2 Detecção da infecção por RT-PCR

A ausência do *P. gallinaceum* nos mosquitos *A. aquasalis* também foi evidenciada através da expressão do gene Pg93 em diferentes dias após a infecção. Essa proteína foi descoberta recentemente, mas apesar de sua função ainda não ser conhecida, sabe-se que ela é expressa nos estágios assexuais e nos estágios sexuais do parasito, sendo preferencialmente mais expressa nos núcleos de esporozoítos encontrados em oocistos maduros (Lacrué *et al.*, 2005).

Inicialmente, foi realizado um gradiente de temperatura de anelamento para o iniciador Pg93 uma vez que a temperatura de 58°C utilizada por Lacrué *et al.*, (2005) não estava apresentando bons resultados nas nossas amostras. A variação testada foi de 54,1°C a 62°C e o melhor resultado obtido foi com a temperatura de 54,1°C conforme a **Figura 5**.

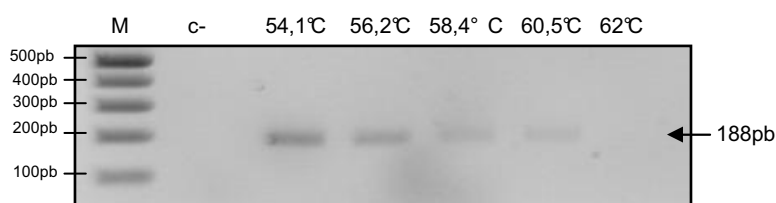


Figura 5: Gradiente de temperatura de anelamento do iniciador Pg93. Amostra de DNA genômico de *P. gallinaceum* foi submetido à PCR com gradiente de temperatura de anelamento utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene Pg93. **M:** marcador de DNA 1kb DNALadderPlus; **c-:** ausência de DNA; **54,1°C, 56,2°C, 58,4°C, 60,5°C e 62°C:** gradiente de temperatura utilizado para anelamento do iniciador.

Em seguida, amostras de cDNAs de intestinos de *A. aquasalis* e *A. fluviatilis* 1, 3, 5, e 7 dias após a infecção com *P. gallinaceum* foram submetidas a RT-PCR. Em *A. aquasalis* foi observada a presença de fragmento de 188 pares de base correspondente ao gene Pg93 somente nas amostras do primeiro dia enquanto em *A. fluviatilis* observou-se a presença desse gene em todas as amostras, como o esperado (**Figura 6B**). Acredita-se que a expressão do Pg93 nas amostras do primeiro dia em *A. aquasalis* se deve a presença de oocinetos de *P. gallinaceum* no intestino antes do momento de invasão conforme visualizado na **Figura 4**. A redução da expressão do Pg93 observadas em *A. fluviatilis* infectado com *P. gallinaceum* no terceiro e quinto

dias é consistente com o apresentado por Lacrue *et al.*, (2005), onde eles mostraram essa redução desde o terceiro até o sexto dia. Sabe-se que após a invasão do epitélio intestinal, grande parte dos oocinetos são lisados ou então sofrem o processo de melanização diminuindo consideravelmente o número de parasitos (Baton e Ranford-cartwright, 2005; Collins *et al.*, 1986; Vernick *et al.*, 1995). Assim essa redução pode ser explicada devido a este fato.

Utilizou-se como controle, iniciadores para amplificação do gene constitutivo, que codifica a proteína ribossomal, RP49 do mosquito *Aedes aegypti* (Gentile *et al.*, 2005) (**Figura 6A**). Para este gene observou-se a presença de mRNA em todas as amostras de cDNA de intestinos, tanto para *A. aquasalis* quanto para *A. fluviatilis*, pela amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 220pb.

Como controle negativo foram utilizadas amostras de cDNAs de intestinos de mosquitos *A. aquasalis* e *A. fluviatilis* infectados com *P. gallinaceum* nos mesmos tempos acima mas, sendo que a enzima transcriptase reversa não foi adicionada, para descartar a possibilidade de contaminação com DNA genômico (**Figura 6C**).

Os resultados mostrados aqui para Pg93, RP49 e controle negativo foram semelhantemente observados em todos os nove experimentos de infecção realizados.

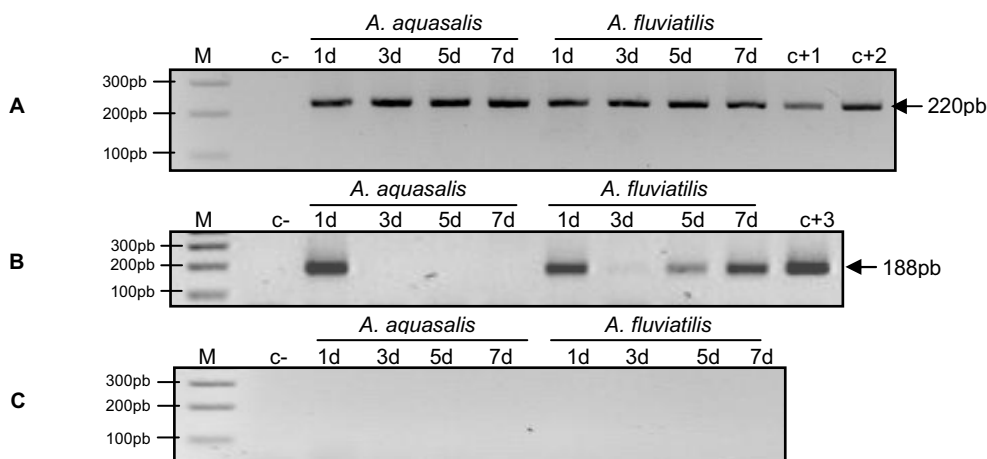


Figura 6: Expressão de RNA mensageiro de genes do mosquito e do parasito após a infecção com *P. gallinaceum*. Amostras de RNA total de mosquitos *A. aquasalis* e *A. fluviatilis*, 1, 3, 5 e 7 dias após a infecção com *P. gallinaceum*, foram submetidas à RT-PCR utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene constitutivo de mosquito, RP49 (A) e do gene Pg93 de *P. gallinaceum* (B), além de um controle sem a adição da enzima transcriptase reversa (C). M: marcador de DNA 1kbplus; c-: ausência de cDNA; c+1: cDNA de *A. aquasalis* alimentado com sangue não infectado; c+2: cDNA de *A. fluviatilis* alimentado com sangue não infectado; c+3: DNA genômico de *P. gallinaceum*.

5.3 Infecção através da injeção dos oocinetos nos mosquitos

Os experimentos de injeção de oocinetos de *P. gallinaceum* obtidos em cultura foram realizados para verificar se a refratariedade de *A. aquasalis* era devido a algum fator presente no intestino. Nesse caso tentou-se excluir o fator intestino, injetando os oocinetos diretamente na hemolinfa dos mosquitos. Foram realizados oito experimentos de injeção de oocinetos, porém apenas três foram aproveitados uma vez que a mortalidade dos *A. aquasalis* era muito alta. Eram injetados cerca de 120 mosquitos e após o primeiro dia restaram apenas 20 a 30 mosquitos que não sobreviviam até o sétimo dia para a procura por oocistos. Dos três experimentos aproveitados, a sobrevivência dos anofelinos foi um pouco maior, sendo cerca de 50% dos mosquitos injetados enquanto os *A. fluviatilis* tinham uma sobrevivência de aproximadamente 90% em todos os experimentos realizados.

Procurou-se observar a presença de oocistos nos intestinos 7 a 8 dias após a injeção nos mosquitos. Porém não foi possível a visualização dos mesmos em nenhuma das duas espécies injetadas, nos três experimentos realizados. Os oocinetos são injetados na hemolinfa e os mesmos podem se

aderir a vários tecidos dos mosquitos como o corpo gorduroso, intestino e glândula salivar (Schneider e Shahabuddin, 2000). Talvez neste trabalho, a metodologia para visualização dos oocistos utilizada não tenha sido satisfatória, uma vez que Schneider e Shahabuddin, (2000) utilizaram imunofluorescência de intestinos fixados corados com DAPI (4'6'-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato) para a observação dos oocistos de *P. gallinaceum* em *Drosophila*. Talvez nesse caso, os oocistos estivessem junto ao corpo gorduroso dos mosquitos o que dificulta a sua visualização por dissecação e detecção através de microscópio em montagem simples (tecido sobre lâmina).

Mesmo sem conseguir visualizar os oocistos de *P. gallinaceum* em ambas as espécies de mosquitos continuou-se com os experimentos para o isolamento de esporozoítos. Foi possível observar a presença de esporozoítos em *A. fluviatilis*, porém em *A. aquasalis* não foi encontrado nenhum parasito 15 dias após a injeção dos oocinetos de *P. gallinaceum*.

Além disso, para confirmar a viabilidade desses esporozoítos, foram realizadas tentativas de infectar aves sadias através da picada das fêmeas de mosquitos injetados com oocinetos, 15 dias após a injeção de oocinetos. A parasitemia das aves picadas foi acompanhada por 15 dias, porém não foi possível observar formas assexuais do parasito em aves picadas por *A. aquasalis*. Já em *A. fluviatilis* a parasitemia das aves começou a ocorrer a partir do quinto dia e foram observadas todas as formas assexuais do *Plasmodium* em lâminas coradas com Giemsa (**Figura 7; Tabela 3**).

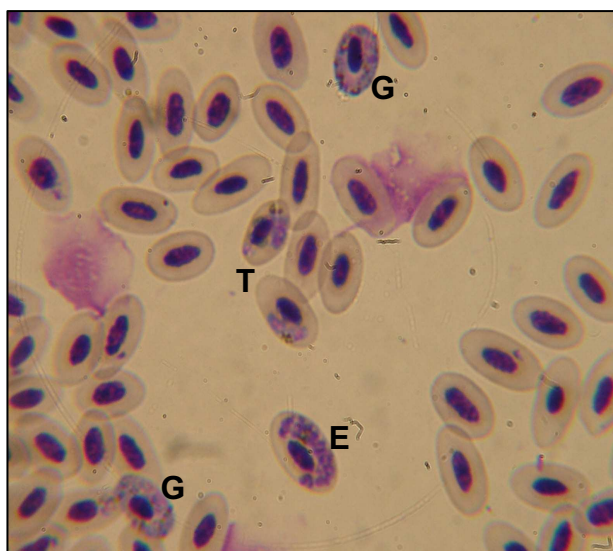


Figura 7: Positividade de aves após infecção com cultura de oocinetos. Formas assexuais de *P. gallinaceum*. Mosquitos *A. aquasalis* e *A. fluviatilis* foram injetados com oocinetos provenientes de cultura e após 15 dias os mosquitos foram alimentados em aves sadias com o intuito de infectá-las. Somente aves picadas com *A. fluviatilis* se tornaram positivas de acordo com a figura acima. Esfregaço de sangue de ave infectada com *P. gallinaceum*, corado com Giemsa. Aumento de 1000x. **G**: gametócito; **E**: esquizonte; **T**: trofozoítos

Tabela 3: Acompanhamento da parasitemia das aves que foram picadas por fêmeas de *A. aquasalis* e *A. fluviatilis* injetadas com *P. gallinaceum*.

Exp. ^a	Espécies	Parasitemia das aves										
		3d	4d	5d	6d	7d	10d	11d	12d	13d	14d	15d
1	<i>A. aquasalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>A. fluviatilis</i>	0	0	0	0	0,3%	10,2%	28,3%	49,7%	76,9%	†	†
2	<i>A. aquasalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>A. fluviatilis</i>	0	0	0,6%	1,9%	3,3%	27,1%	42,5%	†	†	†	†
3	<i>A. aquasalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>A. fluviatilis</i>	0	0	0	0,8%	2%	20,6%	34,8%	57,1%	†	†	†

† Morte da ave

^a Experimentos

Schneider e Shahabuddin (2000) demonstraram que as aves picadas por *A. aegypti* injetado com cultivo de oocineto começaram a apresentar as formas assexuais a partir do sétimo dia da picada, corroborando com o resultado encontrado para *A. fluviatilis* neste trabalho. Entretanto as aves injetadas com esporozoítos provenientes de *Drosophila*, não se positivaram de imediato, sendo necessárias uma ou duas passagens sanguíneas para

conseguirem detectar as formas assexuais. Eles sugeriram que o parasito se encontrava em níveis abaixo do limite de detecção. Da mesma maneira, foram realizadas até duas passagens sanguíneas nas aves picadas por *A. aquasalis* seguido de acompanhamento da parasitemia das mesmas, entretanto as formas assexuais do parasito não foram observadas nestas aves. Isto sugere que existem outros fatores contribuindo para a refratariedade de *A. aquasalis* ao *P. gallinaceum* além das barreiras presentes no intestino.

5.4 Quantificação relativa de TEP1

Na tentativa de identificar fatores relacionados à imunidade do mosquito ao parasito, resolvemos trabalhar com o gene TEP1 que tem sido o mais estudado, e de grande importância, nos processos que envolvem a interação parasito-hospedeiro invertebrado (Blandin *et al.*, 2004; Levashina *et al.*, 2001). Já foi descrito que o silenciamento de TEP1 em mosquitos aumentou o número de oocistos de *P. berghei* e de *P. falciparum* sugerindo uma função de proteção para o mosquito (Blandin *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006).

Para avaliar a expressão de TEP1 nas amostras de cDNA de *A. aquasalis* infectados ou não com *P. gallinaceum* inicialmente realizou-se uma análise semi-quantitativa através de um RT-PCR. A sequência parcial do gene TEP1 de *A. aquasalis* foi obtida através da utilização de iniciadores degenerados desenhados a partir de seqüências ortólogas desse gene em *A. gambiae* e *A. aegypti* (Oliveira, 2009). A obtenção dessa sequência possibilitou o desenho de iniciadores para TEP1 de *A. aquasalis*.

Observou-se a presença de um fragmento de 161 pares de base correspondente ao gene estudado, além de uma maior expressão de TEP1 em mosquitos infectados quando comparados com não infectados (**Figura 8B**). Como controle da reação, utilizamos os iniciadores para amplificação do gene constitutivo, RP49, no qual não foi observada diferença de expressão entre os mosquitos infectados e não infectados (**Figura 8A**). O controle negativo utilizado foi de amostras de cDNAs de *A. aquasalis* infectados ou não com o parasito sem a adição da enzima transcriptase reversa (**Figura 8C**). Estes

resultados foram consistentes para três *pools* de amostras de diferentes infecções.

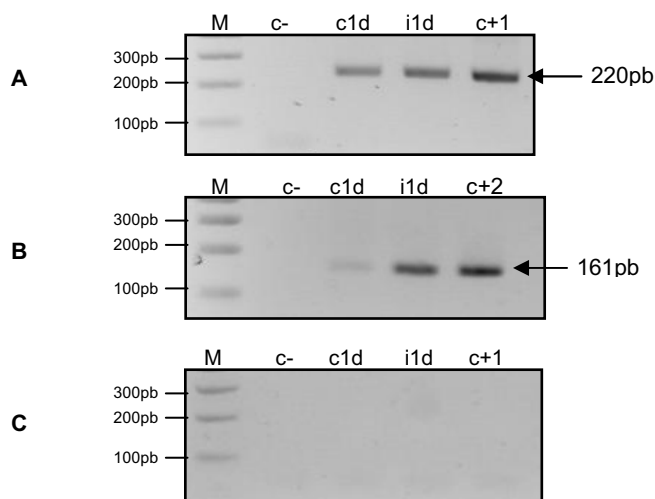


Figura 8: Análise da expressão de RNA mensageiro do gene TEP1 após infecção com *P. gallinaceum*. Amostras de RNA total de mosquitos *A. aquasalis* 1 dia após a infecção com *P. gallinaceum*, foram submetidas à RT-PCR utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene constitutivo de mosquito, RP49 (A) e do gene TEP1 (B), além de um controle sem a adição da enzima transcriptase reversa (C). M: marcador de DNA 1kbplus; c-: ausência de DNA; c1d: cDNA de *A. aquasalis* 1 dia após alimentação com sangue não infectado; i1d: cDNA de *A. aquasalis* 1 dia após alimentação com sangue infectado; c+1: cDNA de *A. aquasalis* alimentado com sangue não infectado; c+2: DNA genômico de *A. aquasalis*.

Com o objetivo de quantificar essa diferença observada na expressão de TEP1 entre mosquitos infectados e não infectados foi realizado um PCR em tempo real com essas amostras. Construiu-se uma curva padrão com a amostra de mosquito não infectado tanto para o gene endógeno (RP49) quanto para o gene alvo (TEP1) para estimar a eficiência dos iniciadores. A curva do gene endógeno apresentou uma inclinação (*slope*) de -3,445 que levou a uma eficiência de 95% enquanto o gene alvo apresentou uma eficiência de 65% (Tabela 4). Devido à diferença encontrada nas eficiências dos iniciadores, os cálculos para a quantificação relativa foram realizados de acordo com Muller *et al.*, (2002).

Tabela 4: Eficiência dos iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real.

Iniciadores	<i>Slope</i>	R ²	Eficiência
RP49	-3,445	0,992	95%
TEP1	-4,552	0,9811	65%

Os resultados obtidos nesta quantificação encontram-se representados na **Tabela 5** aonde podem se observar os valores de C_T de cada amostra tanto para o gene alvo quanto para o endógeno. A partir desses valores calcula-se a média da expressão normalizada assim como o seu erro padrão. Em seguida divide-se o valor obtido para o mosquito infectado pelo valor do não infectado para determinar quantas vezes o gene alvo é expresso. Os resultados dos três experimentos em conjunto podem ser observados na **Figura 9**. Os resultados, aqui apresentados, mostram que TEP1 é 3,4x mais expressa em mosquitos infectados em relação aos não infectados, porém essa diferença não foi significativa para o *teste-T* utilizado, apresentando um valor de P=0.092. A ausência de significância pode ser devido à alta variação observada no grupo de mosquitos infectados. Talvez, com um número maior de amostras seria possível obter resultados significativos, o que nos daria um melhor suporte estatístico à quantificação relativa.

Tabela 5: Quantificação relativa da expressão de TEP1 em mosquitos *A. aquasalis* infectados e não-infectados através de PCR em tempo real.

Experimento	Amostras	C _T TEP1	C _T RP49	Média da expressão normalizada	Erro padrão da expressão normalizada
1	Mosquito controle	29,9831	16,1266	0,01	0,002
		30,5711	16,0791		
		31,1591	16,0317		
	Mosquito infectado	28,1118	16,267	0,03	0,005
		29,0218	16,2253		
		29,2878	16,1721		
2	Mosquito controle	34,1217	19,8953	0,02	0,003
		35,0373	19,912		
		34,0984	19,8944		
	Mosquito infectado	29,1199	16,392	0,03	0,001
		29,1338	16,4088		
		29,3373	16,3345		
3	Mosquito controle	35,5821	20,4432	0,01	0,002
		36,8953	20,5441		
		36,5055	20,553		
	Mosquito infectado	27,1234	16,6264	0,09	0,003
		27,2099	16,6483		
		27,0208	16,7083		

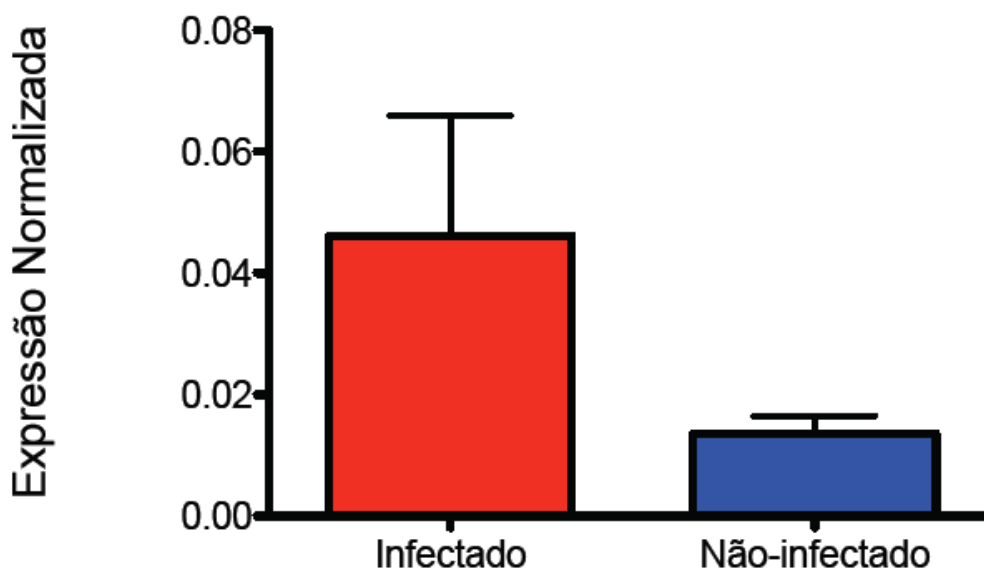


Figura 9: Expressão de TEP1 em *A. aquasalis* infectados com *P. gallinaceum* e em *A. aquasalis* não infectados. Três *pools* de amostras de diferentes infecções contendo carcaças e abdomens de dez mosquitos não infectados e infectados com o *P. gallinaceum* foram submetidos à PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene constitutivo de mosquito, RP49 e do gene TEP1. A normalização ocorreu pela expressão do controle endógeno RP49. $P=0.092$ de acordo com o teste-T de *student* utilizado. Barras mostram erro padrão da média.

Estes resultados sugerem que a expressão de TEP1 esteja envolvida na resposta imune do *A. aquasalis* ao *P. gallinaceum* sendo um possível candidato a refratariedade observada nesse mosquito. Em *A. gambiae*, TEP1 é secretada constitutivamente pelos hemócitos e é encontrada na hemolinfa (Levashina *et al.*, 2001). Esses hemócitos são encontrados em grandes quantidades no corpo gorduroso dos mosquitos que são considerados um importante órgão na resposta imune por serem os responsáveis pela síntese de peptídeos antimicrobianos (Levashina, 2004). Devido ao exposto, para a detecção de TEP1 em nossos experimentos, utilizamos as carcaças e abdomens dos mosquitos ao invés de utilizar somente o intestino.

Quando os mosquitos sofrem algum dano em seus tecidos como a presença de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas no intestino, ocorre um aumento na transcrição do gene TEP1 que será clivada e sua região carboxi-terminal irá se ligar à superfície dessas bactérias e promover a fagocitose (Blandin *et al.*, 2008; Volohonsky *et al.*, 2009). O silenciamento de TEP1 nos mosquitos impediu a fagocitose de *Escherichia coli* e de

Staphylococcus aureus (Moita *et al.*, 2005). Essa molécula também atua quando os mosquitos estão infectados com *Plasmodium*. Ela se liga a superfície do oocineto levando a lise do parasito (Levashina *et al.*, 2001). Esse aumento na transcrição de TEP1 quando os mosquitos sofrem algum dano, foi observado em nossos experimentos sugerindo a participação desta molécula na refratariedade de *A. aquasalis* frente ao *P. gallinaceum*.

A atuação do sistema imune do mosquito limitando a infecção do parasito é definida como compatibilidade. Um exemplo dessa definição são as combinações *P. yoelli* e *A. stephensi* e *P. falciparum* e *A. gambiae* utilizadas por Jaramilo-Gutierrez *et al.*, (2009). Essas duas combinações são consideradas altamente compatíveis, uma vez que o silenciamento de genes envolvidos no sistema imune, dentre eles TEP1, não apresentou nenhum efeito significativo no parasito. Por outro lado, em combinações menos compatíveis, foram obtidas mudanças significativas na infecção quando os genes de imunidade foram silenciados. Um amplo grau de variação da compatibilidade foi encontrado nos diferentes modelos estudados nesse trabalho, sugerindo que esse conceito novo deve ser levado em conta na utilização do modelo experimental a ser utilizado.

Para avaliar essa compatibilidade no modelo deste trabalho, deveria inicialmente realizar o silenciamento de TEP1 para confirmar a atuação dessa molécula na determinação da capacidade vetorial do *A. aquasalis* em relação ao *P. gallinaceum*. Caso o TEP1 não seja o fator majoritário na refratariedade, outros genes envolvidos no sistema imune poderão ser testados bem como outros fatores como, por exemplo, a influência da matriz peritrófica dos anofelinos no desenvolvimento do parasito.

6. CONCLUSÃO

O estudo da competência vetorial de mosquitos anofelinos assim como da sua compatibilidade são de extrema importância para o desenvolvimento de um modelo experimental que permita o desenvolvimento do parasito nos mosquitos. Neste contexto, este trabalho possibilitou estudos iniciais mostrando a incapacidade do *P. gallinaceum* de infectar o *A. aquasalis*, independente da via de infecção, pela alimentação sanguínea ou pela injeção de oocinetos cultivados. Fatores genéticos como os genes da resposta imune do mosquito influenciam na determinação dessa refratariedade ao *P. gallinaceum*. A diferença na expressão de TEP1 entre mosquitos infectados e não infectados não foi significativa, porém com os resultados obtidos acredita-se que este gene, assim como outros envolvidos na resposta imune, esteja atuando no controle do parasito no *A. aquasalis*. Vale ressaltar que a capacidade do parasito de se desenvolver no seu vetor não está associada somente a um dos fatores e sim à atuação, em conjunto, de diversos fatores como as barreiras físicas, químicas e aos fatores genéticos.

Portanto, este trabalho apresentou estudos da interação parasito-vetor invertebrado com ênfase em possíveis barreiras impostas pelo mosquito, sendo um passo inicial para o desenvolvimento de um modelo experimental envolvendo anofelinos brasileiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham E.G., Pinto S.B., Ghosh A., Vanlandingham D.L., Budd A., Higgs S., Kafatos F.C., Jacobs-Lorena M., Michel K. (2005). An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 102: 16327-16332.

Alavi Y., Arai M., Mendoza J., Tufet-Bayona M., Sinha R., Fowler K., Billker O., Franke-Fayard B., Janse C.J., Waters A., Sinden R.E. (2003). 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*. *Int J Parasitol.*, 33(9): 933-43.

Arai M., Billker O., Morris H.R., Panico M., Delcroix M., Dixon D., Ley S.V., Sinden R.E. (2001). Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of *Plasmodium* in the midgut of the mosquito. *Mol Biochem Parasitol.*, 116(1): 17-24.

Baton L.A., Ranford-cartwright L.C. (2004). *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. *Parasitology.*, 129: 663–676.

Baton L.A., Ranford-cartwright L.C. (2005). Spreading the seeds of million murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. *Trends in Parasitology.*, 21:12.

Baxter R.H., Chang C.I., Chelliah Y., Blandin S., Levashina E.A., Deisenhofer, J. (2007). Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein TEP1. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 104: 11615-11620.

Beier M.S., Pumpuni C.B., Beier J.C., Davis J.R. (1994). Effects of para-aminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.*, 31(4): 561-5.

Bhattacharyya M. K., Kumar N. (2001). Effect of xanthurenic acid on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles stephensi*. *Int J Parasitol.*, 31(10): 1129-33.

Billker O., Lindo V., Panico M., Etienne A.E, Paxton T., Dell A., Rogers M., Sinden R.E., Morris H.R. (1998) Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature.*, 392(6673): 289-92.

Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V. (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell.*, 117: 503–514.

Blandin S., Shiao S.H., Moita L.F., Janse C.J., Waters A.P., Kafatos F.C., Levashina E.A. (2004). Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell.*, 116: 661–670.

Blandin S.A., Marois E., Levashina E.A. (2008). Antimalarial responses in *Anopheles gambiae*: from a complement-like protein to a complement-like pathway. *Cell Host Microbe.*, 3(6): 364-74.

Blandin S.A., Wang-Sattler R., Lamacchia M., Gagneur J., Lycett G., Ning Y., Levashina E.A., Steinmetz L.M.(2009). Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in *Anopheles gambiae*. *Science.*, 326 (5949): 147-50.

Cantrell W., Jordan H.B. (1949). Relative susceptibility of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes canadensis* and *Anopheles quadrimaculatus* to *Plasmodium gallinaceum*. *J Infect Dis.*, 85(2): 170-2.

Carvalho L.H., Ferrari W.M., Kretzli A.U. (1992). A method for screening drugs against the liver stages of malaria using *Plasmodium gallinaceum* and *Aedes* mosquitos. *Braz J Med Biol Res.*, 25(3): 247-55.

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. von, Xu J., Zheng L., Bork P., Kafatos F. C. (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science.*, 298: 159-165.

Coatney G.R, Collins W.E, Warren McW, Contacos P.G. (1971). The Primate Malaria. illustrated. U. S. Government Printing Office, Washington, D. C. 366p.

Collins F.H., Sakai R.K., Vernick K.D., Paskewitz S., Seeley D.C., Miller L.H., Collins W.E., Campbell C.C., Gwadz R.W. (1986). Genetic selection of a *Plasmodium*-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science.*, 234: 607–610.

Consoli R.A.G.B, Oliveira R.L. (1998). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ, 228p.

Cox, F.E.G., (1988). Major animal models in malaria research: rodent. In: Wernsdorfe, W.H. and McGregor, I. Editors, 1988. *Malaria: Principles and Practice of Malariology* vol. 2 Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 1503–1543.

Cox-Singh J., Singh B. (2008). Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol.*, 24(9): 406-410.

Deane L.M. (1986). Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 81(II): 5-14.

- Deane L.M. (1989). A Cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 84(IV): 149-56.
- Dinglasan R.R., Jacobs-Lorena M. (2008). Flipping the paradigm on malaria transmission-blocking vaccines. *Trends Parasitol.*, 24(8): 364-70.
- Dong Y., Aguilar R., Xi Z., Warr E., Mongin E., Dimopoulos G. (2006). *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog.*, 2(6): 513-525.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. (2009). Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.*, 5(5):e1000423.
- Dubremetz F., Garcia-Reguet N., Conseil V., Fourmaux M.N. (1998). Apical organelles and host cell invasion by Apicomplexa. *Int. J Parasitol.*, 17: 1007-1013.
- Escalante A.A, Ayala F.J. (1994). Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 91(24): 11373-7.
- Eyles D.E. (1951). Studies on *Plasmodium gallinaceum*. I. Characteristics of the infection in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Am J Hyg.*, 54(1): 101-12.
- Eyles D.E. (1952). Studies on *Plasmodium gallinaceum*. IV. A comparison of the susceptibility of *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus* and *Anopheles freeborni*. *Am J Hyg.*, 56(1): 71-7.
- Feldmann A.M., Billingsley P.F., Savelkoul E. (1990). Bloodmeal digestion by strains of *Anopheles stephensi* liston (Diptera: Culicidae) of differing susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Parasitology.*, 101(2): 193-200.
- Ferreira M.A.P. (2002). *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* Curry, 1932: Uma análise morfológica do intestino médio antes e após a infecção com *Plasmodium (Plasmodium) vivax* Grassi & Felletti, 1890. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte. 110 p.
- Fraiture M., Baxter R.H., Steinert S., Chelliah Y., Frolet C., Quispe-Tintaya W, Hoffmann J., Blandin S., Levashina E. (2009). Two mosquito LRR proteins function as complement control factors in the TEP1-mediated killing of *Plasmodium*. *Cell Host Microbe.*, 5: 273-284.
- Frolet C., Thoma M., Blandin S., Hoffmann J.A., Levashina E.A. (2006) Boosting NFKappaB- dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts development of *Plasmodium berghei*. *Immunity.*, 25: 677-685.
- Garnham P.C.C. (1966). Malaria parasites and other haemosporidia. University of London. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1114 p.

Garver L.S., Dong Y., Dimopoulos G. (2009). Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. *PLoS Pathog.*, 5:(3): e1000335.

Gass R.F., Yeates R.A. (1979). In vitro damage of cultured ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* by digestive proteinases from susceptible *Aedes aegypti*. *Acta Trop.*, 36(3): 243-52.

Gentile C., Lima J.B., Peixoto A.A. (2005) Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 100(6): 545-54.

Greenwood B.M., Fidock D.A., Kyle D.E., Kappe S.H.I., Alonso P.L., Collins F.H., Duffy P.E. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest.*, 118: 1266-1276.

Grillet M.E. (2000). Factors associated with distribution of *Anopheles aquasalis* and *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae) in a malarious area, northeastern Venezuela. *J Med Entomol.*, 37(2): 231-8.

Grotendorst C.A., Carter R., Rosenberg R., Koontz L.C. (1986). Complement effects on the infectivity of *Plasmodium gallinaceum* to *Aedes aegypti* mosquitoes. I. Resistance of zygotes to the alternative pathway of complement. *J Immunol.*, 136(11): 4270-4.

Gupta L, Kumar S, Han Y.S, Pimenta P.F, Barillas-Mury C. (2005). Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 102(11): 4010-5.

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

Gwadz R, Collins F.H. (1996). Anopheline mosquitoes and the agents they transmit. *In: Beaty, B. J., Marquardt, W.C. The biology of disease vectors.* Ed. University Press of Colorado, 73-84.

Habtewold T., Povelones M., Blagborough A.M., Christophides G.K. (2008). Transmission blocking immunity in the malaria non-vector mosquito *Anopheles quadriannulatus* species A. *PLoS Pathog.*, 4(5):e1000070.

Hall N., Karras M., Raine J.D., Carlton J.M., Kooij T.W., Berriman M., Florens L., Janssen C.S., Pain A., Christophides G.K., James K., Rutherford K., Harris B., Harris D., Churcher C., Quail M.A., Ormond D., Doggett J., Trueman H.E., Mendoza J., Bidwell S.L., Rajandream M.A., Carucci D.J., Yates J.R. 3rd., Kafatos F.C., Janse C.J., Barrell B., Turner C.M., Waters A.P., Sinden R.E. (2005). A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science*, 307(5706): 82-6.

Han Y.S., Thompson J., Kafatos F.C., Barillas-mury C. (2000). Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO J*, 19(22): 6030-40.

Hartl D.L. (2004). The origin of malaria: mixed messages from genetic diversity. *Nat Rev Microbiol.*, 2(1): 15–22.

Hillyer J.F., Barreau C., Vernick K.D. (2007) Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *Int J Parasitol.*, 37: 673–681.

Holt R.A., Subramanian G.M., Halpern A., Sutton G.G., Charlab R., Nusskern D.R., Wincker P., Clark A.G., Ribeiro J.M., Wides R., Salzberg S.L., Loftus B., Yandell M., Majoros W.H., Rusch D.B., Lai Z., Kraft C.L., Abril J.F., Anthouard V., Arensburger P., Atkinson P.W., Baden H., de Berardinis V., Baldwin D., Benes V., Biedler J., Blass C., Bolanos R., Boscus D., Barnstead M., Cai S., Center A., Chaturverdi K., Christophides G.K., Chrystal M.A., Clamp M., Cravchik A., Curwen V., Dana A., Delcher A., Dew I., Evans C.A., Flanigan M., Grundschober-Freimoser A., Friedli L., Gu Z., Guan P., Guigo R., Hillenmeyer M.E., Hladun S.L., Hogan J.R., Hong Y.S., Hoover J., Jaillon O., Ke Z., Kodira C., Kokoza E., Koutsos A., Letunic I., Levitsky A., Liang Y., Lin J.J., Lobo N.F., Lopez J.R., Malek J.A., McIntosh T.C., Meister S., Miller J., Mobarry C., Mongin E., Murphy S.D., O'Brochta D.A., Pfannkoch C., Qi R., Regier M.A., Remington K., Shao H., Sharakhova M.V., Sitter C.D., Shetty J., Smith T.J., Strong R., Sun J., Thomasova D., Ton L.Q., Topalis P., Tu Z., Unger M.F., Walenz B., Wang A., Wang J., Wang M., Wang X., Woodford K.J., Wortman J.R., Wu M., Yao A., Zdobnov E.M., Zhang H., Zhao Q., Zhao S., Zhu S.C., Zhimulev I., Coluzzi M., della Torre A., Roth C.W., Louis C., Kalush F., Mural R.J., Myers E.W., Adams M.D., Smith H.O., Broder S, Gardner M.J., Fraser C.M., Birney E., Bork P., Brey P.T., Venter J.C., Weissenbach J., Kafatos F.C., Collins F.H., Hoffman S.L. (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 298: 129–149.

Huber M., Cabib E. (1991). Miller L.H. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 88(7):2807-10.

Huff C.G. (1965). Susceptibility of mosquitoes to avian malaria. *Exp Parasitol.*, 16: 107-32.

Jaramillo-Gutierrez G., Rodrigues J., Ndikuyeze G., Povelones M., Molina-Cruz A., Barillas-Mury C. (2009). Mosquito immune responses and compatibility between *Plasmodium* parasites and anopheline mosquitoes. *BMC Microbiol.*, 9:154.

Jongwutiwes S., Putaporntip C., Iwasaki T., Sata T., Kanbara H. (2008). Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg Infect Dis.*, 10(12): 2211-213.

Kaslow D.C. (1993). Transmission-blocking immunity against malaria and other vector-borne diseases. *Curr Opin Immunol.*, 5(4): 557-65.

Kaushal D.C, Carter R., Howard R.J, McAuliffe F.M. (1983). Characterization of antigens on mosquito midgut stages of *Plasmodium gallinaceum*. I. Zygote surface antigens. *Mol Biochem Parasitol.*, 8(1): 53-69.

Lacrué A.N., James A.A., Beerntsen B.T. (2005). The novel *Plasmodium gallinaceum* sporozoite protein, Pg93, is preferentially expressed in the nucleus of oocyst sporozoites. *Am J Trop Med Hyg.*, 73(3): 634-43.

Laubach H.E., Validum L., Bonilla J.A., Agar A., Cummings R., Mitchell C., Cuadrado R.R., Palmer C.J. (2001). Identification of *Anopheles aquasalis* as a possible vector of malaria in Guyana, South America. *West Indian Med J.*, 50(4): 319-21.

Lehane M.J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol.*, 42: 29-37.

Lehr M.A., Kilpatrick C.W., Wilkerson R.C., Conn, J.E. (2005) Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: Incongruence between Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. *Ann Entomol Soc Am.*, 98(6): 908-917.

Levashina E. A. (2004). Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol.*, 34: 673-678.

Levashina E.A., Moita L.F., Blandin S., Vriend G., Lagueux M., Kafatos F.C. (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell.*, 104: 709–718.

Li C., Wilkerson R.C. (2005). Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 100(5): 495-500.

Loaiza J.R., Bermingham E., Scott M.E., Rovira J.R., Conn J.E. (2008). Species composition and distribution of adult *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Panama. *J Med Entomol.*, 45(5): 841-51.

Marques A., Pinheiro E., De Souza A. (1986). Dispersion of cases of malaria in Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop.*, 38: 51-75.

McCutchan T.F., Kissinger J.C., Touray M.G., Rogers M.J., Li J., Sullivan M., Braga E.M., Krettli A.U., Miller L.H. (1996). Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: biological and phylogenetic implications. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 93(21): 11889-94.

Meis J.F., Wismans P.G., Jap P.H., Lensen A.H., Ponnudurai T. (1992). A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Acta Trop.*, 50: 227-36.

Meister S., Kanzok S.M., Zheng X.L., Luna C., Li T.R., Hoa N.T., Clayton J.R., White K.P., Kafatos F.C., Christophides G.K., Zheng L. (2005) Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 102: 11420-11425.

Meneguzzi V.C., dos Santos C.B., Pinto Ide S., Feitoza L.R., Feitoza H.N., Falqueto A. (2009). Use of geoprocessing to define malaria risk areas and evaluation of the vectorial importance of anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 104(4): 570-5.

Menge D.M., Zhong D., Guda T., Gouagna L., Githure J., Beier J., Yan G. (2006). Quantitative trait loci controlling refractoriness to *Plasmodium falciparum* in natural *Anopheles gambiae* mosquitoes from a malaria-endemic region in western Kenya. *Genetics.*, 173: 235–241.

Michel K., Budd A., Pinto S., Gibson T.J., Kafatos F.C. (2005) *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep.*, 6: 891-897.

Michel K., Kafatos F.C. (2005). Mosquito immunity against *Plasmodium*. *Insect Biochem Mol Biol.*, 35: 677-689.

Moita L.F., Wang-Sattler R., Michel K., Zimmermann T., Blandin S., Levashina E.A., Kafatos F.C. (2005). In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. *Immunity.*, 23(1): 65-73.

Motoki M.T., Wilkerson R.C., Sallum M.A. (2009). The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 104(6): 823-50.

Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques.*, 32(6): 1372-4, 1376, 1378-9.

Niaré O., Markianos K., Volz J., Oduol F., Touré A., Bagayoko M., Sangaré D., Traoré S.F., Wang R., Blass C., Dolo G., Bouaré M., Kafatos F.C., Kruglyak L., Touré Y.T., Vernick K.D. (2002). Genetic loci affecting resistance to human malaria parasites in a West African mosquito vector population. *Science*, 298(5591): 213-6.

Niles W.J., Fernando M.A., Dissanaïke A.S. (1965). *Mansonia crassipes* as the natural vector of filarioids, *Plasmodium gallinaceum* and other plasmodia of fowls in ceylon. *Nature*, 205:411-2.

Oliveira S.B. (2009). Estudo de genes relacionados à resposta imune de vetores brasileiros de *Plasmodium vivax*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte. 80p.

Osta M.A., Christophides G.K., Kafatos F.C. (2004). Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science*, 303: 2030–2032.

Peters W, Ramkaran A.E. (1980). The chemotherapy of rodent malaria, XXXII. The influence of p-aminobenzoic acid on the transmission of *Plasmodium yoelii* and *P. berghei* by *Anopheles stephensi*. *Ann Trop Med Parasitol*, 74(3): 275-82.

Peters W. (1992). Peritrophic membranes. In Zoophysiology (Bradshaw D, Burggren W, Heller HC, Ishii S, Langer H, Neuweiller G, Randall DJ, eds.) V.130. Springer-Verlag, Berlin.

Poudel S.S., Newman R.A., Vaughan J.A. (2008). Rodent *Plasmodium*: population dynamics of early sporogony within *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Parasitol*, 94(5): 999-1008.

Povelones M., Waterhouse R.M., Kafatos F.C., Christophides G.K. (2009) Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against *Plasmodium* parasites. *Science*, 324: 258-261.

Rawlins S.C., Hinds A., Rawlins J.M. (2008). Malaria and its vectors in the Caribbean: the continuing challenge of the disease forty-five years after eradication from the Islands West Indian. *Med J*, 57(5): 462-9.

Rich S.M., Leendertz F.H., Xu G., LeBreton M., Djoko C.F., Aminake M.N., Takang E.E., Dikko J.L., Pike B.L., Rosenthal B.M., Formenty P., Boesch C., Ayala F.J., Wolfe N.D. (2009). The origin of malignant malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(35): 14902-7.

Riehle M.M., Markianos K., Niare O., Xu J., Li J., Toure A.M., Podiougou B., Oduol F., Diawara S., Diallo M., Coulibaly B., Ouataro A., Kruglyak L., Traore S.F., Vernick K.D. (2006). Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. *Science*, 312(5773): 577-579.

Riehle M. M., Xu J., Lazzaro B.P., Rottschaefer S.M., Coulibaly B., Sacko M., Niare O., Morlais I., Traore S. F., Vernick K. D. (2008) *Anopheles gambiae* APL1 is a family of variable LRR proteins required for Rel1-mediated protection from the malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *PLoS One.*, 3(11): e3672.

Rodrigues F.G., Santos M.N., de Carvalho T.X., Rocha B.C., Riehle M.A., Pimenta P.F., Abraham E.G., Jacobs-Lorena M., Alves de Brito C.F., Moreira L.A. (2008). Expression of a mutated phospholipase A2 in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development. *Insect Mol Biol.*, 17(2): 175-83.

Rosenberg R. (1985). Inability of *Plasmodium knowlesi* sporozoites to invade *Anopheles freeborni* salivary glands. *Am J Trop Med Hyg.*, 34(4): 687-91.

Rosenberg R., Rungsiwongse J. (1991). The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts, *Am J Trop Med Hyg.*, 45: 574–577.

Schneider D., Shahabuddin M. (2000). Malaria parasite development in a *Drosophila* model. *Science.*, 288(5475): 2376-9.

Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC. (1993). Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 90(9): 4266-70.

Shahabuddin M., Kaidoh T., Aikawa M., Kaslow D.C. (1995). *Plasmodium gallinaceum*: mosquito peritrophic matrix and the parasite-vector compatibility. *Exp Parasitol.*, 81(3): 386-93.

Shahabuddin M., Lemos F.J., Kaslow D.C., Jacobs-Lorena M. (1996). Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsins blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect Immun.*, 64(3): 739-43.

Shahabuddin M., Pimenta P.F. (1998). *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. *Proc Natl Acad Sci.*, 95(7): 3385-3389.

Shahabuddin M., Costero A. (2001). Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.*, 31(3): 231-40.

Silva A.N.M., dos Santos C.C.B., Lacerda R.N.L., Santa Rosa E.P., de Souza R.T.L., Galiza D., Sucupira I., Conn J.E., Póvoa M.M. (2006). Laboratory colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belém, Pará, Brazil. *J Med Entomol.*, 43: 107-109.

Sinden R.E. (1999). *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia.*, 41(1-3): 139-48.

Sinden R.E., Hartley R.H., Winger L. (1985). The development of *Plasmodium* ookinetes in vitro: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology.*, 91 (2): 227-44.

Sinden R.E., Billingsley P.F. (2001) Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol.*, 17(5): 209-12.

Sinden R.E., Alavi Y., Raine J.D. (2004). Mosquito--malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. *Insect Biochem Mol Biol.*, 34(7): 625-9.

Sturm A., Amino R., Van de Sand C., Regen T., Retzlaff S., Rennenberg A., Krueger A., Pollok J., Menard R., Heussler V. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.*, 313: 1287-1290.

SVS. (2007). Situação epidemiológica da Malária no Brasil. Ministério da Saúde do Brasil.

SVS. (2008). Situação epidemiológica da Malária no Brasil. Ministério da Saúde do Brasil.

Tadei W.P., Thatcher B.D. (2000). Malaria Vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the Subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop.*, 42(2): 87-94.

Tadei W.P., Thatcher B.D., Santos J.M., Scarpassa V.M., Rodrigues I.B., Rafael M.S. (1998). Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.*, 59(2): 325-335.

Táson de Camargo M.T., Krettli A.U. (1978). *Aedes fluviatilis* (Lutz) a new experimental host for *Plasmodium gallinaceum* brumpt. *J Parasitol.*, 64(5): 924-925.

Templeton T.J., Kaslow D.C. (1997). Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Biochem Parasitol.*, 84(1): 13-24.

Tsai Y-L., Hayward R. E., Langer R.C., Fidock D. A., Vinetz J. M. (2001). Disruption of *Plasmodium falciparum* Chitinase Markedly Impairs Parasite Invasion of Mosquito Midgut. *Infect Immun.*, 69(6): 4048-4054.

Van den Eede P., Van H.N., Overmeir C.V., Vythilingam I., Duc T.N., Hung L.X., Manh H.N., Anné J., D'Alessandro U., Erhart A. (2009). Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malar J.*, 8: 249.

Vargas L., Beltrán E. (1941). *Culex quinquefasciatus*, a new vector of *Plasmodium gallinaceum*. *Science.*, 94(2443): 389-390.

Vernick K. D., Fujioka H., Seeley D. C., Tandler B., Aikawa M., Miller L. H. (1995). *Plasmodium gallinaceum*: a refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol.*, 80: 583–595.

Villalon J.M., Ghosh A., Jacobs-Lorena M. (2003). The peritrophic matrix limits the rate of digestion in adult *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Insect Physiol.*, 49(10): 891-5.

Vinetz J.M., Valenzuela J.G., Specht C.A., Aravind L., Langer R.C., Ribeiro J.M., Kaslow D.C. (2000). Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut. *J Biol Chem.*, 275(14): 10331-41.

Vlachou D., Schlegelmilch T., Runn E., Mendes A., Kafatos F.C. (2006). The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev.*, 16(4): 384-91.

Volohonsky G., Steinert S., Levashina E.A. (2009). Focusing on complement in the antiparasitic defense of mosquitoes. *Trends Parasitol.*, 21.

Volz J., Osta, M. A., Kafatos F. C., Muller H. M. (2005). The Roles of Two Clip Domain Serine Proteases in Innate Immune Responses of the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem.*, 280: 40161-40168.

Waterhouse R.M., Kriventseva E.V., Meister S., Xi Z., Alvarez K.S., Bartholomay L.C., Barillas-Mury C., Bian G., Blandin S., Christensen B.M., Dong Y., Jiang H., Kanost M.R., Koutsos A.C., Levashina E.A., Li J., Ligoxygakis P., Maccallum R.M., Mayhew G.F., Mendes A., Michel K., Osta M.A., Paskewitz S., Shin S.W., Vlachou D., Wang L., Wei W., Zheng L., Zou Z., Severson D.W., Raikhel A.S., Kafatos F.C., Dimopoulos G., Zdobnov E.M., Christophides G.K. (2007). Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science.*, 316: 1738-1743.

WHO (2008). World Health Organization, World Malaria Report 2008. (ed. Who Press, W. H. O) Geneva.

Wilkerson R.C., Gaffigan T.V., Lima J.B. (1995). Identification of Species Related *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 90(6): 721-732.

Winstanley P., Ward S., Snow R., Brechenridge A. (2004). Therapy of falciparum malaria in sub-saharan Africa: from molecule to policy. *Clin Microbiol Rev.*, 17(3): 612–637.

Yassine H., Osta M.A. (2009). *Anopheles gambiae* innate immunity. *Cell Microbiol.* 5.

Zhang Y, Merali S, Meshnick SR. p-Aminobenzoic acid transport by normal and *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. (1992). *Mol Biochem Parasitol.*, 52(2): 185-94.

Zheng L., Cornel A.J., Wang R., Erfle H., Voss H., Ansorge W., Kafatos F.C., Collins F.H. (1997). Quantitative trait loci for refractoriness of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium cynomolgi* B. *Science.*, 276(5311): 425-8.

Zheng L., Wang S., Romans P., Zhao H., Luna C., Benedict M.Q. (2003). Quantitative trait loci in *Anopheles gambiae* controlling the encapsulation response against *Plasmodium cynomolgi* Ceylon. *BMC Genet.*, 4: 16.

Zieler H., Dvorak J.A. (2000). Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 97(21): 11516-21.

Zieler H., Garon C.F., Fischer E.R., Shahabuddin M. (2000). A tubular network associated with the brush-border surface of the *Aedes aegypti* midgut: implications for pathogen transmission by mosquitoes. *J Exp Biol.*, 203(10): 1599-611.

Zimmerman R.H. (1992). Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 87(3): 371-383.

ANEXOS

Durante os dois anos de mestrado, outras atividades foram desenvolvidas em colaboração com um grupo de pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz FIOCRUZ - Bahia e com um grupo da Universidade de Queensland - Brisbane, Austrália. Estes trabalhos resultaram em duas publicações que se encontram em anexo.

A participação no trabalho “Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon” envolveu a coleta e identificação de *Anopheles darlingi* em Manaus e a dissecação das glândulas salivares destes mosquitos.

No segundo trabalho, “A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*”, as infecções dos mosquitos com *Plasmodium gallinaceum* foram realizadas no Laboratório de Malária e minha participação se deu desde a criação dos mosquitos, na infecção das aves com o *Plasmodium* e na dissecação dos intestinos dos mosquitos infectados para contagem dos oocistos.

Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon

Bruno Bezerril Andrade^{1,2}, Bruno Coelho Rocha³, Antonio Reis-Filho^{1,2},
Luís Marcelo Aranha Camargo^{4,5}, Wanderli Pedro Tadei⁶,
Luciano Andrade Moreira³, Aldina Barral^{1,2,7} and Manoel Barral-Netto*^{1,2,7}

Address: ¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz FIOCRUZ – Bahia, Brazil, ²Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Brazil, ³Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ⁴Unidade Avançada de Pesquisa, Instituto de Ciências Biológicas V, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵Faculdade de Medicina, Faculdade São Lucas, Rondônia, Brazil, ⁶Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – Manaus, Amazonas, Brazil and ⁷Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Investigação em Imunologia (iii), Salvador, Bahia, Brazil

Email: Bruno Bezerril Andrade - bandrade@bahia.fiocruz.br; Bruno Coelho Rocha - brunosr@cpqrr.fiocruz.br; Antonio Reis-Filho - antonioreisf@gmail.com; Luís Marcelo Aranha Camargo - spider@icb5usp.med.br; Wanderli Pedro Tadei - tadei@inpa.gov.br; Luciano Andrade Moreira - luciano@cpqrr.fiocruz.br; Aldina Barral - abarral@bahia.fiocruz.br; Manoel Barral-Netto* - mbarral@bahia.fiocruz.br

* Corresponding author

Published: 5 June 2009

Received: 6 April 2009

Malaria Journal 2009, 8:121 doi:10.1186/1475-2875-8-121

Accepted: 5 June 2009

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/8/1/121>

© 2009 Andrade et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Despite governmental and private efforts on providing malaria control, this disease continues to be a major health threat. Thus, innovative strategies are needed to reduce disease burden. The malaria vectors, through the injection of saliva into the host skin, play important role on disease transmission and may influence malaria morbidity. This study describes the humoral immune response against *Anopheles (An.) darlingi* saliva in volunteers from the Brazilian Amazon and addresses the association between levels of specific antibodies and clinical presentation of *Plasmodium (P.) vivax* infection.

Methods: Adult volunteers from communities in the Rondônia State, Brazil, were screened in order to assess the presence of *P. vivax* infection by light microscopy and nested PCR. Non-infected volunteers and individuals with symptomatic or symptomless infection were randomly selected and plasma collected. *An. darlingi* salivary gland sonicates (SGS) were prepared and used to measure anti-saliva antibody levels. Plasma interleukin (IL)-10 and interferon (IFN)- γ levels were also estimated and correlated to anti-SGS levels.

Results: Individuals infected with *P. vivax* presented higher levels of anti-SGS than non-infected individuals and antibody levels could discriminate infection. Furthermore, anti-saliva antibody measurement was also useful to distinguish asymptomatic infection from non-infection, with a high likelihood ratio. Interestingly, individuals with asymptomatic parasitaemia presented higher titers of anti-SGS and lower IFN- γ /IL-10 ratio than symptomatic ones. In *P. vivax*-infected asymptomatic individuals, the IFN- γ /IL-10 ratio was inversely correlated to anti-SGS titers, although not for while in symptomatic volunteers.

Conclusion: The estimation of anti-*An. darlingi* antibody levels can indicate the probable *P. vivax* infection status and also could serve as a marker of disease severity in this region of Brazilian Amazon.

Background

Malaria continues to be one of the most serious public health problems worldwide, exacting a huge impact on human wellbeing, mainly in tropical and subtropical countries. A better understanding of the interactions between the host, the vector and the parasite could be valuable to indicate future strategies. In endemic regions, residents are frequently bitten by both uninfected and infected mosquitoes. There is also a progressive acquisition of immunity, leading to a decreased number of malaria clinical attacks related to increasing age and time residing in the endemic area [1,2]. Within the Brazilian Amazon, and mainly in riverine communities, the prevalence of asymptomatic malaria infection seems to be four to five times greater than the symptomatic infection [3-5]. Malaria clinical immunity has already been described in both *Plasmodium (P.) falciparum* [6] and *Plasmodium (P.) vivax* [7] infections and it seems to be related to higher titers of anti-*Plasmodium* antibodies [8]. On the other hand, anti-parasite response might not be the unique determinant of the occurrence of symptomless malaria, as asymptomatic patients maintain parasitaemia at low levels in addition to controlling the clinical symptoms [9]. Such asymptomatic carriers have developed just enough immunity to protect them from malarial illness but not from malarial infection. Regardless these facts, the specific mechanisms that underlie the occurrence of clinical immunity against the *Plasmodium* are not well understood.

In this scenario, the anopheline vector could play significant role in malaria clinical severity. Mosquito bites can induce immediate, delayed, and systemic hypersensitivity reactions in hosts [10]. Moreover, pre-exposure to the vector saliva may create an inhospitable environment for the establishment of the parasites transmitted by these insects. Mice repeatedly exposed to bites from uninfected *Anopheles (An.) stephensi* increase a pro-inflammatory T helper 1 biased response that limits *P. yoelii* infection [11]. In humans it has been shown that *An. gambiae* saliva is immunogenic for travelers transiently exposed to bites in African endemic areas [12], with the development of specific IgG and IgM antibodies. Specific anti-*An. gambiae* saliva IgG antibodies were also detected in young children from a seasonal malaria transmission region in Senegal, and antibody levels were higher in patients who developed clinical malaria episodes, suggesting that the estimation of humoral response to *Anopheles* salivary antigens can serve as potential marker for the risk of malaria [13]. Moreover, anti-*An. dirus* salivary protein antibodies occur predominantly in patients with acute *P. falciparum* or *P. vivax* malaria, whereas people from non-malarious areas do not carry such antibodies [14]. Little is known about anti-saliva humoral responses in other endemic areas, such as Latin America. In addition, the host response

against the most widespread malaria vector in America, *An. darlingi*, is poorly explored. The objective of the present work was to measure the anti-saliva IgG responses against *An. darlingi* mosquitoes in the Brazilian Amazon and to evaluate the association of antibody levels with different clinical presentations of *P. vivax* infections.

Methods

Study localities

A cross-sectional study investigating determinant factors for asymptomatic *P. vivax* malaria was performed during 2007 (June to August) in Buritis (10° 12' 43" S; 63° 49' 44" W), a recent urbanized municipality, and Demarcação (8° 10' 04.12" S; 62° 46' 52.33" W), a riverine community of the Rondônia State, in the south-western part of Brazilian Amazon. In general, Rondônia has a flat topography, with an average elevation of 300 m above sea level. The climate is tropical, with a long rainy season from January till May. It is argued that the environmental changes caused by deforestation have favored the main malaria vector in Brazil *An. darlingi* [15]. Within the regions studied here, the malaria transmission is unstable, with increased number of cases being detected annually between April to September, and the risk of infection is moderate to high [16], with an Annual Parasite Incidence of 77.5 per 1,000 inhabitants in 2005 [17]. In the Brazilian Amazon, *P. vivax* accounts for the majority of malaria cases, while *P. falciparum* infection prevalence is 23.7% [17]. In addition, infection with *P. malariae* achieves 10% in Rondônia [18].

Volunteers

Active and passive malaria case detections were performed in the two communities studied. A small laboratory with necessary facilities was built inside the main centers for malaria diagnosis in Buritis and Demarcação. These diagnostic centers are linked to the Brazilian National Foundation of Health (FUNASA), responsible for malaria control in the Brazilian Amazon. Active case detection was made by visiting residences in regions pointed by the local health authorities as major areas of disease transmission. The individuals were examined and interviewed by a trained physician, and blood samples were collected for serological experiments. The malaria diagnosis was performed using two methods. First, patients were screened by thick smear examination using field microscopy and the parasitaemia (parasites/ μ L) was calculated in positive cases. Further, nested PCR was performed in all whole blood samples to confirm the diagnosis (as described below). Two individuals presenting *P. malariae* infection and 16 persons infected with *P. falciparum* were identified and excluded from the study. Hence, all the volunteers selected were negative for *P. falciparum* and/or *P. malariae* infection by both microscopic examination and nested PCR. Other exclusion criteria were chronic alcoholism,

severe chronic degenerative disease as well as HIV, HBV and HCV infections. A total of 204 volunteers were used in the study. All the positive cases were followed up for 30 days for the evaluation of malaria symptoms. Individuals who were positive for *P. vivax* infection and remained without fever (axillary temperature $>37.8^{\circ}\text{C}$) and/or chills, sweats, strong headaches, myalgia, nausea, vomiting, jaundice, asthenia, and arthralgia for 30 days were considered asymptomatic, while in the presence of any listed symptom they were classified as symptomatic. The volunteers were stratified in three different groups according to the *P. vivax* malaria diagnosis and the clinical spectrum of the disease. Thus, 80 people were non-infected, 50 had asymptomatic infection and 74 were symptomatic. The baseline characteristics of the volunteers are listed in the Table 1. Three volunteers from asymptomatic infection group presented negative light microscopy exam, but *P. vivax* DNA was amplified by nested PCR (Table 1). This study was a part of the project approved by the Ethical Committee of the São Lucas University, Rondônia, Brazil, for the human subject protocol and is in compliance with the Helsinki Declaration. All participants gave written informed consent before entering the study.

Molecular malaria diagnosis

The molecular diagnosis of malaria infection was performed using the nested PCR technique, based on the Snounou protocols, with minimal alterations [19,20].

The target was the 18S rRNA gene, and genus- and species-specific primers were used in the assay. Briefly, 300 μL of whole blood collected on EDTA was prepared for DNA extraction through the phenol-chloroform method followed by precipitation with sodium acetate and ethanol. The first PCR rDNA amplification was performed with *Plasmodium* genus-specific primers named PLU5 and PLU6. Positive samples yielded a 1,200-bp fragment, which served as template for the nested reaction. The nested PCR amplification was performed with species-specific primers for 30 cycles at annealing temperatures of 58°C for *P. falciparum* (Fal1 and Fal2 primers), and 65°C for *P. vivax* (Viv1 and Viv2 primers) or *P. malariae* (Mal1 and Mal2 primers). The fragments obtained for *P. vivax* were of 120 bp, whereas for *P. falciparum* and *P. malariae* were 205 bp and 144 bp, respectively. The oligonucleotide sequences of each primer used are listed in Table 2. The products were visualized in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. To control for cross-contamination, one uninfected blood sample was included for every twelve samples processed. Fifteen percent of positive PCR samples were re-tested to confirm the amplification of plasmodial DNA. All the tests were performed and confirmed at the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA).

Salivary Gland Sonicate (SGS) preparation

Salivary glands from field captured adult female *An. darlingi* mosquitoes were dissected and transferred to 20 μL

Table 1: Baseline characteristics of the volunteers.

Variable	<i>Plasmodium vivax</i> current infection			P value
	Non-infected (n = 80)	Asymptomatic (n = 50)	Symptomatic (n = 74)	
Age – years*	30 (23–44.5)	44.5 (34.5–51)	27.5 (21–37)	0.0341†
Malaria episodes referred*	13.5 (11–18)	17.5 (13–21)	7 (1–13)	0.0283†
Time residing in the area – years				0.0185‡
<2	25 (31.3%)	8 (16%)	31 (41.9%)	
3–10	12 (15%)	12 (24%)	16 (21.6%)	
>10	43 (53.7%)	30 (60%)	27 (36.5%)	
Parasitaemia – parasites/ μL				< 0.0001‡
ND§	80 (100%)	3 (6%) §	0	
100–<500	0	44 (88%)	34 (45.9%)	
500–<5,000	0	3 (6%)	5 (6.8%)	
5,000–<50,000	0	0	30 (40.5%)	
>50,000	0	0	5 (6.8%)	
IgG anti-SGS – O.D.*	0.06 (0.04–0.09)	0.13 (0.08–0.26)	0.095 (0.07–0.14)	< 0.0001†
Plasma IL-10 – pg/mL*	12.6 (7.4–19.2)	64.5 (7.3–86.0)	23.4 (9.5–58.4)	NS†
Plasma IFN- γ – pg/mL*	14.2 (0–32.0)	44.0 (10.5–101.0)	75.5 (38.8–243.5)	NS†

* Values plotted represent media and range

† Ordinal variables were compared between groups Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test.

‡ Categorized variables were compared using chi-squared test. P values obtained in each test are plotted.

§ND: Six patients, out of 50 were negative for malaria infection by light microscopy, but were positive for *P. vivax* infection by nested PCR.

NS: Non significant.

Table 2: Primers used in Nested PCR reactions.

Primer	Oligonucleotide Sequence 5'-3'	Base pairs
PLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	1,200
PLU6	TTAAAATTGTTGCAGTAAAA	
Fal1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	205
Fal2	ACACAATGAACCTCAATCATGACTACCCGTC	
Viv1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	120
Viv2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	
Mal1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	144
Mal2	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA	

PLU: *Plasmodium* sp, Fal: *Plasmodium falciparum*, Viv: *Plasmodium vivax*, Mal: *Plasmodium malariae*.

of 10 mM HEPES pH 7.0, 0.15 mM NaCl in 1.5-mL polypropylene vials, usually in groups of 20 gland pairs. Salivary glands were kept at -70°C until needed, when they were disrupted by sonication using a Branson Sonifier 450 homogenizer (Branson, Danbury, CT). The homogenates were centrifuged at 10,000 × g for 4 min and the supernatants were used for the experiments. Protein concentrations were measured by the bicinchoninic acid method (BCA, Pierce, Rockford, Illinois, USA). As the salivary glands used in this study were obtained from field captured mosquitoes, *Plasmodium* contamination needed to be checked by nested PCR. Briefly, it was performed the DNA extraction of a sample from the same SGS pool used in the serological experiments using the Qiagen Generation Capture Card Kit (Cat. No. 159982; Qiagen, Santa Clara, California, USA). Further, the nested PCR was performed as described above, in duplicate samples. There was no amplification of DNA in both duplicates (data not shown).

Anti-An. darlingi saliva serology

Volunteer's sera were collected and kept at -70°C. Serological tests of all samples were performed in a single experiment, with duplicate samples. ELISA was performed as described elsewhere [14]. Briefly, plates were coated with *An. darlingi* salivary homogenate (SGS) equivalent to 1.5 µg/mL in carbonate buffer overnight at 4°C, then washed with PBS/0.05% Tween and blocked with PBS/0.1% Tween plus 0.05% BSA. Sera were diluted 1:100 with PBS/0.05% Tween and incubated overnight at 4°C. After further washings, the wells were incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-human IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a 1:5,000 dilution. Following another washing cycle, the color was developed with p-nitrophenylphosphate. The reactions were blocked with NaOH and read at 405 nm using Soft Max-Pro Software v5 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California, USA) ELISA reader. The optical density (OD) values plotted represent the means between each sample duplicate, adjusted for the values from the blank wells.

Plasma cytokine measurement

Interleukin (IL)-10 and interferon (IFN)-γ plasma levels were measured using de Cytometric Bead Array – CBA® (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, USA) according to the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software Inc.). For the ordinal variables (age, referred malaria episodes, IgG, IL-10 and IFN-γ serum levels), differences between groups were calculated using the non parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post test. Chi-square test was used to compare differences regarding categorized variables (Time residing in the area and parasitaemia). Mann-Whitney test was used to compare differences in IgG levels between non-infected individuals and those with symptomatic or asymptomatic *P. vivax* infection. This test was also used to estimate significance in IFN-γ/IL-10 ratios from volunteers with asymptomatic or symptomatic *P. vivax* infection. To evaluate the cut off value of IgG anti-SGS predicting malaria infection or asymptomatic infection, we performed Receiver-operator characteristic (ROC) curves, calculated the Area under curve (AUC), and then estimated the likelihood ratio for the discrimination between the conditions analyzed. Fine Lowess curves were plotted to evidence the trend of the data presented in correlation analyzes. Spearman test was used to verify the significance in the correlations between cytokine levels and anti-SGS levels. Differences were considered significant at P < 0.05.

Results and discussion

In an attempt to check if the measurement of anti-SGS antibody levels could be a suitable method to estimate natural exposure to *P. vivax*, anti-SGS values obtained from non-infected individuals were compared to those from either symptomatic or asymptomatic infected volunteers. As seen in Figure 1A, infected patients presented higher levels of specific antibodies against *An. darlingi* salivary antigens than non-infected individuals. The variabil-

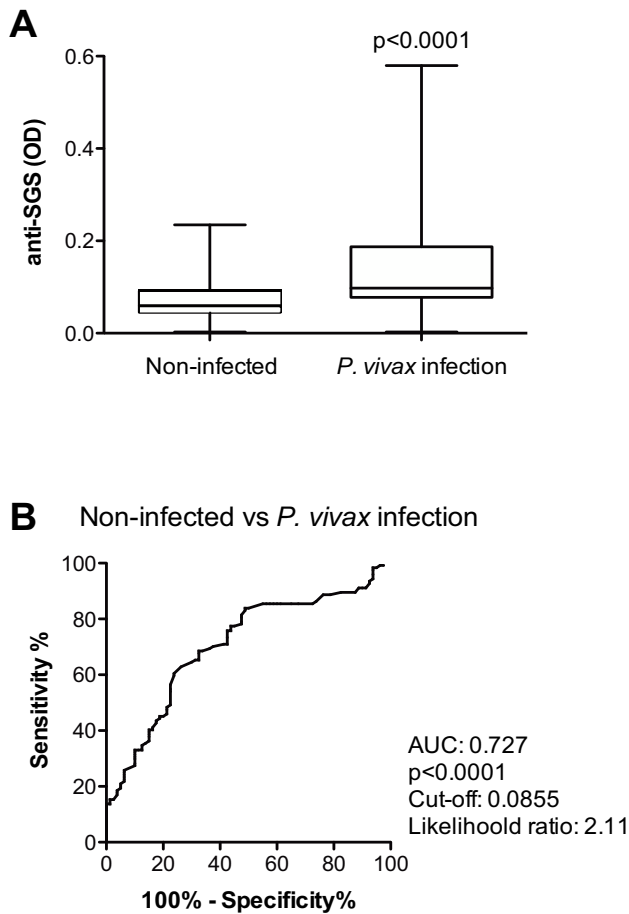


Figure 1
Anti-saliva IgG serum levels according to malaria occurrence. Serums were collected from non-infected individuals ($n = 80$), and from patients with *P. vivax* infection with or without symptoms ($n = 124$). An ELISA test was performed to assess the IgG anti-*An. darlingi* SGS. (A) Box plot graphs of IgG serum levels from non-infected individuals and from patients with *P. vivax* infection. Lines of the boxes represent 75th percentile, median and 25th percentile of the individual average OD values; whiskers represent the maximum and minimum values. Differences between groups were tested using Mann Whitney test. (B) ROC curve evaluating the threshold value of anti-SGS that separates non-infected individuals from *P. vivax* infection. Area under curve (AUC) calculated, together with the cut off value, which presents the higher likelihood ratio, and p values are plotted.

ity probably indicates individual differences in exposure to mosquito bites, even during the period of high malaria transmission, when these data were collected. Previous studies have also demonstrated a high variation in anti-*An. dirus* saliva antibody titers [14].

A ROC curve was built to assess the best anti-SGS OD value to discriminate *P. vivax* infection from the non-

infected condition. A cut-off point of 0.0855 OD displayed a likelihood ratio to be infected of 2.11 indicating *P. vivax* infection (Figure 1B; AUC: 0.727; $p < 0.0001$). These data suggest that evaluation of anti-saliva antibodies could be a useful indicator to estimate exposure to *P. vivax* in this endemic area. High anti-SGS antibody levels were also proposed as putative biomarkers of exposure to bites of *An. steteophensi* or *An. gambiae* and also of risk of *P. falciparum* malaria [13]. In this study, besides suggesting exposure to bites, high anti-*An. darlingi* saliva antibody levels could also indicate exposure to *P. vivax*.

This work is the first to evaluate human immune response against salivary components of *An. darlingi*, the most widespread specie of *Anopheles* mosquitoes and the major malaria vector in the Americas [21]. In areas with unstable malaria transmission and moderate risk of infection, such as the Brazilian Amazon, adults, instead of children are largely affected by the disease. Hence, this study focused investigation on the adult population from a Brazilian endemic area.

Diagnosis of symptomatic malaria cases is routinely performed in the endemic areas. A real challenge for diagnosis is to discriminate asymptomatic *Plasmodium*-infected individuals from those with no malaria infection. Despite presenting no clinical manifestations, asymptomatic *Plasmodium*-infected individuals are able to transmit *Plasmodium* to uninfected mosquitoes [22]. Thus, asymptomatic persons could serve as important reservoirs, and the possibility of identifying them could be useful for malaria control. Asymptomatic individuals presented higher anti-SGS antibody levels than non-infected individuals (Figure 2A, $p < 0.0001$). A ROC curve to discriminate these two clinical conditions showed that a cut-off value of 0.0935 OD, with a likelihood ratio of 3.03, indicated asymptomatic infection (Figure 2B; AUC: 0.798; $p = 0.0001$). Considering solely the *P. vivax* infected patients, asymptomatic individuals presented higher levels of anti-SGS than symptomatic ones (Figure 3, $p = 0.0009$). Evaluation of antibodies against *An. darlingi* saliva may serve as a marker of *P. vivax* asymptomatic infection in this Brazilian malaria endemic area.

In order to explore immunopathological patterns in *P. vivax* infection, the correlation between the anti-SGS antibody levels and the serological cytokine profile in asymptomatic and symptomatic malaria patients was evaluated. Volunteers with asymptomatic parasitaemia had a positive correlation between IL-10 and anti-SGS levels (Figure 4A. $r = 0.50$; $p = 0.0002$), but this finding was not seen in symptomatic individuals (Figure 4B. $r = 0.16$; $p = 0.17$). IFN- γ serum levels did not display significant correlation with anti-saliva antibodies in either asymptomatic (Figure 4C. $r = 0.25$; $p = 0.07$) or symptomatic (Figure 4D. $r =$

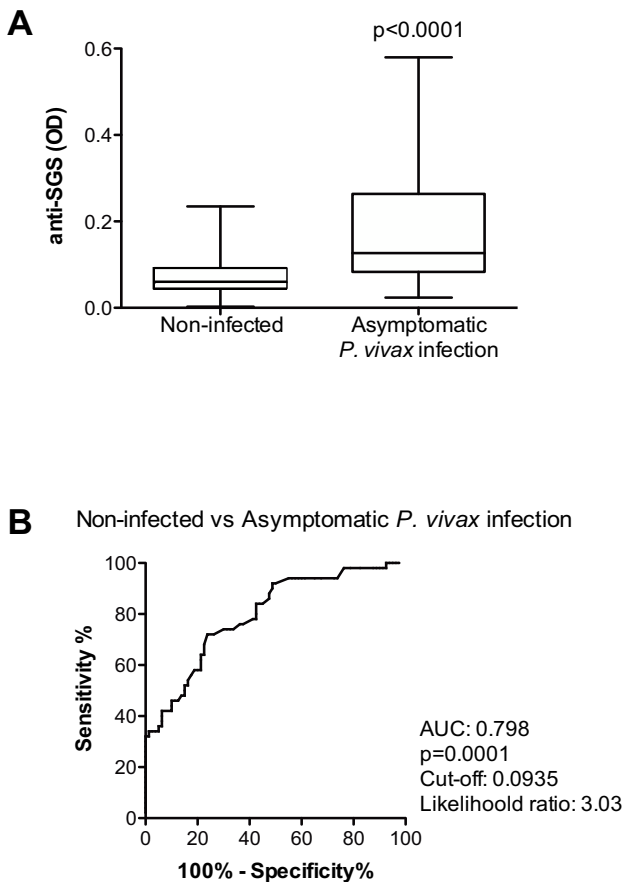


Figure 2
Anti-saliva IgG serum levels from non-infected individuals and asymptomatic malaria patients. Serums were collected from non-infected individuals (n = 80), and from patients with asymptomatic (n = 50) *P. vivax* infection. An ELISA test was performed to assess the IgG anti-*An. darlingi* SGS. (A) Box plot graphs of IgG serum levels from non-infected individuals and from patients with asymptomatic *P. vivax* infection. Lines of the boxes represent 75th percentile, median and 25th percentile of the individual average OD values; whiskers represent the maximum and minimum values. Differences between groups were tested using Mann-Whitney test. (B) ROC curve evaluating the threshold value of anti-SGS that separates non-infected individuals from asymptomatic *P. vivax* infection. Area under curve (AUC) calculated, together with the cut off value, which presents the higher likelihood ratio, and p values are plotted.

0.12; $p = 0.29$) patients. Moreover, a significant negative correlation between the IFN- γ /IL-10 ratio and anti-SGS levels in asymptomatic patients was noted (Figure 4E. $r = -0.31$; $p = 0.03$) but not in the symptomatic ones (Figure 4F. $r = 0.05$; $p = 0.88$). Thus, besides differing in anti-SGS antibody levels, asymptomatic and symptomatic *P. vivax*-infected individuals also differ in their cytokine balance. Cytokine profile may be implicated in minimizing *P. vivax*

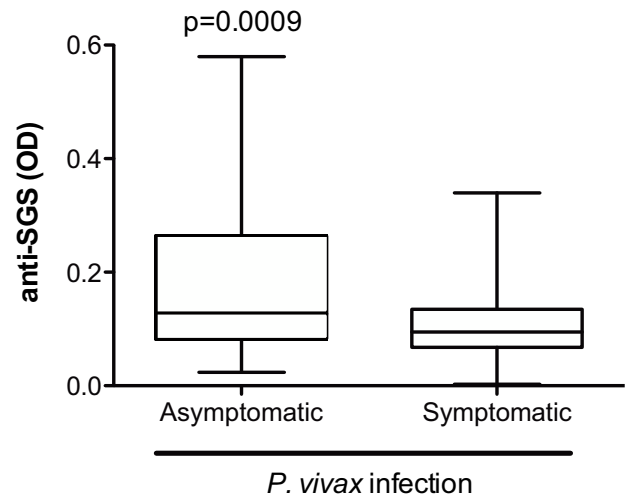


Figure 3
Serum Anti-*An. darlingi* SGS levels in patients with different clinical spectrum of *P. vivax* infection. Serums were collected from volunteers with asymptomatic *P. vivax* infection (n = 50) and from patients with symptomatic infection (n = 74). An ELISA test was performed to assess the IgG anti-*An. darlingi* SGS. Box plot graph, with lines of the boxes representing 75th percentile, median and 25th percentile of the individual average OD values; whiskers represent the maximum and minimum values. Differences between groups were tested using Mann-Whitney test; p value is plotted.

immunopathology, as individuals with asymptomatic infection presented lower IFN- γ /IL-10 ratio compared to symptomatic patients (Figure 4G; $p < 0.0001$). As previously described [3] and also presented in this work (Table 2), asymptomatic parasitaemia directly correlated to increased age and is more frequently observed in people residing for a long time in malaria endemic areas. In these regions, an extensive exposure to mosquito bites occurs over time. Malaria infection rates in these insects usually range from below 0.1% to 10% [23,24]. Consequently, each inhabitant is exposed to much more uninfected mosquitoes than infected ones. The recurrent exposure to mosquito bites or also to the *Plasmodium* may lead to a modification on the host immune response. It has been shown that repeated exposure to mosquito bites induces a Th1 profile in experimental models, leading to increased resistance to *Plasmodium* transmission [11]. This work shows that chronic exposure to *An. darlingi* bites relates to a reduction in the IFN- γ /IL-10 ratio not implying any causal relationship. On the other hand, as malaria clinical syndromes result from inadequate activation of pro-inflammatory cascades, oxidative stress and disturbs in immune regulation [25], this study hypothesizes that people residing in malaria endemic areas repeatedly exposed to uninfected mosquito bites over many years develop an

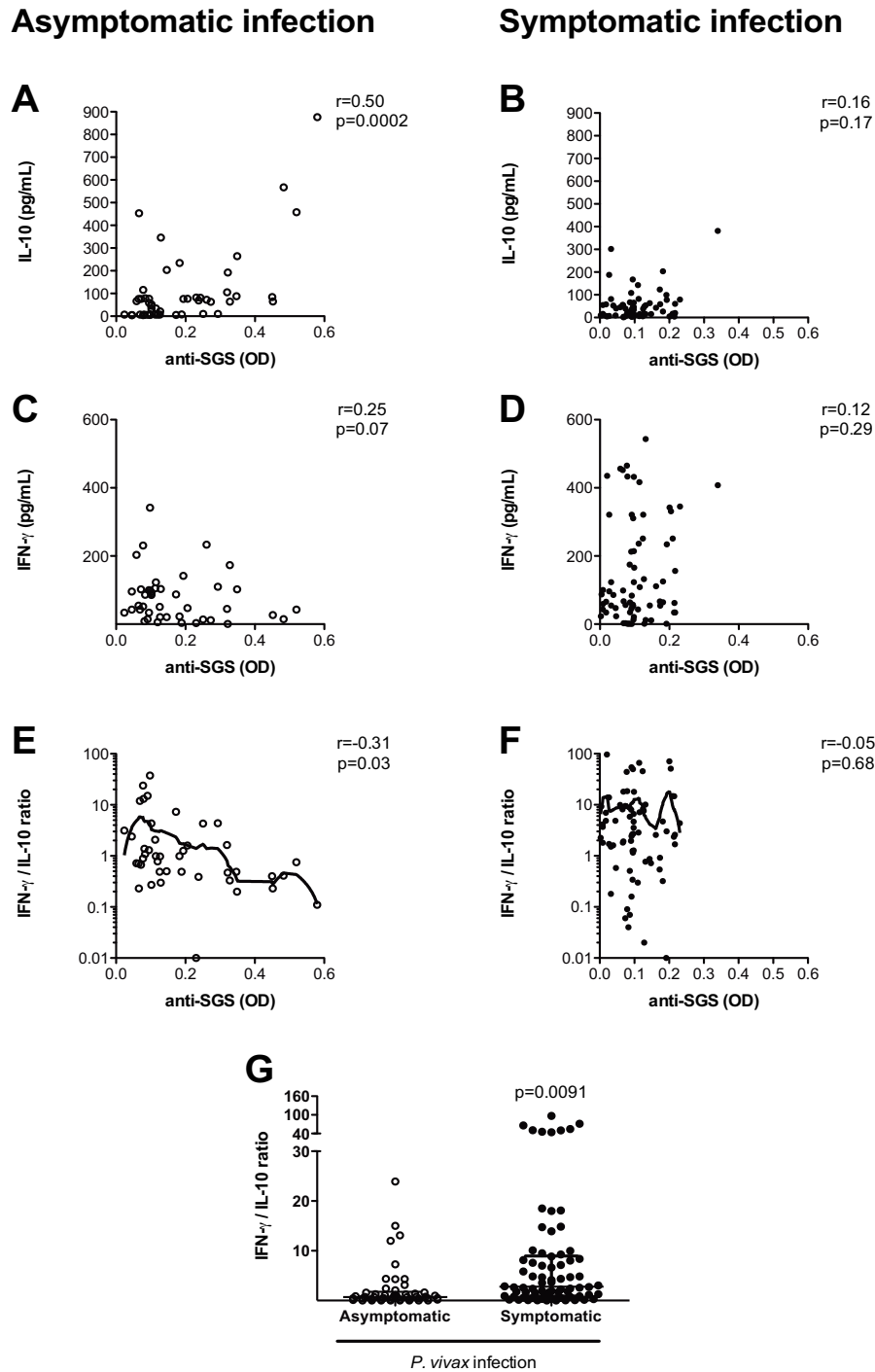


Figure 4
Correlation between cytokine plasma levels and anti-saliva IgG titers. (A) IL-10 vs. anti-SGS (OD), (B) IFN- γ , and (C) IFN- γ /IL-10 ratio vs. anti-SGS in patients with asymptomatic *P. vivax* infection. (D) IL-10 vs. anti-SGS (OD), (E) IFN- γ , and (F) IFN- γ /IL-10 ratio vs. anti-SGS in patients with symptomatic *P. vivax* infection. Fine Lowess curves are shown in (C) and (F) to evidence the trend of the data. Non-parametric Spearman test was used to verify statistical significance. (G) Comparison of IFN- γ /IL-10 ratio between volunteers with asymptomatic or symptomatic *P. vivax* infection. Mann-Whitney test was used to estimate the significance. P values, together with r values, are plotted in each graph.

efficient anti-saliva immune response, in which IL-10 may favor the production of specific antibodies. The neutralization of some vector salivary proteins may create micro-environment alterations in the site of mosquito bites that might ultimately affect the transmission of malaria. Another possibility is that mosquito bites, and also the continued exposure to *Plasmodium*, induce higher production of IL-10, which may reduce intense pro-inflammatory responses and the immunopathology of the infection. This study does not present experimental basis to indicate any direct effect of antibodies against *An. darlingi* salivary components on clinical status of *P. vivax* infected individuals. An important limitation regarding the use of anti-SGS levels as a marker for malaria infection is represented by the considerable variation of malaria transmission among different areas and also from season to season. This would make mandatory the establishment of appropriate anti-SGS cut-off level before using it as a marker for malaria. Nevertheless, once the cut-off levels are defined, the measurement of anti-SGS could serve as a very sensible indicator of this disease.

Conclusion

Through the estimation of serum anti-*An. darlingi* saliva antibody levels, it is possible to infer the probable *P. vivax* infection status as marker of disease severity of an individual from the Amazon endemic area. Moreover, this study also suggests that the clinical immunity against *P. vivax* could be associated to a specific humoral response against the salivary components. As previously described to other vector-borne diseases, such as leishmaniasis, the detection of increased levels of anti-vector saliva could be pointed as an epidemiological marker of infection and also as a suitable indicator of clinical immunity in endemic regions.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

BBA designed the study, collected the serum samples, performed serology and cytokine experiments, the statistical analysis and drafted the manuscript. BCR, WPT, and LAM provided the salivary glands and helped in data analysis. ARF performed the SGS preparation and helped with the manuscript. LMAC participated in the design of the study, collected serum samples, examined the volunteers, and helped in data analysis. AB participated in the design of the study and helped in data analysis. MBN conceived of the study, participated in its design and coordination and helped in writing the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Authors' information

BBA received a PhD fellowship and ARF a scientific initiation fellowship from the Brazilian National Research

Council (CNPq). LAM, AB and MB-N are senior investigators from CNPq.

Acknowledgements

The authors would like to thank João Gambati, Sebastião Martins Neto, and Imbroinise Neto for technical support in field study area; Mr Jorge Tolentino, Ms Natali Alexandrino, and Mrs Adorielze Leite for logistic support. We are also grateful to Mr. Kiyoshi Fukutani for assistance with the molecular experiments and to Dr. Marcelo Jacobs Lorena for critical review of the manuscript. This work was supported by FINEP (010409605)/FNDCT-CT-Amazonia.

References

- Rogier C, Trape JF: **Study of premunition development in holo- and meso-endemic malaria areas in Dielmo and Ndiop (Senegal): preliminary results, 1990-1994.** *Med Trop (Mars)* 1995, **55**:71-76.
- Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, Purnomo, Masbar S: **Age-dependent acquired protection against Plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyperendemic malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 1991, **45**:65-76.
- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP: **High prevalence of asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections in native Amazonian populations.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**:641-648.
- Camargo LM, Noronha E, Salcedo JM, Dutra AP, Krieger H, Pereira da Silva LH, Camargo EP: **The epidemiology of malaria in Rondonia (Western Amazon region, Brazil): study of a riverine population.** *Acta Trop* 1999, **72**:1-11.
- Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR: **Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil.** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **80**:452-459.
- D'Ombra MC, Robinson LJ, Stanisic DI, Taraika J, Bernard N, Michon P, Mueller I, Schofield L: **Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**:1380-1387.
- Camargo EP, Alves F, Pereira da Silva LH: **Symptomless Plasmodium vivax infections in native Amazonians.** *Lancet* 1999, **353**:1415-1416.
- Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJ, Morais CG, Martins MS, Krettli AU: **Association of the IgG response to Plasmodium falciparum merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**:461-466.
- Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P: **Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996, **90**:15-19.
- Peng Z, Simons FE: **Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens.** *Int Arch Allergy Immunol* 2004, **133**:198-209.
- Donovan MJ, Messmore AS, Scraftord DA, Sacks DL, Kamhawi S, McDowell MA: **Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites.** *Infect Immun* 2007, **75**:2523-2530.
- Orlandi-Pradines E, Almeras L, Denis de Senneville L, Barbe S, Remoue F, Villard C, Cornelié S, Penhoat K, Pascual A, Bourgoignie C, et al.: **Antibody response against saliva antigens of Anopheles gambiae and Aedes aegypti in travellers in tropical Africa.** *Microbes Infect* 2007, **9**:1454-1462.
- Remoue F, Cisse B, Ba F, Sokhna C, Herve JP, Boulanger D, Simondon F: **Evaluation of the antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006, **100**:363-370.
- Waitayakul A, Somsri S, Sattabongkot J, Looareesuwan S, Cui L, Udomsangpetch R: **Natural human humoral response to salivary gland proteins of Anopheles mosquitoes in Thailand.** *Acta Trop* 2006, **98**:66-73.

15. Pattanayak SK, Dickinson K, Corey C, Murray B, Sills E, Kramer R: **Deforestation, malaria, and poverty: a call for transdisciplinary research to support the design of cross-sectoral policies.** *Sustainability: Science, Practice & Policy* 2006, **2**:45-56.
16. Rodrigues Ade F, Escobar AL, Souza-Santos R: **Spatial analysis and determination of malaria control areas in the State of Rondonia.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2008, **41**:55-64.
17. da Silva J Jr: **National System in Health Surveillance: situation report: Rondônia.** Brasília: Ministério da Saúde; 2006:24.
18. Cavasini MT, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU: **How prevalent is Plasmodium malariae in Rondonia, western Brazilian Amazon?** *Rev Soc Bras Med Trop* 2000, **33**:489-492.
19. Snounou G: **Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification.** *Methods Mol Biol* 1996, **50**:263-291.
20. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN: **High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.** *Mol Biochem Parasitol* 1993, **61**:315-320.
21. Deane LM: **Malaria vectors in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986, **81**:5-14.
22. Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH: **Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon.** *J Med Entomol* 2005, **42**:777-779.
23. Gil LH, Alves FP, Zieler H, Salcedo JM, Durlacher RR, Cunha RP, Tada MS, Camargo LM, Camargo EP, Pereira-da-Silva LH: **Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia.** *J Med Entomol* 2003, **40**:636-641.
24. Lines JD, Wilkes TJ, Lyimo EO: **Human malaria infectiousness measured by age-specific sporozoite rates in Anopheles gambiae in Tanzania.** *Parasitology* 1991, **102**(Pt 2):167-177.
25. Schofield L, Grau GE: **Immunological processes in malaria pathogenesis.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**:722-735.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*

Luciano A. Moreira,^{1,2} Iñaki Iturbe-Ormaetxe,¹ Jason A. Jeffery,³ Guangjin Lu,³ Alyssa T. Pyke,⁴ Lauren M. Hedges,¹ Bruno C. Rocha,² Sonja Hall-Mendelin,⁵ Andrew Day,⁵ Markus Riegler,^{1,6} Leon E. Hugo,³ Karyn N. Johnson,¹ Brian H. Kay,³ Elizabeth A. McGraw,¹ Andrew F. van den Hurk,^{4,5} Peter A. Ryan,³ and Scott L. O'Neill^{1,*}

¹School of Biological Sciences, The University of Queensland, Brisbane QLD 4072, Australia

²René Rachou Research Institute- FIOCRUZ, Belo Horizonte MG, Brazil

³Queensland Institute of Medical Research, Post Office Royal Brisbane Hospital, Brisbane QLD 4029, Australia

⁴Virology, Queensland Health Forensic and Scientific Services, Coopers Plains QLD 4108, Australia

⁵School of Chemical and Molecular Biosciences, The University of Queensland, Brisbane QLD 4072, Australia

⁶Present address: Centre for Plants and the Environment, School of Natural Sciences, University of Western Sydney, Penrith South DC, NSW 1797, Australia

*Correspondence: scott.oneill@uq.edu.au

DOI 10.1016/j.cell.2009.11.042

SUMMARY

Wolbachia are maternally inherited intracellular bacterial symbionts that are estimated to infect more than 60% of all insect species. While *Wolbachia* is commonly found in many mosquitoes it is absent from the species that are considered to be of major importance for the transmission of human pathogens. The successful introduction of a life-shortening strain of *Wolbachia* into the dengue vector *Aedes aegypti* that halves adult lifespan has recently been reported. Here we show that this same *Wolbachia* infection also directly inhibits the ability of a range of pathogens to infect this mosquito species. The effect is *Wolbachia* strain specific and relates to *Wolbachia* priming of the mosquito innate immune system and potentially competition for limiting cellular resources required for pathogen replication. We suggest that this *Wolbachia*-mediated pathogen interference may work synergistically with the life-shortening strategy proposed previously to provide a powerful approach for the control of insect transmitted diseases.

INTRODUCTION

Vector-borne diseases such as malaria, leishmaniasis and dengue, cause a tremendous impact on human mortality and morbidity worldwide. With increasing human movement (Adams and Kapan, 2009) and global warming effects (Barclay, 2008; Pachauri and Reisinger, 2007) re-emerging arboviral pathogens (Gould and Solomon, 2008) such as dengue (DENV) and Chikungunya (CHIKV) viruses are becoming an increasing threat (Ng and Ojcius, 2009; Staples et al., 2009).

Dengue is currently the most significant arboviral disease afflicting tropical and sub-tropical communities worldwide with an estimated global annual incidence of 50 million cases leading to tens of thousands of deaths (WHO, 2009). Between 2004 and 2007, unprecedented outbreaks of CHIKV occurred in islands of the western Indian Ocean, the Indian subcontinent and Europe (Staples et al., 2009). *Aedes aegypti* is considered the primary vector of both DENV and CHIKV. As effective vaccines do not exist for these viruses, prevention of human cases relies almost exclusively on control of the mosquito vectors. Despite some recent successes utilizing copepods as larval biological control agents (Kay and Vu, 2005), most control approaches are proving neither effective nor sustainable, and dengue is increasing in its geographic distribution, frequency of outbreaks and severity of disease (Kyle and Harris, 2008).

A new approach to dengue control has recently been proposed that targets mosquito longevity rather than abundance, through the introduction of a life-shortening strain of the bacterium *Wolbachia pipiensis* into *A. aegypti* populations (Brownstein et al., 2003; Cook et al., 2008; Rasgon et al., 2003; Sinkins and O'Neill, 2000). *Wolbachia* is an intracellular inherited bacterium, predicted to naturally infect more than 60% of all insect species worldwide (Hilgenboecker et al., 2008; Jeyapra-kash and Hoy, 2000) that is able to invade host populations through either the induction of a number of reproductive parasitism traits (O'Neill et al., 1997) or by positively influencing host fitness (Brownlie et al., 2009; Dobson et al., 2004; Kremer et al., 2009; Weeks et al., 2007).

Since the extrinsic incubation period of viruses and parasites within the mosquito vector is long relative to insect lifespan, *Wolbachia* infections that can invade mosquito populations and reduce adult *A. aegypti* lifespan are predicted to reduce pathogen transmission without eliminating the mosquito population (Brownstein et al., 2003; Rasgon et al., 2003; Sinkins and O'Neill, 2000). The successful introduction of the life-shortening wMel-Pop-CLA strain of *Wolbachia* from *Drosophila melanogaster*

Table 1. Effect of *Wolbachia* on DENV-2 Infection

Experiment	Log DENV-2 per mL	Days post-infection	PGYP1.out	(+ Wolb)	PGYP1.out.tet	(– Wolb)	Cairns3	(– Wolb)
			% body infection (n)	% disseminated infection (n)	% body infection (n)	% disseminated infection (n)	% body infection (n)	% disseminated infection (n)
1	6.3	7	0 (25)	0 (25)	NA ^a	NA	64 (25)	12 (25)
		14	0 (27)	0 (27)	NA	NA	57 (30)	23 (30)
2	6.0	7	0 (40)	0 (40)	100 (30)	10 (30)	95 (40)	5 (40)
		14	0 (40)	0 (40)	97 (30)	37 (30)	95 (40)	20 (40)
3	5.3	7	0 (40)	0 (40)	30 (40)	23 (40)	50 (40)	13 (40)
		14	0 (40)	0 (40)	48 (40)	43 (40)	73 (40)	33 (40)
4	7.8	7	5 (40)	3 (40)	78 (40)	63 (40)	63 (40)	45 (40)
		14	8 (40)	5 (40)	70 (40)	65 (40)	75 (40)	70 (40)

A. aegypti were orally infected with fresh DENV-2 and viral load determined by cell culture ELISA.

^aThis mosquito line was unavailable for experiment 1

into *A. aegypti* has recently been reported (McMeniman et al., 2009). Mosquitoes carrying this *Wolbachia* strain show around a 50% reduction in adult female lifespan compared to uninfected mosquitoes.

Recent studies in *Drosophila* have shown that *Wolbachia* infections can protect against RNA viruses (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). The *Wolbachia* strains wMelCS and wMelPop that infect *D. melanogaster* were found to delay mortality in flies when they were infected with a range of pathogenic viruses including *Drosophila* C virus, Flock House virus and Cricket paralysis virus. It is currently unknown how general this anti-viral effect is in terms of both the diversity of *Wolbachia* strains that can confer protection and the range of viruses that are affected by it although recent studies in *Drosophila* indicate that the effect appears limited to certain *Wolbachia* strains (Osborne et al., 2009).

Given that the wMelPop strain of *Wolbachia* provides protection against RNA viruses in *Drosophila*, and that the derived wMelPop-CLA strain of *Wolbachia* was introduced into the mosquito *A. aegypti* to shorten lifespan, we hypothesized that wMelPop-CLA infected mosquitoes may have altered vector competence for arboviruses. To test this hypothesis we exposed *Wolbachia*-infected and -uninfected mosquitoes to two important human pathogens; dengue and Chikungunya viruses. We also tested the same mosquito strains with the avian malaria parasite, *Plasmodium gallinaceum*.

RESULTS

Wolbachia and Dengue Virus

We tested the effect of *Wolbachia* on vector competence in two mosquito genetic backgrounds: the original inbred PGYP1 line, stably transfected with wMelPop-CLA (McMeniman et al., 2009) and the same strain after five generations of backcrossing to the F1 progeny of wild-caught *A. aegypti*, collected in Cairns, Australia (PGYP1.out). These mosquito strains were compared to tetracycline-treated counterparts that were genetically identical but lacked the *Wolbachia* infection, named PGYP1.tet and PGYP1.out.tet, respectively. In addition, a wild-type strain of *A. aegypti* established from field-collected material in Cairns, Australia (Cairns3) was used as an additional negative control.

Mosquitoes were fed an artificial blood meal spiked with DENV-2 in four independent experiments to examine possible interactions with *Wolbachia*. The presence of DENV-2 in whole mosquito bodies was examined 7 and 14 days post exposure using a cell culture enzyme immunoassay (CCEIA) (Knox et al., 2003). In three separate experiments no *Wolbachia*-infected mosquitoes (PGYP1.out) tested positive for DENV-2, but DENV-2 infection rates in *Wolbachia*-uninfected mosquitoes (PGYP1.out.tet and Cairns3) ranged from 30%–100% (Table 1, Exp 1–3). Body viral infection rates in PGYP1.out.tet mosquitoes ranged from 30%–100% after 7 days and 48%–97% after 14 days, while the body viral infection rates in Cairns3 ranged from 50%–95% after 7 days and 57%–95% after 14 days. The disseminated viral infection rates measured through the presence of virus in mosquito legs in tetracycline-treated *A. aegypti* ranged from 10%–23% and 37%–43% after 7 and 14 days, respectively. Disseminated infections in the *Wolbachia*-free wild-type Cairns3 strain of *A. aegypti* ranged from 5%–13% and 20%–33% after 7 and 14 days, respectively (Table 1) ($p < 0.001$, chi-square). In one experiment (Table 1, Exp 4) when mosquitoes were fed the highest titer ($10^{7.8}$ Logs) of DENV-2 a small number of *Wolbachia*-infected mosquitoes tested positive for DENV-2 at both 7 and 14 days post infection (5 and 8%, respectively) but this was significantly fewer than *Wolbachia* uninfected controls (63%–78% and 70%–75%, respectively) ($p < 0.001$, chi-square).

To provide a more conservative test of *Wolbachia*-mediated interference, mosquitoes were intrathoracically injected with DENV-2. These experiments circumvented the midgut barrier to infection (Woodring et al., 1996) and allowed for the delivery of a repeatable inoculating dose (around 2,750 infectious particles/mosquito) of DENV-2 that produced consistent high-titer infections in control mosquitoes. Accumulation of genomic (+RNA) and anti-genomic (-RNA) RNA strands was assessed at 5 and 14 days post injection by quantitative real time PCR using DENV-2 specific primers (Richardson et al., 2006). At both time points, the amount of DENV-2 RNA present was reduced by up to 4 logs in both the PGYP1 and PGYP1.out *Wolbachia*-infected mosquito strains compared to their paired tetracycline treated counterparts (Figure 1, and Table S1 available online). Furthermore, when mosquito saliva collected from mosquitoes

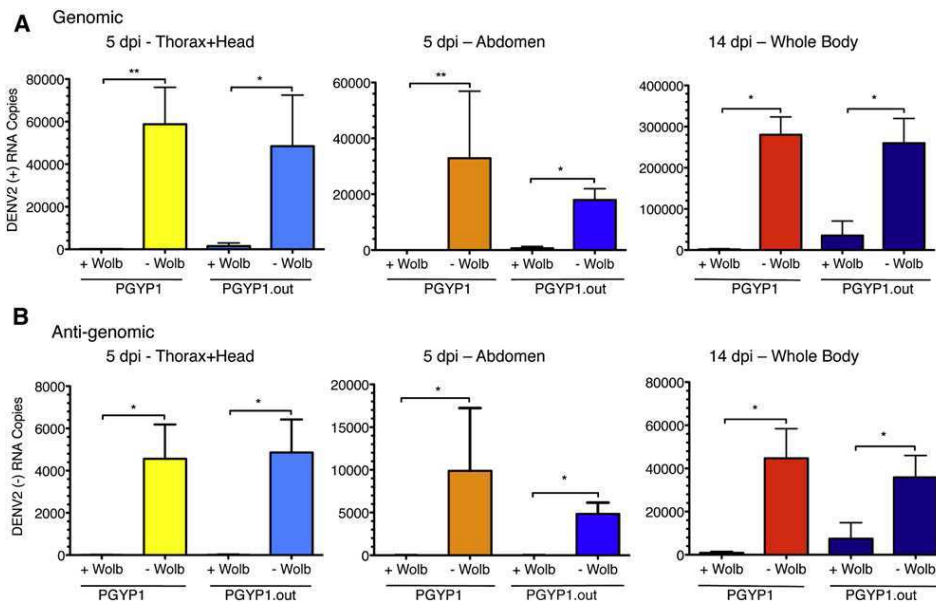


Figure 1. Quantitative PCR Analysis of Dengue Virus in Mosquitoes

Two strains of *Wolbachia*-harbouring (+ Wolb) *A. aegypti* mosquitoes (PGYP1 and PGPY1.out) and their tetracycline treated counterparts (- Wolb) (PGYP1.tet and PGPY1.out.tet) were intrathoracically injected with DENV-2 and the virus RNA was estimated by real-time PCR.

(A) Genomic RNA (+RNA) in thorax and head 5 days post-infection (dpi), abdomen 5 dpi and whole mosquito 14 dpi.

(B) Anti-genomic RNA (-RNA) in thorax and head 5 dpi, abdomen 5 dpi and whole mosquito 14 dpi. Bars represent grand means \pm SEM calculated across four independent replicate experiments. * $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test. See also Table S1.

14 days postinjection was tested for the presence of infectious virus by CCEIA, none of the *Wolbachia*-infected mosquitoes samples tested positive for virus (data not shown). A dramatic reduction in viral protein synthesis was also observed by immunofluorescent microscopy (IFA) (Figures 2A–2F) and western blot analysis (Figure S1).

Double immunofluorescent staining of paraffin sections of *Wolbachia*-uninfected control mosquitoes 14 days post-injection showed DENV-2 infection predominantly in mosquito fat body, ommatidia (Figures 2A–2F) and nervous system. DENV-2 was not detected in any of these tissues in *Wolbachia*-infected mosquitoes (PGYP1 and PGPY1.out) whereas *Wolbachia* was clearly visible in the fat tissue, ommatidia (Figure 2), brain, ovaries, and malpighian tubules. Only in a few rare individuals was DENV-2 detected in patches of fat tissue in PGPY1.out mosquitoes. However in these cases *Wolbachia* and DENV-2 were not co-localized in the same cells and DENV-2 was only seen in occasional patches of cells that were not infected with *Wolbachia* (Figure 2G). The presence of DENV-2 in some injected PGPY1.out mosquitoes was also confirmed by western blot (Figure S1A).

Wolbachia and Chikungunya Virus

We then went on to determine if the virus interference phenotype would extend to the alphavirus CHIKV. The virus strain used in the experiments contained the Ala to Val mutation in the membrane fusion glycoprotein E1 gene (E1-A226V), which has been linked to increased infectivity in *A. albopictus* (Tsetsarkin et al., 2007). An Australian population of *A. aegypti* was recently shown to also be a highly efficient laboratory vector of this virus strain (van den Hurk et al., 2009).

Mosquitoes were exposed to a blood/virus mixture containing $10^{6.4}$ CCID₅₀/ml of CHIKV, and at various time points postexposure, mosquitoes were processed to quantify the number of viral RNA copies using qPCR and CHIKV-specific primers and probes (van den Hurk et al., 2009). Immediately after feeding, the number of CHIKV genomic (+ RNA) RNA copies in the body and head were comparable for all three lines, suggesting that they imbibed similar amounts of virus (Table 2). The median number of copies decreased in all three lines on day 2, prior to it increasing in the PGPY1.out.tet and Cairns3 mosquitoes to its highest level at day 14-postexposure. Day 14 infection rates were 87% and 79% for the PGPY1.out.tet and Cairns3 controls and 17% for the *Wolbachia* infected PGPY1.out line ($p < 0.001$, chi-square).

In all three mosquito groups, CHIKV RNA was detected in the legs and wings immediately after feeding (Table 2). This may represent either direct contact between the legs and/or wings and the blood/virus mixture or a rupture of the mesenteron, which released virus directly in the hemolymph (Turell, 1988). After day 0, CHIKV was not detected in the legs and wings of any PGPY1.out (+ Wolb) mosquitoes. In contrast, on all days postexposure, virus was detected in the legs and wings of PGPY1.out.tet and Cairns3 control mosquitoes (- Wolb) and by day 14, the virus was detected in the legs and wings of 100% and 90%, respectively, of mosquitoes that had positive bodies and heads ($p = 0.125$, chi-square).

Wolbachia and Plasmodium

Considering that the viral interference effect appeared robust for two unrelated arboviruses we then tested the effect on the protozoan parasite *P. gallinaceum*. While not a human pathogen,

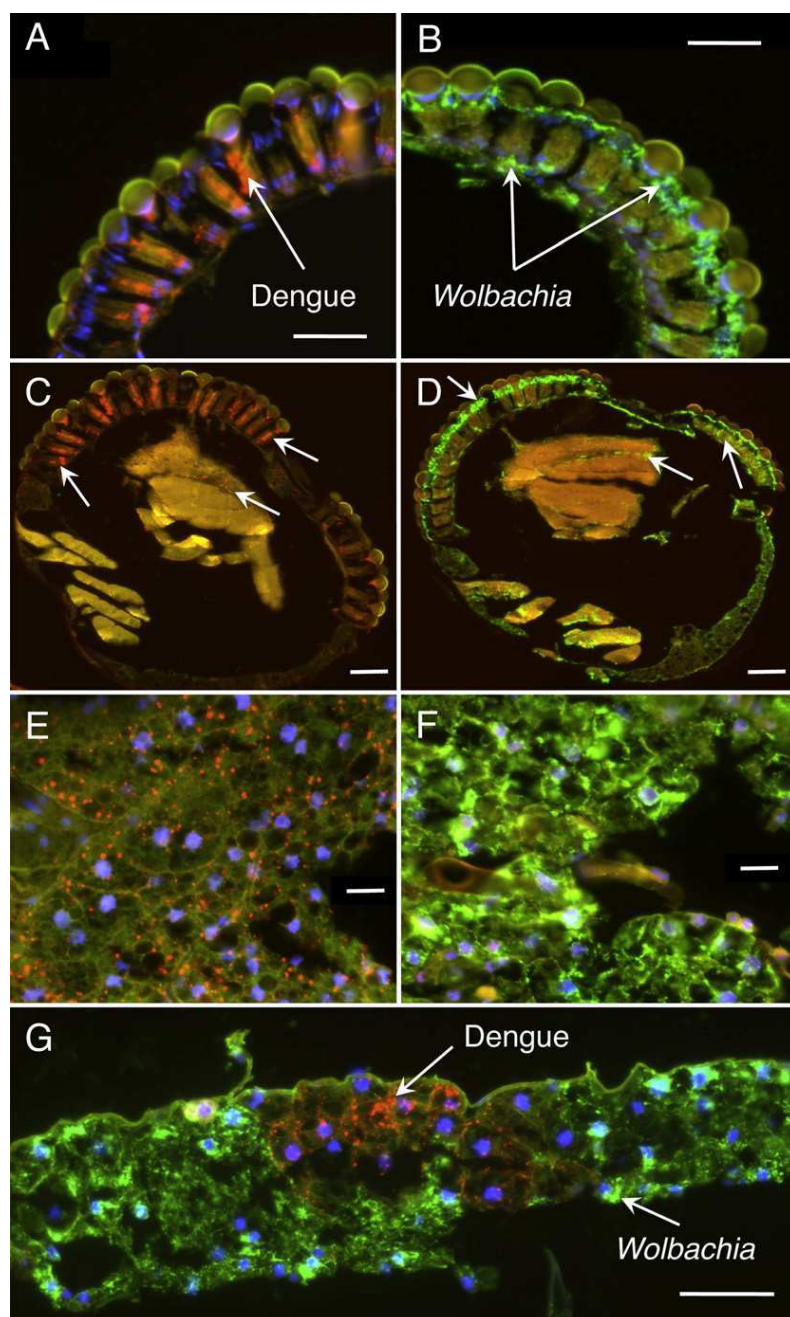


Figure 2. Localization of *Wolbachia* and Dengue Virus in *A. aegypti* Mosquitoes

Double immunofluorescence staining of mosquito sections showing the localization of dengue virus (red) and *Wolbachia* (green). Sections were probed simultaneously with polyclonal anti-wsp antibody (*Wolbachia*) and monoclonal anti-DENV antibody 4G4, followed by Alexa 488 (green) and Alexa 594 (red) conjugated antibodies, respectively. DNA (blue) is stained with DAPI. In panels (A, B, E, F, and G), the red, green and blue channels are merged. C and D show only red and green channels merged. (A, C, E) PGYP1.tet (- Wolb) mosquitoes, 14 days post-DENV-2 thoracic injection. Dengue virus is visible in ommatidia cells (A and C) and fat tissue (E). (B, D, F) PGYP1 mosquitoes (+ Wolb), 14 days post-DENV-2 thoracic injection. *Wolbachia* can be seen in ommatidia cells and brain (B and D) and fat tissue (F). In contrast no dengue virus was detected. (G) Cellular exclusion of DENV-2 by *Wolbachia*. The presence of both *Wolbachia* and DENV-2 was observed at very low frequency in a small number of *Wolbachia*-infected out-crossed mosquitoes, 14 days post-DENV-2 injection. Dengue is only apparent in cells lacking *Wolbachia* however. Scale bars: A-D, G: 50 μ m; E, F: 20 μ m. See also Figure S1.

a safe avian malaria (*P. gallinaceum*) model vector, as it does not naturally transmit DENV or yellow fever virus (Tason de Camargo and Kretzli, 1981).

Seven days post-feeding on infected chickens, mosquito midguts were dissected and presence and number of *Plasmodium* oocysts assessed. The wMelPop-CLA infection significantly reduced ($p < 0.0001$, chi-square) the frequency of mosquitoes in the population infected with at least a single oocyst and so potentially able to transmit *Plasmodium* (Figure 3A) from 74% (tet controls) down to 42%. The presence of *Wolbachia* also reduced the number of oocysts present in mosquitoes that were infected with the parasite (Figures 3A and 3B). To quantify the difference in parasite loads, 15 days after infection mosquitoes were collected and the DNA was extracted. The relative abundance of *Plasmodium* genomic DNA was measured by qPCR of the 18S ssu rRNA gene (Schneider and Shahabuddin, 2000) and normalized to the mosquito Actin gene. The results showed the same pattern of interference as observed from oocyst count data. In PGYP1.out mosquitoes *Plasmodium* genomic DNA was 26-fold less abundant than in PGYP1.out.tet lines (Figure 3C). Immunofluorescence analysis using an anti-CSP (*Plasmodium* circumsporozoite protein) monoclonal antibody showed the presence of mature oocysts in both mosquito species (Figure S2B), but very rarely in *Wolbachia*-infected mosquitoes.

When we incubated the mosquito sections with an anti-*Wolbachia* (wsp) antibody we serendipitously discovered

this species of malaria parasite is known to be able to infect *A. aegypti* mosquitoes in the laboratory. Since no species of anopheline mosquitoes are known to carry natural *Wolbachia* infections and stable *Wolbachia* transinfected lines have yet to be generated, we considered the *A. aegypti* - *P. gallinaceum* model system most appropriate for testing effects on malaria parasites. *Wolbachia*-infected and uninfected *A. aegypti* mosquitoes (PGYP1.out and PGYP1.out.tet strains) as well as a susceptible strain of *Aedes fluviatilis* were fed in parallel on *P. gallinaceum* infected chickens. *A. fluviatilis* has a broad geographical distribution in Latin America and has been used in the laboratory as

Table 2. Effect of *Wolbachia* on CHIKV infection

Days post-infection	PGYP1.out				PGYP1.out.tet				Cairns3			
	Infected (%)	Disseminated (%)	Median copies in Bodies/ Heads (N)	Percentiles (25 - 75%)	Infected (%)	Disseminated (%)	Median copies in Bodies/ Heads (N)	Percentiles (25 and 75%)	Infected (%)	Disseminated (%)	Median copies in Bodies/ Heads (N)	Percentiles (25 and 75%)
0	100	20	10.2 (10) n.s.	10.0-10.4	100	20	10.2 (10)	9.8-10.6	100	10	10.0 (10)n.s.	9.8-10.5
2	80	0	9.1 (8)n.s.	8.5-9.4	50	30	9.6 (5)	9.3-10.2	70	40	9.5 (7)n.s.	9.2-9.8
4	20	0	7.8 (2)*	7.3-8.2	60	60	10.4 (6)	9.7-10.8	50	30	10.0 (6)n.s.	9.6-11.7
7	10	0	7.3 (1)n.a.	n.a.	100	100	11.1 (10)	10.8-11.3	100	90	10.39 (10)*	8.4-10.8
10	0	0	(0)n.a.	n.a.	60	60	10.8 (6)	10.6-10.9	90	90	10.6 (10) n.s.	10.4-11.3
14	17	0	7.7 (3)**	6.7-8.0	85	100	11.8 (26)	10.9-11.9	80	90	11.3 (23)*	10.3-11.6

A. aegypti were orally infected with fresh CHIKV and viral load (Log₁₀) determined by quantitative RT-PCR in bodies and heads or wings/ legs (for viral dissemination). Median copy number is based only on mosquitoes that were positive for virus. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 by Mann Whitney-U tests for the comparisons of PGYP1.out and Cairns3 each against PGYP1.out.tet. n.s., nonsignificant; n.a., not applicable.

a *Wolbachia* infection in *A. fluviatilis* mosquitoes indicating that this species of mosquito was naturally infected with *Wolbachia*. PCR using *Wolbachia* general *wsp* primers (Braig et al., 1998; Zhou et al., 1998) amplified a fragment from all *A. fluviatilis* tested. Sequence of the amplified DNA indicated that this *Wolbachia* strain (named *wFlu*) belongs to the *Wolbachia* B supergroup and is distantly related to *wMelPop-CLA*. qPCR analysis revealed that the density of *wFlu* in *A. fluviatilis* is about 20-fold lower than the density of *wMelPop-CLA* in *A. aegypti* (Figure S3). We then examined the tissue localization of *Wolbachia* in both mosquito species and whereas *wMelPop-CLA* is distributed throughout most tissues of the mosquito including the fat body, anterior midgut, muscle, nervous tissue, malpighian tubules and ovaries, *wFlu* is present only in ovaries, malpighian tubules and less frequently in the head, but absent from ommatidia (Figures 4 and S3).

Immunity Genes

To examine whether resistance of *Wolbachia* infected mosquitoes to pathogen infection may be related to stimulation or priming of the mosquito innate immune system, we quantified the expression of a sample of immune genes. It was recently demonstrated that some immune genes are differentially regulated in *A. aegypti* mosquitoes infected with dengue virus (Xi et al., 2008). Interestingly, regulation of the immune pathway genes in these mosquitoes was also stimulated by their natural gut microbiota and rearing mosquitoes aseptically, and so depleting their bacterial flora, resulted in a 2-fold increase of dengue virus in the midgut (Xi et al., 2008). We chose a subset of the genes that were shown to be upregulated upon dengue virus infection to assess the effect of *Wolbachia* infection on the mosquito immune system.

The expression levels of eleven immune pathway genes in the *wMelPop-CLA* infected PGYP1.out and its uninfected control line were compared for two independently reared cohorts of mosquitoes (Figure 5). In each of the experiments four genes encoding representatives of the immune effector molecules cecropin, defensin, thio-ester containing proteins (TEP) and C-type lectins were significantly upregulated in the presence of *wMelPop-CLA*, whereas FREP18 (fibrinogen-related protein 18) levels remained unchanged (Figures 5A and 5B). In contrast, while a statistically significant ($p < 0.05$) differential mRNA expression between mosquitoes with and without *Wolbachia* was observed for a subset of the genes from the Toll, IMD and Jak/STAT signaling pathways (Figure 5C Experiment 1-Rel 1A and SOCS36E; Figure 5D Experiment 2 - IMD and Rel 2) these differences were inconsistent across the two experiments, suggesting that the variation between cohorts was greater than any differences induced by *Wolbachia*. In addition, in these cases the fold-change of mRNA expression was low (below 2-fold), whereas the effector genes were induced as much as 100-fold by the presence of *Wolbachia* (Figure 5A and 5B). These results indicate that the presence of *wMelPop-CLA* in mosquitoes stimulates expression of at least some immune effector genes, although a clear stimulation of the classical innate immune signaling pathways was not repeatedly identified.

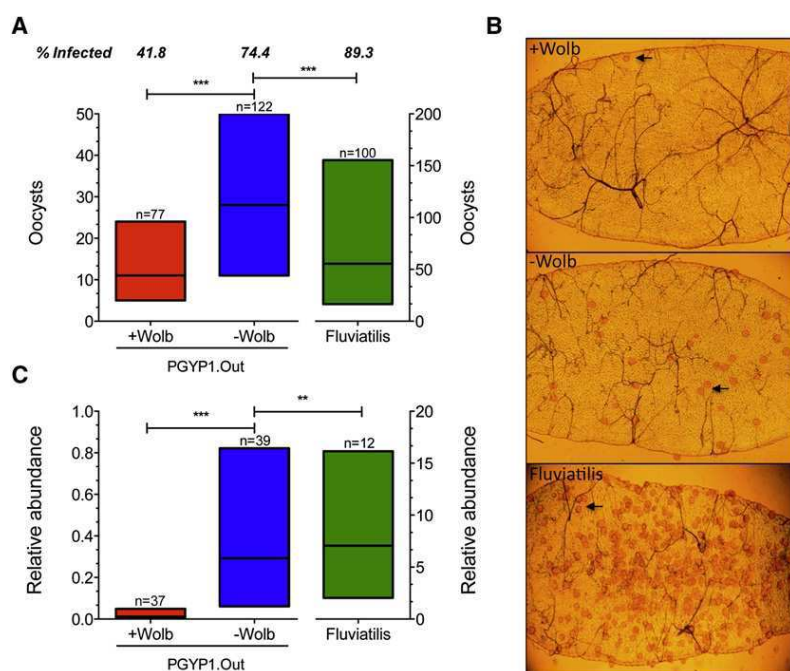


Figure 3. *Plasmodium gallinaceum* Detection in *Aedes* spp. Mosquitoes

A. aegypti and *A. fluviatilis* mosquitoes were fed on *P. gallinaceum* infected chickens and parasite was detected.

(A) Box plots of median numbers and 25 (bar below median) and 75 (above median) percentiles of oocyst intensities, 7 days postinfection in wMelPop-CLA infected (PGYP1.out, +Wolb) or uninfected (PGYP1.out.tet, -Wolb) *A. aegypti* and in *A. fluviatilis* mosquitoes (** $p < 0.0001$ by Mann-Whitney U test). Percentage of mosquitoes containing at least one oocyst is shown above the graph.

(B) Mercurochrome staining of mosquito midguts showing *P. gallinaceum* oocysts (arrows) in wMelPop (+Wolb) infected and uninfected (-Wolb) and in *A. fluviatilis* mosquitoes, seven days post-infection (100× magnification).

(C) Quantitative PCR analysis 15 days after infection showing the relative abundance of *Plasmodium* 18S ssu rRNA sequences in comparison to Actin gene (** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$ by Mann-Whitney U test). See also Figure S2.

DISCUSSION

The finding that the wMelPop-CLA *Wolbachia* infection reduces the ability of two distantly related arboviruses and a malaria parasite from establishing productive infections in the mosquito shows that the pathogen interference effect of the wMelPop-CLA strain is general and fundamental. The mechanism is currently unclear although our data suggest that immune effector genes are upregulated in the mosquito in the presence of the wMelPop-CLA strain and are likely to play a role, even though key components of the currently accepted signaling pathways for these effectors do not seem to be transcriptionally modulated by *Wolbachia*.

It is also possible that the observed interference effect might relate to competition for key host cell components. This is supported by the observation that DENV-2 infection was only observed in *Wolbachia* infected mosquitoes in cells that lacked the *Wolbachia* infection (Figure 2G). It is known, for example, that insects need to obtain cholesterol and other fatty acids from their diet (Blitzer et al., 2005) and that *Wolbachia* and related bacteria also lack the biosynthetic capability to synthesize cholesterol and need to obtain it from the host insect (Lin and Rikihisa, 2003; Wu et al., 2004). In addition cholesterol is known to be a key fatty acid required for successful Flavivirus and Alphavirus replication that must be obtained from the host cell (Lu et al., 1999; Mackenzie et al., 2007). Similarly *Plasmodium* is also known to depend on host lipids in the mosquito stage (Atella et al., 2009). The relative importance of innate immune effectors and alternative mechanisms such as competition for critical host cell components such as cholesterol remains to be determined.

One critical paradox relating to *Wolbachia* infection and reductions in mosquito vector competence is the observation that some mosquito species that naturally carry *Wolbachia* infections

such as *A. albopictus* are known to be competent vectors for a range of pathogens including DENV and CHIKV. Our fortuitous discovery that our control mosquito species *A. fluviatilis* supports very high oocyst loads, despite the presence of a naturally occurring *Wolbachia* strain, allowed us to provide an explanation for this observation. It is known that different *Wolbachia* strains commonly display quite variable somatic tissue distribution and densities (Dobson et al., 1999; Dutton and Sinkins, 2004; Miller and Riegler, 2006). Our analysis of *A. fluviatilis* shows that the wFlu *Wolbachia* strain has a very restricted tissue tropism in its host mosquito (Figures 2, 5, and S3) and overall *Wolbachia* densities are much lower (20-fold) than the wMelPop-CLA infection in *A. aegypti* (Figure S3A). This likely explains why no *Plasmodium* interference effect is observed in this species and may explain why *A. albopictus* is known to be a competent vector for arboviruses while being naturally infected with *Wolbachia*. The wMelPop *Wolbachia* strain in *Drosophila* is known to be unusual in that it grows to high densities (Min and Benzer, 1997) and has broad tissue tropism in *A. aegypti* (Figures 2 and 5), which may underpin its ability to so effectively interfere with both virus replication and parasite development.

Our results have significant implications for any future control measure based on the use of life-shortening *Wolbachia*. Currently the wMelPop-CLA infection has been demonstrated to reduce average mosquito lifespan by approximately 50% in the laboratory (McMeniman et al., 2009) that while sufficient to greatly reduce transmission could still allow some mosquitoes to live longer than the extrinsic incubation period for most human pathogens. The observed interference effect reported here appears sufficiently strong that it would act in conjunction with the life-shortening effect to control arbovirus transmission. Life-shortening effects on mosquitoes would become secondary and only act on individuals that might escape the direct viral

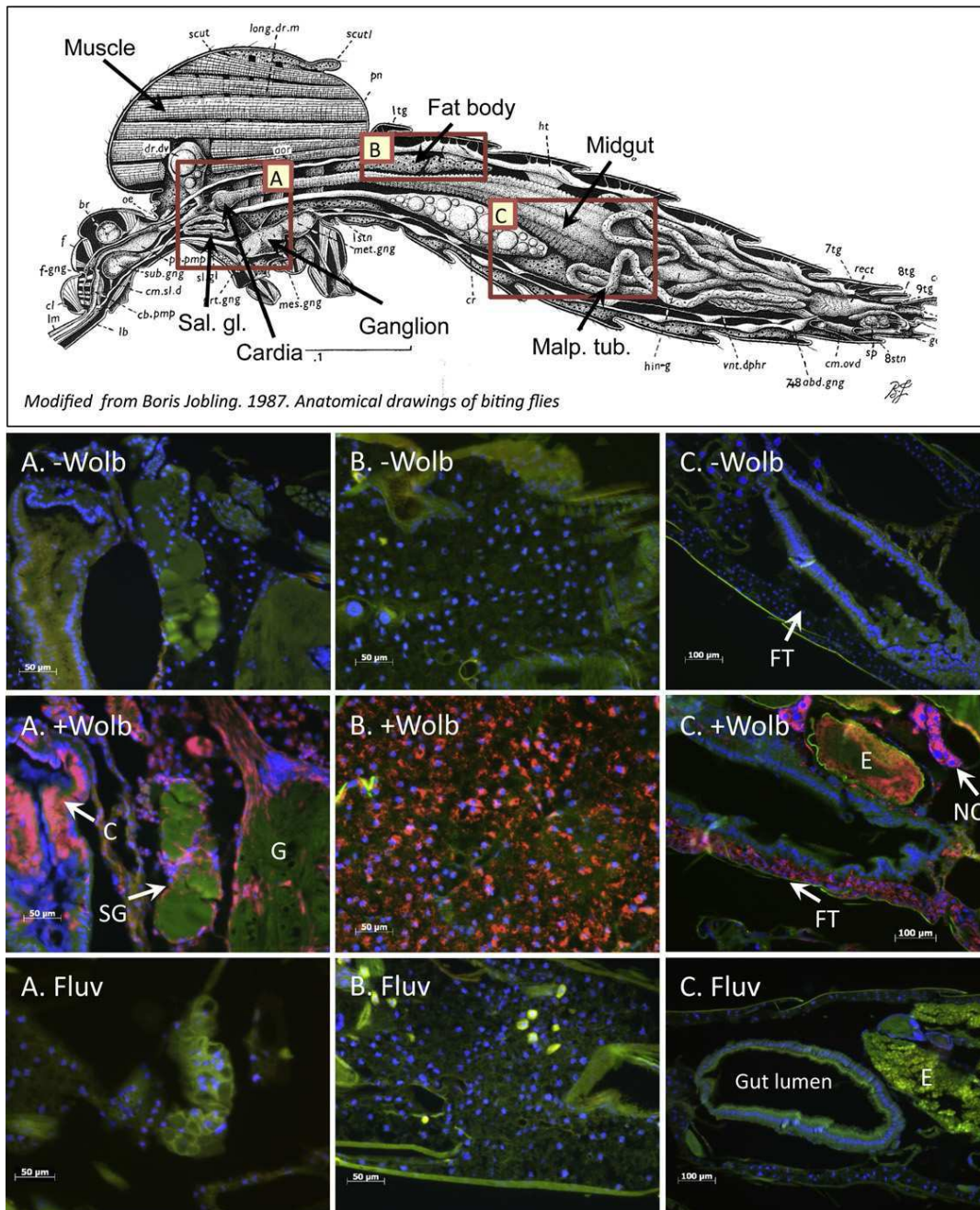


Figure 4. *Wolbachia* Distribution in *Aedes* spp. Mosquitoes

Fluorescence in situ hybridization showing the localization of *Wolbachia* (in red) in different tissues of *A. aegypti* and in *A. fluviatilis* mosquitoes. Sections were hybridized with two *Wolbachia* specific 16S rRNA probes labeled with rhodamine. DNA is stained with DAPI (blue). A green filter is used to provide contrast. The top diagram has been adapted from (Jobling, 1987).

(A) Anterior part of the digestive system, showing the salivary glands (SG) and the cardia (C), together with the thoracic ganglion (G) of uninfected *A. aegypti* (-Wolb), PGYP1.out (+Wolb) and *A. fluviatilis* mosquitoes. Panels B). Fat tissue showing the presence of *wMelPop-CLA* in PGYP1.out (+Wolb) mosquitoes but absence of the bacteria in PGYP1.out.tet (-Wolb) and in *A. fluviatilis*. C) *wMelPop-CLA* is present in the fat tissue (FT) surrounding the gut in PGYP1.out

interference effect. The combined action of two distinct *Wolbachia* effects, lifespan reduction and virus interference, should also reduce the risk of resistance formation to the strategy.

The inhibitory effect of *wMelPop-CLA* *Wolbachia* against *P. gallinaceum* is a promising step toward the possible application of this strategy to control human malaria. *Anopheles*

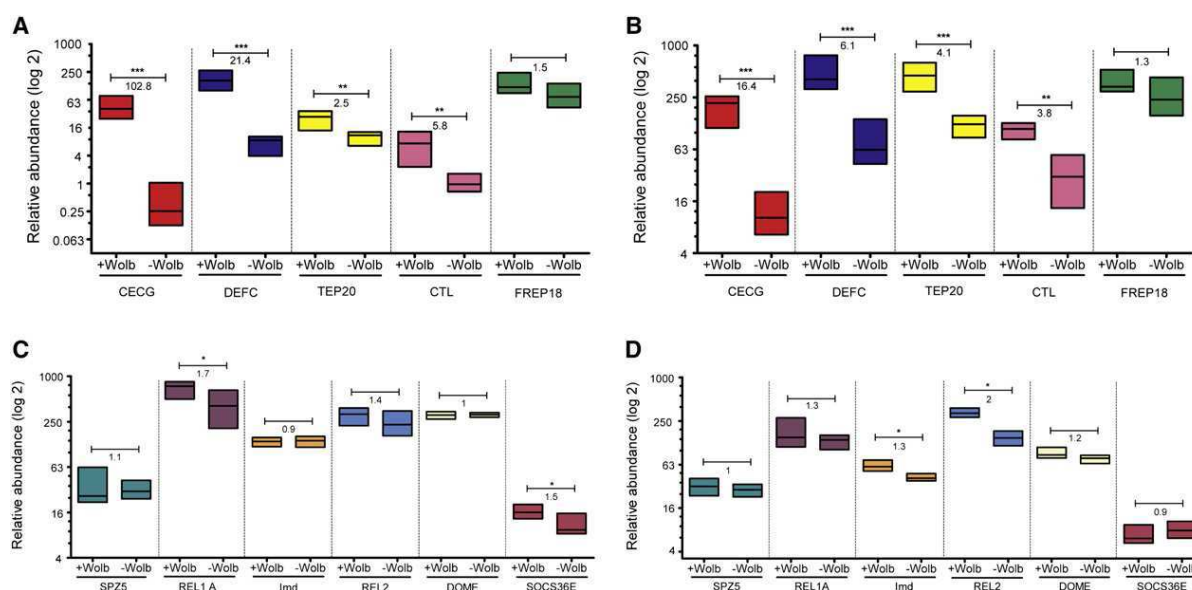


Figure 5. Immune Gene Regulation in Response to *Wolbachia* Infection

RT-qPCR analysis of mRNA expression from selected immune genes of PGYP1.out and PGYP1.out.tet mosquitoes. Graphs show the target gene to house-keeping gene ratio for the genes indicated from the immune pathways. Box plots of median numbers and 25 (bar below median) and 75 (above median) percentiles of 10 individual mosquitoes from a single cohort. Results from two independently reared cohorts are shown (cohort 1 [A and C]; cohort 2 [B and D]). Statistically significant medians by Mann Whitney-U test ($p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$) are indicated. Fold-change for the gene is shown above the box plots.

mosquitoes, as *A. aegypti*, are not naturally infected with *Wolbachia*, therefore transinfection experiments into these vector species are crucial to determine whether *Wolbachia* can also block human malaria in anopheline vectors. As the bacterium is able to establish somatic infection in the human malaria vector *Anopheles gambiae* (Jin et al., 2009), it is likely that the same interference effect may also be present when a stable infection of *Wolbachia* becomes available.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mosquitoes

Five different *A. aegypti* lines were used including the original inbred wMel-Pop-CLA infected line (PGYP1) and its tetracycline-cured counterpart PGYP1.tet (McMeniman et al., 2009). A genetically diverse line derived from PGYP1, named PGYP1.out was generated by backcrossing PGYP1 for three generations to F1 males of 52 independent field-collected isofemale lines from Cairns, Australia. Two further generations of backcrossing were conducted with F2 field-collected material (wild-type from Cairns, Australia). The backcrossing scheme used here is expected to replace 96.9% of the original inbred genotype. A tetracycline-cured counterpart (PGYP1.out.tet, -Wolb) was generated by antibiotic treatment of backcrossed adults, followed by two generations of recovery and re-colonization with gut bacteria as previously described (McMeniman et al., 2009). A genetically diverse wild-type line was also generated at the same time from field-collected material sourced from 245 ovitraps across seven suburbs of Cairns, Australia in late 2008 and named Cairns3. For the malaria experiments, a susceptible *A. fluviatilis* strain (Rodrigues et al., 2008) was used in parallel with PGYP1.out (+ Wolb) and PGYP1.out.tet (-Wolb) *A. aegypti* mosquitoes.

Insects were kept in a controlled environment insectary at 25°C, ~80% RH, 12 hr light regime. Larvae were maintained with fish food pellets (Tetramin, Tetra) and adults were offered 10% sucrose solution, *ad libitum*. Adult females

were blooded on human volunteers (UQ human ethics approval 2007001379; QIMR approval P361) for egg production. Three- to five-day-old female mosquitoes were used for the DENV and malaria infection experiments. Seven day old females were used for the CHIKV experiments.

Viruses

Dengue virus

Dengue virus serotype 2 (DENV-2) (92T) was isolated from human serum collected from a patient from Townsville, Australia, in 1992. Virus stocks were passaged five times in *Aedes albopictus* cell line (C6/36) grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), and 1× glutamax (Invitrogen), and maintained at 28°C.

Supernatants from infected cell lines (C6/36) were collected 5 days after infection, separated into 0.5 ml aliquots, and frozen at -80°C. Virus used in microinjection experiments was obtained from thawed stocks of above and had a titer of $10^{7.6}$ CCID₅₀ per ml. To prepare the DENV-2 for oral feeding, the frozen virus stock was passaged once more through C6/36 cells and the supernatant was harvested at 5 d and then mixed with blood to formulate a bloodmeal for feeding. Virus solution with higher titer ($10^{8.85}$ CCID₅₀/ml) was obtained by harvesting the viral supernatant and the intracellular virus from cell lysates.

Chikungunya Virus

CHIKV strain 06113879, isolated from a viremic traveler returning from Mauritius to Victoria, Australia in 2006 was provided by the Victorian Infectious Diseases Research Laboratory, Melbourne, Australia. Cultures were grown at 37°C in Vero (African green monkey kidney) cells for 4 days before the supernatant was harvested and frozen at -80°C. This CHIKV stock was passaged once more in Vero cells and the virus was concentrated from 1.8 L of infected culture supernatant via ultracentrifugation at 10 000 g for 17 hr at 4°C. Pelleted virus was resuspended in 20 ml of Opti-MEM® reduced serum medium (GIBCO BRL®, Invitrogen, California) supplemented with 10% FCS before aliquots of the prepared virus were frozen at -80°C. The stock concentration had a final viral titer of $10^{8.0}$ CCID₅₀/ml.

Exposure of Mosquitoes to Viruses Intrathoracic Injection with DENV-2

Female mosquitoes were briefly anesthetized with CO₂ and placed on a glass plate over ice. Insects were handled with forceps under a dissecting scope and injected into their thorax (pleural membrane) with a pulled glass capillary and a handheld microinjector (Nanoject II, Drummond Sci.). 69 μ l of DENV-2 stock was injected into each mosquito, which corresponds to approx. 2,750 virus particles/ mosquito. (See Supplemental Experimental Procedures for details).

Oral Feeding with DENV-2 and CHIKV

Mosquitoes were starved for 24 hr and then transferred to 1L or 2.5L plastic feeding containers. Prior to feeding, DENV-2 was harvested from C6/36 cell culture supernatant and diluted 1:5 in defibrinated sheep's blood. For the CHIKV experiments, frozen aliquots of stock virus were rapidly thawed, and diluted in washed defibrinated sheep blood and 1% sucrose. Blood-virus mixtures were maintained at 37°C for 1 hr and 4 hr for DENV-2 and CHIKV, respectively, using membrane feeders (Rutledge et al., 1964) and covered with a porcine intestine as the membrane. After feeding, mosquitoes were anesthetized using CO₂ and partially or non-engorged mosquitoes were discarded (see Supplemental Experimental Procedures for details).

Cell Culture Enzyme Immunoassays

Titration of DENV-2 and CHIKV stocks and blood/virus mixtures was performed using a CCEIA method (Broom et al., 1998). For DENV-2, C6/36 cell monolayers (60%–90% confluent) in 96-well plates were inoculated with 50 μ l/well of virus dilutions and plates were incubated at 28°C with 5% CO₂ for 5 d. Cell monolayers were then fixed and examined for DENV-2 antigens using a cocktail of flavivirus cross-reactive monoclonal antibodies (4G4 and 4G2) (Clark et al., 2007; Gentry et al., 1982). For CHIKV, all titrations were performed in Vero cells, which were incubated at 37°C with 5% CO₂. After 7 days, plates were examined for cytopathic effect (CPE), which was confirmed using the CCEIA and the broadly reactive alphavirus monoclonal antibody, B10 (Broom et al., 1998).

Plasmodium gallinaceum

Two to three day-old White Leghorn chickens were infected through intra-peritoneal or intradermal injection of *Plasmodium gallinaceum* 8A strain parasitized blood (Rodrigues et al., 2008). Parasitemia was determined every other day through Giemsa-stained blood smears. Ten microscopic fields were examined under immersion oil to count one hundred red blood cells and determine the ratio of infected cells. Presence of gametocytes and rising parasitemia was ensured in order to enhance the chance of mosquito infection. Before infection mosquitoes were deprived of sugar solution overnight and on the next morning chickens were placed on top of the cages and mosquitoes were fed for about 45 min. Only bloodfed female mosquitoes were kept for further observations. Four independent experiments were performed with independent cohorts. Seven days after bloodfeeding mosquitoes had their midguts dissected in 1 PBS and after staining the midguts with 0.2% Mercurchrome solution oocysts were counted under a microscope (DIC, 100X). Fifteen days after infection mosquitoes were collected and DNA was extracted (QIAGEN Blood & Tissue kit) for *Plasmodium* detection, using around 1 ng of genomic DNA in quantitative PCR reactions. Primers for the *Plasmodium* spp. 18S ssu rRNA gene (Schneider and Shahabuddin, 2000) were used for parasite amplification and *A. aegypti* Actin was used as a host control gene (primer sequences in Supplemental data). Analyses were performed with qGENE (Joehanes and Nelson, 2008) and Mann Whitney-U tests (STATISTICA V8, StatSoft, Inc.) to compare relative abundance between lines.

Quantitative DENV PCR Analysis

Individual frozen mosquito bodies or body parts were placed into 2 ml screw cap vials with a glass bead (2 mm diameter, Sigma-Aldrich). 200 μ l of Trizol (Invitrogen) was added and the sample homogenized for 150 s using a Mini BeadBeater (Biospec Products). 40 μ l of chloroform was added to each tube and samples were thoroughly vortexed for 10 s. Tubes were centrifuged for 15 min at 14,000 g and 4°C and the supernatant containing the RNA was transferred to new tubes. RNA was precipitated with 40 μ l of isopropanol, washed with 200 μ l of 70% ethanol and resuspended in 25 μ l of RNase-free

milli-Q water. Samples were maintained at –80°C until further analysis (See Supplemental Experimental Procedures for details).

CHIKV RT-qPCR Analysis

Individual frozen mosquito bodies and heads or legs and wings were homogenized for 3 min in 1 ml of Opti-MEM® reduced serum medium using glass beads and a mechanical homogenizer (Spex Industries, Edison, NJ). The supernatant from each sample was removed for potential virus isolation and stored at –80°C. The remaining mosquito pellet from each sample was resuspended in 200 μ l of Opti-MEM® reduced serum medium and TRIzol® LS reagent (Invitrogen) and homogenized again as described above. After incubation at room temperature for 5 min and addition of 40 μ l of chloroform, the entire homogenate for each sample was then vortexed for 15 s and transferred to a pre-spun Phase Lock Gel Heavy tube (5 Prime, GmbH, Germany). The lysed contents of each tube were allowed to settle for 5 min and organic and aqueous phases were separated by centrifugation at 16,000 g for 10 min. Aqueous phases were recovered from each tube before total RNA was extracted using a modification of the RNeasy Mini Kit protocol (QIAGEN, Australia) and on column-DNase treatment. RNA was eluted with 30 μ l of RNase-free H₂O and a final centrifugation step for 1 min. RNA samples were stored at –80°C prior to analysis by RT-qPCR. RNA standards were produced for the relative quantification of CHIKV RNA copy numbers normalized to RNA levels of the *A. aegypti* house-keeping gene RpS17 (See Supplemental Experimental Procedures for details).

Immune Genes

PGYP1.out and PGYP1.out.tet mosquitoes were analyzed by RT-qPCR for a selection of immune genes. Two biologically independent cohorts of 10 sugar-fed, 5–6 day old, female mosquitoes were collected and analyzed from each mosquito line. Total RNA was extracted from whole mosquitoes using TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc.) or RiboZol (AM-RESCO). The RNA samples were DNase treated (Promega) and reverse transcribed using random primers and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative PCR was carried out as per Platinum SYBR Green protocol (Invitrogen). Primer sequences for REL1, REL2, CECG and DEFC were obtained elsewhere (Xi et al., 2008) and the other primers were designed using gene sequences obtained from VectorBase (see Supplemental data). The temperature profile of the qPCR was 95°C for 2 min, 50°C for 2 min and 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 20 s. The house-keeping gene RpS17 (Cook et al., 2006) was used to normalize expression. Target gene to house-keeping gene ratios were obtained for each biological replicate using QGene 4.2 (Joehanes and Nelson, 2008). Treatment effects on the expression ratios were examined using Mann Whitney-U tests in STATISTICA V8 (StatSoft, Inc.) and fold change was calculated by the REST method (Pfaffl et al., 2002).

Immunofluorescence

Following the removal of legs and wings, 14 dpi mosquitoes were fixed overnight at 4°C in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS, containing 0.5% (v/v) Triton X-100. Fixed mosquitoes were dehydrated in an ethanol series of 50%–100% ethanol, followed by two toluene treatments and then infiltrated with paraffin wax (Paraplast-Xtra, McCormick Scientific) at 60°C. Paraffin-embedded mosquitoes were sectioned using a rotary microtome to obtain 8 μ m sections that were adhered to superfrost plus slides (Menzel-Gläser). Slides were dried, de-paraffinated in 100% xylene, rehydrated in an ethanol series and washed in PBS-T before being blocked overnight in 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS-T at 4°C. Sections were then incubated simultaneously for 1 hr with anti-rabbit wsp (1:100) and anti-dengue (1:10) 4G4 or anti-*Plasmodium* CSP (Krettli et al., 1988) antibodies (1:100) (both monoclonal, developed in mouse), in blocking solution. Tissue sections were washed twice with PBS-T and then incubated simultaneously with Alexa-conjugated secondary antibodies (Alexa-488 developed in rabbit or Alexa-594, developed in mice, respectively, Molecular Probes, Invitrogen) diluted 1:1000 each in blocking solution for 1 hr at room temperature. After two washes in PBS-T, the slides were incubated in DAPI for 10 min, rinsed in PBS-T and then mounted using an antifading reagent (ProLong, Invitrogen). Immunostaining was analyzed with a Zeiss Axio Imager II epifluorescence microscope equipped with an

Axiocam camera, using the same exposure conditions for each filter channel. Photos are representative of at least 10 mosquitoes of each treatment.

Fluorescence In Situ Hybridization

Paraffin-embedded mosquitoes were sectioned and de-paraffinated as described above. Sections were then dehydrated in an ethanol series and hybridized overnight at 37°C in a hybridization buffer containing 4X SSC, 50% formamide, 250 mg/ml dextran sulfate, 250 µg/ml poly(A), 250 µg/ml tRNA, 250 µg/ml salmon sperm DNA, 100 mM DTT and 0.5× Denhardt's solution and 200 ng of *Wolbachia* specific 16S rRNA probes (W2: 5'-CTTCTGTGAGTACCGTCATTATC-3' and W3: 5'-AACCGACCCTATCCCTTCGAATA-3') labeled at the 3' end with rhodamine. Both probes are 100% homologous to both wMelPop and wFlu. Following overnight hybridizations, sections were washed twice in 1X SSC containing 10 mM DTT and twice in 0.5X SSC containing 10 mM DTT for 15 min each at 55°C, followed by a 10 min wash at 0.5× SSC containing 10 mM DTT and 1 µg/ml DAPI. Slides were briefly rinsed in water, mounted using an antifading reagent (ProLong, Invitrogen) and observed and photographed as described above.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data include three figures, one table, Supplemental Experimental Procedures, and Supplemental References and can be found with this article online at [http://www.cell.com/supplemental/S0092-8674\(09\)01500-1](http://www.cell.com/supplemental/S0092-8674(09)01500-1).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Nichola Kenny and Wai Yuen Cheah for technical support and Paul Addison and Amy Fong for help with mosquito histology. We are also thankful to Roy Hall and Natalie Prow for providing the anti-dengue and B10 antibodies, Antoniana Krettli for the anti-CSP antibody, and José Ribeiro for useful discussions on saliva collection. We are particularly thankful for wild caught mosquito material supplied by Petrina Johnson and Scott Ritchie. We would like to thank FIOCRUZ - Brazil for the support on the malaria experiments. We thank members of the O'Neill and McGraw laboratories for critical reading of the manuscript. This research was supported by a grant from the Foundation for the National Institutes of Health through the Grand Challenges in Global Health Initiative of the Bill and Melinda Gates Foundation and the National Health and Medical Research Council, Australia.

Received: September 17, 2009

Revised: November 2, 2009

Accepted: November 12, 2009

Published: December 24, 2009

REFERENCES

Adams, B., and Kapan, D.D. (2009). Man bites mosquito: understanding the contribution of human movement to vector-borne disease dynamics. *PLoS ONE* 4, e6763.

Atella, G.C., Bittencourt-Cunha, P.R., Nunes, R.D., Shahabuddin, M., and Silva-Neto, M.A. (2009). The major insect lipoprotein is a lipid source to mosquito stages of malaria parasite. *Acta Trop.* 109, 159–162.

Barclay, E. (2008). Is climate change affecting dengue in the Americas? *Lancet* 371, 973–974.

Blitzer, E.J., Vyazunova, I., and Lan, Q. (2005). Functional analysis of AeSCP-2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 14, 301–307.

Braig, H.R., Zhou, W., Dobson, S.L., and O'Neill, S.L. (1998). Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacteriol.* 180, 2373–2378.

Broom, A.K., Hall, R.A., Johansen, C.A., Oliveira, N., Howard, M.A., Lindsay, M.D., Kay, B.H., and Mackenzie, J.S. (1998). Identification of Australian

arboviruses in inoculated cell cultures using monoclonal antibodies in ELISA. *Pathology* 30, 286–288.

Brownlie, J.C., Cass, B.N., Riegler, M., Witsenburg, J.J., Iturbe-Ormaetxe, I., McGraw, E.A., and O'Neill, S.L. (2009). Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog.* 5, e1000368.

Brownstein, J.S., Hett, E., and O'Neill, S.L. (2003). The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. *J. Invertebr. Pathol.* 84, 24–29.

Clark, D.C., Lobigs, M., Lee, E., Howard, M.J., Clark, K., Blitvich, B.J., and Hall, R.A. (2007). In situ reactions of monoclonal antibodies with a viable mutant of Murray Valley encephalitis virus reveal an absence of dimeric NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 88, 1175–1183.

Cook, P.E., Hugo, L.E., Iturbe-Ormaetxe, I., Williams, C.R., Chenoweth, S.F., Ritchie, S.A., Ryan, P.A., Kay, B.H., Blows, M.W., and O'Neill, S.L. (2006). The use of transcriptional profiles to predict adult mosquito age under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18060–18065.

Cook, P.E., McMeniman, C.J., and O'Neill, S.L. (2008). Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. In *Transgenesis and the management of vector-borne disease*, S. Aksoy, ed. (Austin, TX: Landes Biosciences).

Dobson, S.L., Bourtzis, K., Braig, H.R., Jones, B.F., Zhou, W., Rousset, F., and O'Neill, S.L. (1999). *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 153–160.

Dobson, S.L., Rattanadechakul, W., and Marsland, E.J. (2004). Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* 93, 135–142.

Dutton, T.J., and Sinkins, S.P. (2004). Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Insect Mol. Biol.* 13, 317–322.

Gentry, M.K., Henchal, E.A., McCown, J.M., Brandt, W.E., and Dalrymple, J.M. (1982). Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 548–555.

Gould, E.A., and Solomon, T. (2008). Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371, 500–509.

Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., and Johnson, K.N. (2008). *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322, 702.

Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., and Werren, J.H. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*?—A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 215–220.

Jeyaprakash, A., and Hoy, M.A. (2000). Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* 9, 393–405.

Jin, C., Ren, X., and Rasgon, J.L. (2009). The virulent *Wolbachia* strain wMelPop efficiently establishes somatic infections in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3373–3376.

Jobling, B. (1987). The mosquito *Aedes aegypti*. In *Anatomical drawings of biting flies*, B. Jobling, ed. (London, British Museum (Natural History), Welcome Trust), pp. 47–80.

Joeanes, R., and Nelson, J.C. (2008). QGene 4.0, an extensible Java QTL-analysis platform. *Bioinformatics* 24, 2788–2789.

Kay, B., and Vu, S.N. (2005). New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *Lancet* 365, 613–617.

Knox, T.B., Kay, B.H., Hall, R.A., and Ryan, P.A. (2003). Enhanced vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Torres Strait compared with mainland Australia for dengue 2 and 4 viruses. *J. Med. Entomol.* 40, 950–956.

Kremer, N., Charif, D., Henri, H., Bataille, M., Prévost, G., Kraaijeveld, K., and Vavre, F. (2009). A new case of *Wolbachia* dependence in the genus *Asobara*: evidence for parthenogenesis induction in *Asobara japonica*. *Heredity* 103, 248–256.

- Krettl, A.U., Rocha, E.M., Lopes, J.D., Carneiro, C.R., Kamboj, K.K., Cochrane, A.H., and Nussenzweig, R.S. (1988). Circumsporozoite protein of *Plasmodium gallinaceum* characterized by monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.* *10*, 523–533.
- Kyle, J.L., and Harris, E. (2008). Global spread and persistence of dengue. *Annu. Rev. Microbiol.* *62*, 71–92.
- Lin, M., and Rikihisa, Y. (2003). *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect. Immun.* *71*, 5324–5331.
- Lu, Y.E., Cassese, T., and Kielian, M. (1999). The cholesterol requirement for sindbis virus entry and exit and characterization of a spike protein region involved in cholesterol dependence. *J. Virol.* *73*, 4272–4278.
- Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., and Parton, R.G. (2007). Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe* *2*, 229–239.
- McMeniman, C.J., Lane, R.V., Cass, B.N., Fong, A.W., Sidhu, M., Wang, Y.F., and O'Neill, S.L. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* *323*, 141–144.
- Miller, W.J., and Riegler, M. (2006). Evolutionary dynamics of wAu-like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 826–835.
- Min, K.T., and Benzer, S. (1997). *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 10792–10796.
- Ng, L.F., and Ojcius, D.M. (2009). Chikungunya Fever - Re-emergence of an old disease. *Microbes Infect.* *10*.1016/j.micinf.2009.09.001.
- O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., and Werren, J.H. (1997). Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction (Oxford University Press).
- Osborne, S.E., Leong, Y.S., O'Neill, S.L., and Johnson, K.N. (2009). Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathog.* *5*, e1000656.
- Pachauri, R.K., and Reisinger, A. (2007). Climate Change 2007: Synthesis Report. Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Geneva: IPCC), 104.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* *30*, e36.
- Rasgon, J.L., Styer, L.M., and Scott, T.W. (2003). *Wolbachia*-induced mortality as a mechanism to modulate pathogen transmission by vector arthropods. *J. Med. Entomol.* *40*, 125–132.
- Richardson, J., Molina-Cruz, A., Salazar, M.I., and Black, W., 4th. (2006). Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *74*, 132–141.
- Rodrigues, F.G., Santos, M.N., de Carvalho, T.X., Rocha, B.C., Riehle, M.A., Pimenta, P.F., Abraham, E.G., Jacobs-Lorena, M., Alves de Brito, C.F., and Moreira, L.A. (2008). Expression of a mutated phospholipase A₂ in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development. *Insect Mol. Biol.* *17*, 175–183.
- Rutledge, L.C., Ward, R.A., and Gould, D.J. (1964). Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq. News* *24*, 407–419.
- Schneider, D., and Shahabuddin, M. (2000). Malaria parasite development in a *Drosophila* model. *Science* *288*, 2376–2379.
- Sinkins, S.P., and O'Neill, S.L. (2000). *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In *Insect Transgenesis: Methods And Applications A*, A. James, ed. (Boca Raton: CRC Press), pp. 271–287.
- Staples, J.E., Breiman, R.F., and Powers, A.M. (2009). Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* *49*, 942–948.
- Tason de Camargo, M., and Krettl, A.U. (1981). *Aedes fluviatilis* (Lutz), a new experimental host for *Plasmodium gallinaceum* brumpt. *J. Parasitol.* *64*, 924–925.
- Teixeira, L., Ferreira, A., and Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* *6*, e2.
- Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., McGee, C.E., and Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* *3*, e201.
- Turell, M.J. (1988). Reduced Rift Valley fever virus infection rates in mosquitoes associated with plegged feedings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *39*, 597–602.
- van den Hurk, A.F., Hall-Mendelin, S., Pyke, A.T., Smith, G.A., and Mackenzie, J.S. (2009). Vector competence of Australian mosquitoes for Chikungunya virus. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, doi: 10.1089=vbz.2009.0106.
- Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T., and Hoffmann, A.A. (2007). From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biol.* *5*, e114.
- WHO. (2009). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. In Fact Sheet, W.H. Organization, ed. (WHO).
- Woodring, J.L., Higgs, S., and Beaty, B.J. (1996). Natural Cycles of Vector-Borne Pathogens. In *The Biology of Disease Vectors*, B.J. Beaty and W.C. Marquardt, eds. (Boulder, CO: University Press of Colorado), pp. 51–72.
- Wu, M., Sun, L.V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J.C., McGraw, E.A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., et al. (2004). Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipiensis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol.* *2*, E69.
- Xi, Z., Ramirez, J.L., and Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* *4*, e1000098.
- Zhou, W., Rousset, F., and O'Neil, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc Biol Sci.* *265*, 509–515.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)