

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS –UEA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – MBT

**VALIDAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL
DOS GENES ACTINA, TRIPSINA E *PHOSRRESTIN II* ENTRE
LARVAS E ADULTOS DE *Anopheles darlingi* Root, 1926
(DIPTERA: CULICIDAE)**

KETLEN CHRISTINE NUNES DE SOUZA

**MANAUS
2011**

KETLEN CHRISTINE NUNES DE SOUZA

**VALIDAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL
DOS GENES ACTINA, TRIPSINA E *PHOSRRESTIN II* ENTRE
LARVAS E ADULTOS DE *Anopheles darlingi* Root, 1926
(DIPTERA: CULICIDAE)**

ORIENTADOR: Dr. Wanderli Pedro Tadei

CO-ORIENTADORA: Dra. Míriam Silva Rafael

Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
da UEA como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia e
Recursos Naturais.

MANAUS

2011

PARECER

Os membros da Banca Examinadora, designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, reuniram-se para realizar a arguição da dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata Ketlen Christine Nunes de Souza, sob o título “**Validação do Nível de Expressão Gênica Diferencial dos Genes Actina, Tripsina e Phorrestin II entre Larvas e Adultos de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae)**”, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Após análise do referido trabalho e arguição da candidata, os membros são de parecer pela **APROVAÇÃO** da dissertação.

Manaus, 29 de julho de 2011.

Dra. Gislene Almeida Carvalho-Zilse
INPA – Membro Titular

Dra. Jorge Luis López Lozano
FMT-AM – Membro Titular

Dra. Míriam Silva Rafael
Presidente da Banca e Orientadora

Ketlen Nunes

Dedico

A DEUS, autor da vida, minha
família, ao Maks e a todos os
cristãos, confirmando minha fé.
Sou-lhes grata de todo o coração.

Ketllen Nunes

“Quanto mais me aprofundo no estudo da
Ciência da Vida, confirmo a existência de
um criador – Deus, pois criaturas tão
perfeitas não podem ser obras de um
acaso.”

Lucivana Mourão

AGRADECIMENTOS

Ao meu mais fiel Amigo: DEUS, por me ter concedido realizar este trabalho e por estar comigo em todos os minutos da minha vida concedendo forças para não desistir diante dos obstáculos. Agradeço - te, meu Senhor!

Ao Programa de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT, Universidade do Estado do Amazonas – UEA, pelo apoio desde o primeiro dia do curso.

À coordenação, secretaria e corpo docente do curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, meu sincero obrigada pelo ensino e amizade! Em especial ao Professor Lozano por expandir o meu limitado horizonte no estudo da biologia molecular. Que disciplina inesquecível...rs

Ao CNPq, FAPEAM e PRONEX – Rede Malária, pelo apoio financeiro, sem o qual não teríamos realizado esse trabalho e pela bolsa concedida.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT)/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela infra-estrutura e apoio cedidos, para a realização desta dissertação.

A minha Mãezinha Ivete e meu PAldrasto Edimar, pelo amor, renúncias, compreensão, por estarem junto a mim e me ajudarem espiritual e materialmente, meu maior agradecimento! Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

A minha grande família, em especial, meus Avós Tales e Maria Fonseca, minha prima Joyce, minha Tia-madrinha Sony e Tio Gutemberg, pela ajuda dispensada em muitos momentos, por me amarem e acreditarem na minha conduta, além de me ensinarem e educarem até hoje, mesmo estando geograficamente distantes!

Ao meu Amorzinho Maks, por estar ao meu lado sempre e compartilhar também das minhas dificuldades e não só das alegrias; por me ajudar sempre que precisei, por entender meu estresse e minha ausência em alguns momentos, pelo companheirismo, sinceridade, muitíssimo obrigada! *Ich liebe dich...*♥

Em especial aos meus queridos Orientadores: Dr. Wanderli Pedro Tadei e Dr^a. Míriam Silva Rafael, pela paciência, horas e horas de orientação, pelo carinho, incentivo incondicional e confiança depositados em mim, por acreditar no meu trabalho e no meu potencial estudantil, ainda em processo de crescimento. Muito obrigada a vocês, pela verdade constante e pelo convívio harmonioso!

Ao Mestre Cleverson Mattioli (nosso QuiTUTTY), pela ajuda, sugestões e orientação constantes durante os experimentos na UNICAMP. Pelos inúmeros *e-mails* com dicas e conhecimento compartilhado; pela paciência e alegria contagiantes.

Ao Dr. Michel Vicentz por ter gentilmente nos recebido e cedido a infraestrutura de seu laboratório na UNICAMP, para realizar a metodologia da (qRT-PCR).

À Dra. Vera Val, por ter gentilmente concedido seu laboratório para as corridas de algumas placas de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). E ao Ramon por ajudar inicialmente na manipulação do *Real Time*. MUITÍSSIMO obrigada!

À Dra. Gislene Almeida Carvalho Zilse, por contribuir com “empréstimo” de alguns reagentes enquanto os nossos não chegavam e pelas palavras de incentivo.

Às “culpadas” por eu ter me apaixonado pela biologia molecular: Dra. Jaqueline Batista, MSc. Kyara Formiga. Meus sinceros agradecimentos Jac e Kyara por terem me ensinado grande parte do pouco que sei hoje e me “iniciarem” na pesquisa científica quando eu ainda estava no primeiro ano da graduação.

Aos meus Amigos do peito e do conhecimento da turma MBT/2009: Paulinha, Marcinha, Dulci, Ydrielly, Eunice, Douglas, Sandro, Bruno, Paulo, Andrey por todos os dias de convívio durante as disciplinas, pelas horas de boa conversa na padaria durante o esperado intervalo das aulas de biologia molecular avançada, pelas brincadeiras, pelas gargalhadas, pela ajuda necessária, pelo companheirismo e claro pela amizade de vocês, agradeço!

Ao meus Amigos (minha segunda família) do Laboratório de Malária de Dengue da Coordenação de Pesquisa em Ciências da Saúde e do LTBM, no INPA pelo excelente convívio, aprendizado, respeito, carinho, companheirismo e pela “mesa quadrada” do café com ciência: Letícia (Lê), Giselle (Gi), Gilson (Gilbelândia) Pedro (“lá in nós”), Paulinha, Sabrina e Wancléia. Sou grata a Deus pela amizade de todos vocês...

Às queridas Adelina e Zilá que providenciavam as “suítes brancas” para cada fêmea ovipor no insetário.

Muito obrigada a toda turma da casa 15 pelo apreço e convívio harmonioso: Carlos, Bosco, Gervilane e Rosely por uma das principais contribuições, que é a identificação dos mosquitos coletados; Gláubio, Antônio Francisco (Catita), Acelino, Henrique, Raimundo, Bastos e Nonato pelas coletas de anofelinos que “teimavam em se esconder” por causa das chuvas; Rodrigo pela confecção do mapa dos locais de coleta; Rejane, por ter cedido vários adultos separados para o seu trabalho, quando eu precisei aumentar o n das amostras, mas eu não tinha condições de coletar naquele momento; às meninas da salinha – Waléria, Érica, Marla, Keillen e Rochelly, pelo convívio e por simples, mas importantes manifestações de ajuda. E em especial ao Alex que diariamente era (e continuará sendo) incomodado por mim sempre que eu precisava de algo, funcionando como as pontes de Hidrogênio que ligam o dinucleotídeo A=T (A de aluna-eu e T de Tadei), pela paciência, ajuda contínua e amizade eu agradeço!

Aos meus Amigos de longa data e irmãos em Cristo: Aldenora Vital; Domingas; Flávia Baêtas; Iglair e Roque Oliveira; Samuel Padilha; Lidiane e Neildo, pelo amor, pelas orações freqüentes e por acreditarem na conclusão e sucesso desse trabalho, quando eu mesma me senti impotente.

Enfim, agradeço imensamente a todas as pessoas que me auxiliaram tanto na realização dessa dissertação como as que, de alguma forma, contribuíram para minha formação intelectual e pessoal, com palavras ou atos de incentivo.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA -----	1
1.1 <i>Anopheles darlingi</i>	1
1.2 Situação e epidemiologia da malária	2
1.3 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)	5
1.4 Análise de expressão gênica e a busca de genes de interesse em mosquitos da malária	7
2. OBJETIVOS -----	11
2.1 Geral	11
2.2 Específicos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	12
3.1 Coleta e criação de <i>An. darlingi</i>	12
3.2 Extração de RNA total de <i>An. darlingi</i>	12
3.3 Quantificação do RNA total	14
3.4 Tratamento do RNA total com DNase	14
3.5 Desenho para síntese de <i>primers</i>	14
3.6 Obtenção de Cdna	15
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) clássica	15
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)	16
3.9 Quantificação Relativa dos genes de interesse de <i>An. darlingi</i>	17
3.10 Análise estatística	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	18
4.1 Níveis de expressão relativa dos genes GAPDH, Actina, Tripsina e <i>Phosrestin II (Arrestin A)</i> de <i>An. darlingi</i>	18
4.1.1 Análise de expressão relativa do gene GAPDH de <i>An. darlingi</i>	19
4.1.2 Análise de expressão relativa do gene Actina de <i>An. darlingi</i>	21
4.1.3 Análise de expressão relativa do gene Tripsina de <i>An. darlingi</i>	26
4.1.4 Análise de expressão relativa do gene <i>Phosrestin II (Arrestin-A)</i> (<i>Arrestin-A</i>) de <i>An. darlingi</i>	29

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

Ketlen Nunes

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Genes de interesse dos bancos de ESTs de <i>Anopheles darlingi</i> (Contigs 68: Actina; 433: GAPDH; 517: Tripsina e 637: <i>Phosrestin II</i> (Arrestin-A))	15

Ketlen Nunes

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Espécime adulto de <i>Anopheles darlingi</i> Root, 1926	1
FIGURA 2	Mapa do Brasil, destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual	4
FIGURA 3	Local de coleta de espécimes de <i>Anopheles darlingi</i> (larvas e adultos): Bairro Puraquequara (PQ), Município de Manaus, Amazonas.	12
FIGURA 4	Termociclo da Reação em Cadeia da Polimerase <i>in vitro</i> - PCR clássica	16
FIGURA 5	Perfis eletroforéticos de cada extração de RNA total de larvas (L3a, L3b) e adultos (fêmeas 4 ha, 4hb, 14 h e 24 h) de <i>Anopheles darlingi</i> com amostras tratadas nos pocinhos (01 a 05) e não tratadas (06) com DNase, em gel desnaturante de agarose a 1%, corado com gel red.	18
FIGURA 6	Amplificação dos fragmentos de cDNA de larvas e adultos de <i>Anopheles darlingi</i> , utilizando o <i>primer</i> de GAPDH, por meio da qRT-PCR (7500 Sistem SDS Software – Applied Biosystems®). O quadro na cor preta em destaque, no canto inferior direito, mostra os valores de (Ct) de cada réplica técnica.	20
FIGURA 7	Quantificação relativa (RQ) de GAPDH em <i>Anopheles darlingi</i> dado em valores de média \pm desvio padrão.	21
FIGURA 8	Amplificação dos fragmentos de cDNA de larvas e adultos de <i>Anopheles darlingi</i> , utilizando o primer de Actina, por meio da qRT-PCR (7500 Sistem SDS Software – Applied Biosystems®). O quadro na cor preta em destaque, no canto inferior direito, mostra os valores de Ct de cada réplica técnica.	22
FIGURA 9	Quantificação relativa (RQ) de Actina em larva e adulto de <i>Anopheles darlingi</i> , dado em valores de média \pm desvio padrão	23
FIGURA 10	Normalização <i>in silico</i> de Actina (gi 113215 sp P18600 ACT1_ARTSX Actin, clone 205 >gi 5663 emb CAA) para os clusters mais expressos nas bibliotecas de L1L2 e adultos de <i>Anopheles darlingi</i> do Banco de Dados Valine (CENARGEN) – DA: Darlingi/Adulto.	24
FIGURA 11	Amplificação dos fragmentos de cDNA de larvas e adultos de <i>Anopheles darlingi</i> , utilizando o primer de Tripsina, por meio da	26

qRT-PCR (7500 Sistem SDS Software – Applied Biosystems®). O quadro na cor preta em destaque, no canto inferior direito, mostra os valores de Ct de cada réplica técnica.

- FIGURA 12 Quantificação relativa (RQ) de Tripsina em diferentes estágios de desenvolvimento de *Anopheles darlingi* (larva e adulto) dado em valores de média \pm desvio padrão. 27
- FIGURA 13 Normalização in silico de Tripsina (gi|157113343|ref|XP_001657786.1| trypsin [*Aedes aegypti*] gi|108877776|gb|EAT42001.1| trypsin [*Ae. aegypti*]) para o cluster mais expressos em cada biblioteca de *Anopheles darlingi* do Banco de Dados Valine (CENARGEN) – DA: Darlingi/Adulto e LA: Larva. 28
- FIGURA 14 Amplificação dos fragmentos de cDNA de larvas e adultos de *Anopheles darlingi*, utilizando o primer de Arrestina (*Phosrestin II (Arrestin-A)*), por meio da qRT-PCR (7500 Sistem SDS Software – Applied Biosystems®). O quadro na cor preta em destaque, no canto inferior direito, mostra os valores de Ct de cada réplica técnica. 29
- FIGURA 15 Quantificação relativa (RQ) de *Phosrestin II (Arrestin-A)* (Arrestina) em diferentes estágios de desenvolvimento de *Anopheles darlingi* (larva e adulto) dado em valores de média \pm desvio padrão. 30
- FIGURA 16 Normalização in silico de *Phosrestin II (Arrestin-A)* (Arrestina) (gi|157113343|ref|XP_001657786.1| trypsin [*Aedes aegypti*] gi|108877776|gb|EAT42001.1| trypsin [*Aedes aegypti*]) para o cluster mais expressos em cada biblioteca de *Anopheles darlingi* do Banco de Dados Valine (CENARGEN) – DA: Darlingi/Adulto e LA: Larva. 30

RESUMO

VALIDAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DOS GENES ACTINA, TRIPSINA E PHOSRESTIN II (ARRESTIN-A) ENTRE LARVAS E ADULTOS DE *Anopheles darlingi* Root, 1926 (DIPTERA: CULICIDAE). Universidade do Estado do Amazonas. Rua Carvalho Leal, N° 1777 CEP: 69055-001. Manaus – AM, NUNES-SOUZA, K.C.; RAFAEL, M.S; TADEI, W.P. ketlenchris@gmail.com; miriamsilvarafael.r@gmail.com; wptadei@gmail.com.

O *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 é o vetor primário da malária que apresenta a mais acentuada antropofilia e endofagia entre os anofelinos sul americanos, com os maiores registros de casos da doença na Amazônia. A malária é uma parasitose que afeta mais de 90 países no mundo, onde cerca de 40% da população vivem em áreas de risco, pois há dificuldades para o seu controle. Nos últimos anos, estudos alternativos de detecção e quantificação da expressão gênica têm sido realizados, como a amplificação e análise de fragmentos de cDNA, pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR), uma das tecnologias mais empregadas na era pós-genômica. Nesse sentido, validou-se o nível de expressão de genes amostrados *in silico*, previamente, entre dois estágios de desenvolvimento de *An. darlingi* (larvas e adultos). Amostras de *An. darlingi* foram obtidas no Bairro Puraquequara (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), Município de Manaus, Estado do Amazonas, identificadas e tratadas de forma individual para oviposição. Larvas de 1° e 2° estádios foram utilizadas para extração de RNA total com o *Kit* de extração e purificação *Quiagen*®. Obteve-se a fita complementar de RNAm (cDNA), com o *Kit* da Promega®. O método da qRT-PCR foi segundo o sistema *SYBR® Green (Applied Biosystems®)* e as reações de amplificações do cDNA realizadas no termociclador *ABI-7500™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems®*. Analisaram-se por expressão gênica quatro genes de interesse: Actina, Tripsina, Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e *Phosrestin II (Arrestin-A)*. Dentre estes, GAPDH mostrou pouca variação no nível de expressão gênica em larvas e adultos. Portanto, este foi escolhido como gene de referência. As larvas (L1L2) foram escolhidas como normalizadoras das reações de amplificações. Na quantificação relativa, a Actina foi mais expressa em adulto comparativamente com larvas, o que valida os resultados normalizados de nível de expressão *in silico* da biblioteca de *ESTs* de *An. darlingi*. Tripsina foi expressa principalmente em larvas. Em *An. darlingi* a *Phosrestin II (Arrestin-A)* foi mais expressa em larvas do que em adultos. Estes dados validaram a expressão gênica diferencial entre L1L2 e adultos de *An. darlingi*, útil para entender a biologia e evolução gênica desse importante vetor da malária da América do Sul.

Palavras chaves: *Anopheles darlingi*, expressão gênica, qRT-PCR, malária.

Área de concentração: Expressão gênica.

Linha de Pesquisa: Genética de vetores da malária.

ABSTRACT

VALIDATION OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION LEVEL OF GENES ACTIN, AND TRYPSIN PHOSRESTIN II (ARRESTIN-A) BETWEEN LARVAE AND ADULTS OF *Anopheles darlingi* Root, 1926 (DIPTERA: CULICIDAE).

State University of Amazonas. Oak Street Fair, 1777. Zip code: 69055-001. Manaus – AM, NUNES-SOUZA, K.C.; RAFAEL, M.S; TADEI, W.P. ketlenchris@gmail.com; miriamsilvarafael.r@gmail.com; wptadei@gmail.com.

The *Anopheles* (Nyssorhynchus) *darlingi* Root, 1926 is considered the primary vector of malaria and the species has the sharpest endophagous and anthropophily between the South American anopheline, with the biggest records in the Amazon region. Malaria is a parasitic disease that affects more than 90 countries worldwide, where about 40% of the population live in areas at risk because they are difficult to control. In recent years, studies of alternative detection and quantification of expression gene have been carried out, as the amplification and analysis of cDNA fragments by the method of Polymerase Chain Reaction in Real Time (qRT-PCR), one of the technologies employed in post-genomic age. In this sense, validated the level of genes expression sampled *in silico*, in advance, between two stages of development of *An.darlingi* (larvae and adults). *An. darlingi* samples were obtained in the neighborhood Puraquequara (03° 03' 06.95" S and 59° 52' 31.38" W), of Manaus City, Amazonas State, identified and treated individually for oviposition. Larvae of the 1st or 2nd instar were used for total RNA extraction with the Extraction and Purification Quiagen® Kit. We obtained the complementary strand of mRNA (cDNA) with the kit from Promega®. The qRT-PCR method was according to the system SYBR® Green (Applied Biosystems®) with reactions performed in the ABI-7500 thermocycler™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems®. Was analyzed for gene expression, four genes of interest: Actin, Trypsin, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Phosrestin II (Arrestin-A). Among these, GAPDH showed little variation in their level of gene expression in larvae and adults. Therefore, this gene was chosen as reference. Larvae (L1L2) were chosen as normalizing the amplification reactions. In relative quantification, the actin expression was higher in adult compared with larvae, validating the results normalized level of expression *in silico* library of ESTs from *An. darlingi*. Trypsin was mainly expressed in larvae. In *A. darlingi* the Phosrestin II - (Arrestin-A) expression was higher in larvae than in adults. These data validate the differential gene expression between L1L2 and adults of *An. darlingi*, useful for understanding the biology and evolution gene of this important malaria vector in South America.

Keywords: *Anopheles darlingi*, gene expression, qRT-PCR, malaria.

Area of concentration: Gene expression.

Research Line: Genetics of malaria vectors.

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

1.1 *Anopheles darlingi*

Mosquitos do gênero *Anopheles*, da família Culicidae (Subfamília: Anophelinae), constituem a maioria dos insetos economicamente e clinicamente importantes em todo o mundo (LOAIZA, et al., *in press*). *Anopheles darlingi* Root, 1926 (**Figura 1**) pertence ao Reino *Animalia*, Filo *Arthropoda*, classe *Insecta*, ordem *Diptera*, família *Culicidae*; gênero *Anopheles* e subgênero *Nyssorhynchus* (SERVICE, 1996).



Fonte: Acervo Laboratório de Malária e Dengue/INPA

Figura 1 – Espécime adulto de *Anopheles darlingi* Root 1926.

Anopheles darlingi possui características próprias que são fundamentais para sua identificação. Estudos sobre distribuição geográfica e isoenzimas (SANTOS et al., 1985,1999; ROSA-FREITAS et al., 1992; FREITAS-SIBAJEV et al., 1995), comportamento e DNA mitocondrial (ROSA-FREITAS et al., 1992; FREITAS-SIBAJEV et al., 1995; CONN et al.,1999), DNA repetitivo (RAFAEL et al., 2003), DNA de sequência única (RAFAEL et al., 2004) e DNA microssatélites (SCARPASSA e CONN, 2007; LIMA et al., 2010) mostram que *An.darlingi* é uma espécie monotípica.

Caracteres morfológicos mostram que *An. darlingi*, na fase adulta apresenta asas com manchas claras e escuras; na veia C (costa) apresenta área escura ph (mancha pré-umeral) de tamanho grande, com envergadura correspondente a três ou mais que da área clara h (mancha umeral); no tarso posterior, apresenta o segundo tarsômero (Ta-2) com cerca de 0,50 de escuro basal, enquanto os tarsômeros 3 a 5 são totalmente claros (FORATTINI, 2002).

Anopheles darlingi é o principal vetor da malária na região amazônica, onde ocorre a maioria dos casos (cerca de 90%) no Brasil (ARRUDA et al., 1986; TADEI et al., 1998, 2007; TADEI e DUTARY-TATCHER, 2000). Um dos principais fatores biológicos que concorrem para a transmissão da malária é a acentuada antropofilia (TADEI et al., 1998) e susceptibilidade desse anofelino à infecção por espécies do gênero *Plasmodium* (ZIMMERMAM, 1992).

Anopheles darlingi está distribuído em cerca de 80% de todo território nacional (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Dados epidemiológicos demonstram que, após a prática de controle a densidade desse mosquito, assim como de outros anofelinos, mantém-se alta em localidades onde ocorrem os registros da malária na região (TADEI et al., 1998).

A distribuição geográfica de *An. darlingi* ocorre no território sul-americano a leste dos Andes, na Colômbia, Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai, Argentina, Brasil e nas Guianas. Em território brasileiro, só não é encontrado nas áreas secas do Nordeste, no extremo Sul do País (abaixo da foz do rio Iguaçu) e nas áreas de elevada altitude. Ocorre em áreas de baixas altitudes, quase sempre associado aos grandes cursos de água e florestas do interior, mas ocorre também no litoral (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; LOUNIBOS e CONN, 2000). Na Amazônia os seus principais habitats são as águas pretas e ácidas que sofrem modificações de acordo com os pulsos de enchentes e vazantes, que propiciam a existência de uma diversidade e densidade de *An. darlingi* e outros anofelinos (TADEI et al., 1998).

1.2 SITUAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A malária ou paludismo é uma parasitose que ocorre em mais de 90 países no mundo, onde afeta cerca de 40% da população mundial, que convivem com os riscos da doença. Na década de 40, a malária já era considerada um problema de saúde pública, contaminando cerca de 6 milhões de pessoas (TADEI et al., 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003 e 2009). A malária ocorre em cerca de 107 países e territórios de regiões tropicais dos continentes africano, asiático e Américas (PASSOS e FIALHO, 1998). Em tais regiões, cerca de 3,2 bilhões de habitantes estão expostos à infecção, causada pelos agentes etiológicos

da malária (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*), cuja taxa de incidência varia de 350 a 500 milhões de casos por ano, levando a óbitos cerca de 1,5 a 2,3 milhões de pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

No Brasil, as espécies envolvidas com a transmissão da malária humana pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* (*An. darlingi*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles oswaldoi*, *Anopheles triannulatus* e *Anopheles albitarsis*) e *Kerstezia* (*Anopheles cruzii*) (ARRUDA et al., 1986; TADEI et al., 1998, 2007; TADEI e DUTARY-TATCHER, 2000).

A malária é endêmica na Amazônia legal, onde 99,8% dos casos ocorrem em diversos Estados brasileiros: Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Atualmente, o quadro epidemiológico da malária no Brasil é preocupante. O *P. vivax* é a espécie causadora de quase 90% dos casos. Porém, a transmissão do *P. falciparum*, sabidamente responsável pela forma grave e letal da doença, tem apresentado redução importante nos últimos anos. Embora a frequência de internações por malária no Brasil tenha mostrado declínio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), é considerável o número de casos de malária registrados anualmente, nos últimos 10 anos, com média de 304 mil casos por ano. Até o primeiro semestre de 2010, o número total de casos registrados foi de 132 mil (Ministério da Saúde/Sivep-Malária, 2010). A distribuição espacial do risco de transmissão da doença no Brasil é apresentada na **Figura 2**.

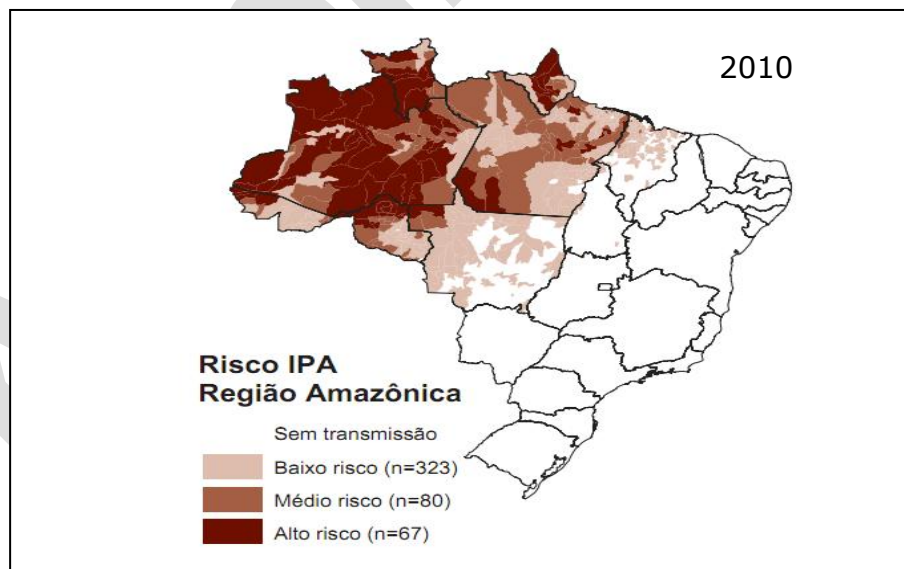


Figura 2 - Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual.

Embora sejam constantes as tentativas de controle de mosquitos vetores da malária, falta vacina contra as espécies do gênero *Plasmodium* resistentes a drogas e inseticidas sintéticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Estudos para o diagnóstico de resistência de

vetores a inseticidas sintéticos têm sido a partir de bioensaios ou análises por meio da biologia molecular. Os resultados têm auxiliado na compreensão dos mecanismos de resistência de insetos a produtos químicos em geral, além de auxiliar na escolha de inseticidas com potencial interesse para controle e levantamento de áreas, onde habitam populações de mosquitos resistentes a controle químico e a drogas anti-maláricas (BROGDON et al., 1998).

O complexo ecossistema amazônico proporciona diversidade e densidade de anofelinos com padrões comportamentais em áreas específicas diferentes, estabelecendo dinâmicas de transmissão distintas. A variação de densidade populacional de *An. darlingi* na Amazônia mostrou que a sazonalidade da espécie, assim como os casos de malária, estão correlacionados com o ciclo hidrológico da região. No início do período chuvoso (novembro), a densidade de anofelinos é baixa elevando gradativamente conforme aumenta o nível pluviométrico concomitante ao aumento do nível das águas dos rios até junho, com maior densidade de mosquitos entre os meses de abril a junho. Na proporção em que aumenta a densidade do vetor, elevam-se os casos de malária, com maiores valores de casos registrados entre os meses de julho a setembro (TADEI et al., 2007).

Ainda conforme menciona Tadei e colaboradores (2007), a Amazônia é considerada uma grande rede de interações biológicas dinâmicas e complexas, que vem se mostrando sensível aos efeitos do aquecimento global, em decorrência de diversos fatores, como as ações antrópicas desordenadas, novas rodovias, grandes projetos na área de agricultura, pecuária, hidrelétricas, mineração, entre outros. Estes empreendimentos, em decorrência das intensas alterações ambientais que desencadeiam, levam a um contato maior entre o homem e a mata, provocando um desequilíbrio da interação homem/parasito/vetor. Dentre os 62 municípios do Estado do Amazonas, há 21 com 81,8% dos casos de malária autóctones. Somente no primeiro semestre de 2010, a cidade de Manaus concentrou a maior porcentagem dos casos (15,1%), seguida da cidade de Coari (6,9%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SIVEP-MALÁRIA, 2010).

Nos últimos anos, novos estudos visando auxiliar no controle da malária têm se intensificado, por meio de diversas metodologias da biologia molecular moderna (CHEN, et al., 2008), tal como o método da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR).

1.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

As análises da expressão gênica, nos últimos anos, têm sido utilizadas por meio de métodos de *Northern Blot*, *RNase Protection Analysis*, RT-PCR tradicional, *Macro* e *Micro-*

array, *Real Time PCR* (qRT-PCR) e, conforme a literatura, vários desses métodos são caros e envolvem trabalho excessivo, e, além disso, pode ser semi-quantitativo (BUSTIN, et al. 2006). Dentre esses motivos, optou-se por realizar o método de PCR em tempo real. Esse método é de dois tipos: 1) Quantificação Relativa e 2) Quantificação Absoluta. No ensaio de Quantificação Relativa são analisadas alterações na expressão gênica em uma determinada amostra relativa à outra amostra de referência (amostra controle não tratada). Permite quantificar o nível de expressão de um gene alvo específico, entre diferentes amostras, podendo mostrar variações no número de vezes em cada nível de expressão. O ensaio de quantificação absoluta é utilizado para quantificar amostras desconhecidas interpolando suas quantidades a partir de uma curva padrão (BUSTIN, et al. 2006).

O método de *PCR* em Tempo Real é uma reação de polimerização em cadeia *in vitro*, na qual se obtém o aumento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação de modo exponencial (MULLIS, 1990).

Segundo Bustin e colaboradores (2006), o método de qRT-PCR assemelha-se à PCR clássica. A PCR em Tempo Real é capaz de monitorar o progresso da PCR, registrando seus dados durante o ciclo da reação, incluindo o número de cópias para cada amostra ao invés da quantidade de alvo acumulado ao final de um número fixo de ciclos. Os dados são desta forma, coletados ao longo da PCR, ao invés de serem apenas no final da reação. Isso revolucionou completamente o modo de abordagem da quantificação de RNA pela PCR. Esse método utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Quanto mais elevado for o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência. São obtidos gráficos da qualidade e da quantidade das cópias do material genético amplificado.

Além disso, o método da PCR em Tempo Real permite que seja adicionado um composto fluorescente, o corante *Sybr Green I*, que na reação, possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita e detecta o produto da PCR, enquanto ele se acumula durante os ciclos da reação. Assim, na proporção em que a enzima DNA polimerase *AmpliTaq Gold* amplifica a sequência alvo, vai criando os produtos de PCR, ao mesmo tempo o *Sybr Green I* se liga a cada nova cópia amplificada. O nível de fluorescência computado para cada amostra é aquele suficiente para atingir um ciclo limiar. Por convenção, esse limiar é denominado de *Ct* (*Cyclelet treshold*). Ao final da reação, essa intensidade da fluorescência será proporcional à quantidade do produto gerado pela PCR em tempo real (PAIVA e AYRES, 2006). Neste método têm sido utilizados fragmentos de DNA nuclear ou mitocondrial para identificar espécies crípticas do gênero *Anopheles* como o complexo *An. gambiae* (COLLINS e PASKEWITZ, 1996).

Sim e colaboradores (2005), que utilizaram a proteína *Heat Shock* (HSC70B) em *An. gambiae*, verificaram em presença de RNA de interferência (RNAi) a supressão do vírus *o'nyong-nyong* em fêmeas infectadas desse mosquito.

1.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E A BUSCA DE GENES DE INTERESSE EM MOSQUITOS DA MALÁRIA

Entre as novas alternativas para o controle de mosquitos vetores de parasitoses, ferramentas metodológicas moleculares modernas, com auxílio da manipulação de organismos vivos, têm sido utilizadas para gerar sequências nucleotídicas completas, voltadas para o estudo da estrutura e função de genes e proteínas (BASSET et al., 1996). Cita-se o sequenciamento do transcriptoma de *An. gambiae*, vetor da malária no Continente Africano (HOLT et al. 2002) e *Anopheles funestus* (CRAWFORD et al. 2010). A geração das primeiras Etiquetas de Sequências Expressas (*Expressed Sequences Tags - ESTs*) de *An. gambiae* foram obtidas a partir de bibliotecas de cDNA do genoma humano (ADAMS et al., 1991; BOGUSKI, 1995). A análise de mais de 35.000 clones de uma biblioteca enriquecida de cDNA de *An. gambiae* possibilitou identificar e caracterizar quase 3.700 genes, além do seu agrupamento e anotação nos bancos de dados genômicos e proteômicos (GOMEZ et al., 2005). Estes dados incluíram um grande número de genes não anotados anteriormente, que foram disponibilizados em bancos de dados públicos. Métodos de identificação de *ESTs* têm sido eficientes para caracterizar centenas e milhares de genes expressos em tecidos e células (ADAMS et al., 1991), mapear genes (SCHULER, 1997) e gerar fragmentos de sequências expressas de organismos eucariotos (BOGUSKI e SCHULER, 1995). Neste sentido, caracterizar genes expressos em mosquitos anofelinos, por meio do sequenciamento de *ESTs* clonadas em vetor plasmidial, ou de fragmentos de DNA clonados em *BACs* (Cromossomos Artificiais de Bactérias) ou Cosmídeos tem sido muito útil para o estudo de genes expressos, mapeamento físico e genético e auxiliar estudos que visem a produção e utilização de bio-produtos de interesse na resistência a inseticidas, visando o controle de vetores da malária (SHARAKHOVA et al., 2007).

A primeira abordagem de análise global, para determinar níveis de expressão gênica foi baseada no sequenciamento massivo de transcritos (*ESTs*) (ADAMS et al., 1995), particularmente útil para uma descoberta de novos genes, mas extremamente trabalhoso e dispendioso. Então, Calsa e colaboradores (2004) desenvolveram abordagens alternativas para uma detecção e quantificação da expressão gênica em nível genômico. Tais tecnologias foram diferenciadas em três grupos: i) hibridização de sondas, ii) sequenciamento de regiões específicas de fragmentos de DNA (*TAGS*) e iii) análise de

fragmentos de cDNA amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esses métodos de análise global da expressão gênica também podem ser classificados em outras duas categorias: sistemas fechados, que analisam sequências já conhecidas, ou abertos, que não exigem o conhecimento prévio das sequências dos genes em estudo. A análise global por sistema fechado inclui o método de hibridização, enquanto que os de análise de fragmentos de DNA, RNA e aqueles amplificados via sequenciamento são caracteristicamente métodos abertos.

Marcadores de DNA e RNA têm sido utilizados para estudar genes de interesse no controle de vetores de importância epidemiológica, constituindo-se em um dos maiores desafios da ciência, principalmente em estudos de organismos eucarióticos. Um dos métodos moleculares largamente utilizados é estudo do RNA mensageiro (RNAm), RNA responsável pela codificação de informações genéticas fornecidas pelo DNA. Porém, como a molécula de RNAm é muito instável pois possui apenas uma fita com as suas bases nitrogenadas e demais estruturas, sendo necessário sintetizá-la em uma molécula mais estável, como o DNA (CALSA et al., 2004). Para isso, utiliza-se a enzima Transcriptase Reversa (RT), que é capaz de sintetizar o RNAm em um DNA complementar (cDNA).

Entre as dezenas de milhares de *ESTs* há sequências gênicas expressas de interesse como aqueles genes envolvidos na resistência de mosquitos a inseticidas químicos. Citam-se os genes da *Glutathione S-Transferase (GST)* em *Aedes aegypti* (HEMINGWAY, 2004) e o mutante, cujo mecanismo de resistência é conhecido por *knockdown (kdr)*, em *An. gambiae*, onde ocorre a troca de um aminoácido leucina pela fenilalanina (DIABATE, 2004; SIMARD, 2006).

Considerando-se a resistência de mosquitos anofelinos a inseticidas sintéticos e a dificuldade no controle efetivo da malária, no presente trabalho, a partir da anotação automática dos bancos de *ESTs* geradas de bibliotecas de cDNAs de *An. darlingi*, de amostras do Lago Coari, Município de Coari, Estado do Amazonas (RAFAEL et al., 2005; 2008; NUNES-SOUZA et al., 2007), fêz-se a busca de genes de resistência a inseticidas por similaridade com outros anofelinos, em bancos de dados públicos. Essa busca envolveu, além da identidade das *ESTs* de *An. darlingi* com outros anofelinos, a combinação de análises de sequências gênicas de *An. darlingi in silico* em cromossomos politênicos de *An. gambiae* e mapeamento físico de *ESTs* de *An. darlingi* em seus cromossomos politênicos, de suas glândulas salivares (BRIDI, 2009). A busca de sequências de genes de interesse do transcriptoma de *An. darlingi* foi por homologia, com apoio dos Centros de Bioinformática, do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e Sysbiol da Universidade de Campinas (UNICAMP), com banco do genoma funcional de *An. gambiae*, em especial, e outros

mosquitos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Citam-se os *contigs* 68 (Actina), 637 (*Phosrestin II (Arrestin-A)*), 517 (Tripsina) e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH).

O gene GAPDH está envolvido no metabolismo da glicólise (TRISTAN, 2011) e outros processos celulares como reparo de DNA (MEYER-SIEGLER, et al., 1991); exportação de RNAt (SINGH e GREEN, 1993); fusão de membrana e transporte (GLASER e GROSS, 1995; TISDALE, 2001); dinâmica do citoesqueleto (KUMAGAI e SAKAI, 1983) e morte celular (SAWA, et al., 1997; HARA, et al., 2005).

A Actina está presente em todas as células eucarióticas e é altamente conservada em níveis nucleicos e sequências de aminoácidos (FYRBERG et al., 1980; ZAFAR e SODJA, 1983; MOUNIER et al., 1987; HADDEN e SODJA, 1994). Em artrópodes pode ser dividida em três grupos funcionais: Actina do citoesqueleto, Actina dos músculos de adultos e Actinas dos músculos de larvas-adultos, (SALAZAR et al., 1994).

A Tripsina é a principal enzima responsável pela digestão da alimentação sanguínea em anofelinos (BILLINGSLY e HECKER, 1991).

A *Phosrestin II (Arrestin-A)* é uma proteína quinase fotoreceptora, da Família *Arrestin-A*, que desempenha um papel importante na tradução de fotorreceptores (MATSUMOTO e YAMADA, 1991). As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP e a fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas (MATSUMOTO e YAMADA, 1991; MATSUMOTO, 1994). A *Arrestin-A* na mosca *Calliphora* atua como uma proteína regulatória que controla a fosforilação, bem como a desfosforilação do pigmento visual activado pela luz (PLANGER et al. 1994).

No presente trabalho, os *contigs* 68 (Actina), 637 (*Phosrestin II (Arrestin-A)*), 517 (Tripsina) e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) das bibliotecas de cDNA de larvas (L1L2) e adultos de *An. darlingi* (RAFAEL et.al., 2008 e AZEVEDO-JUNIOR, 2011) foram selecionados para a sua validação experimentalmente, porque em sua anotação automática (*in silico*) apresentaram altos e baixos níveis diferencialmente expressos, já que o teste estatístico de Fisher (1922), utilizado nessa anotação, não permite viés em seus resultados.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Validar o nível de expressão de genes amostrados *in silico*, previamente, entre 2 estágios de desenvolvimento (bibliotecas de *ESTs* de larvas e adultos) de *An. darlingi*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenhar *primers* para amplificar os genes Actina, *Phosrestin II (Arrestin-A)*, Tripsina e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) das bibliotecas de cDNA de larvas e adultos de *An. darlingi*;
- Padronizar o nível de expressão relativa de Actina, *Phosrestin II (Arrestin-A)* (Arrestin A), Tripsina, pares de *primers* de transcritos (cDNA) de larvas contra o cDNA de adultos de *An. darlingi*, utilizando GAPDH como gene constitutivo;
- Analisar o nível de expressão relativa, para validar os genes expressos Actina, *Phosrestin II (Arrestin-A)*, Tripsina e GAPDH na biblioteca de cDNA de larva contra os genes expressos da biblioteca de cDNA de adultos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E CRIAÇÃO de *An. darlingi*

As coletas de *An. darlingi* adultos (fêmeas) foram realizadas na Zona Leste, no bairro de Puraquequara – PQ (S 03° 03' 06.95" e W 59° 52' 31.38"), Município de Manaus, Estado do Amazonas, nos seguintes pontos: Sítio do Carlão e PQ, Km 09. As coletas foram realizadas sob licença do IBAMA N° 17524 (**Figura 3**).

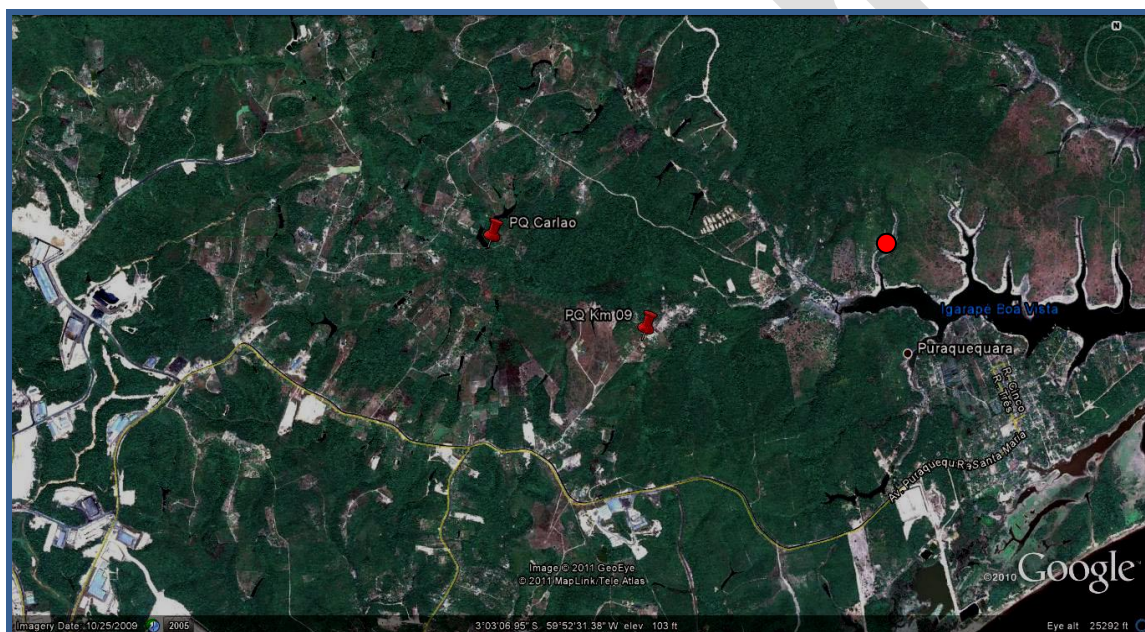


Figura 3 - Local de coleta de espécimes de *Anopheles darlingi* (larvas e adultos): Bairro Puraquequara (PQ), Município de Manaus, Estado do Amazonas.

Os exemplares capturados foram transportados ao Laboratório de Vetores da Malária e Dengue, da Coordenação Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS)/INPA, onde os espécimes foram identificados, segundo chaves taxonômicas de Forattini (1962); Faran e Linthicum (1981); Consoli e Lourenço de Oliveira (1994). As fêmeas coletadas foram mantidas para oviposição, sob temperatura média de 27° C. Após

eclosão dos ovos, as larvas de 1^o e 2^o estádios de *An. darlingi* foram congeladas no freezer - 80°C, para posterior extração de RNA total.

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE *An. darlingi*

Larvas de 1^o e 2^o estádios (L1L2) de *An. darlingi* (n=120) em triplicata (n=360) e adultos (n=30) em triplicata (n=90) foram utilizados para extração do RNA total (RNAt) (100 µg), aproximadamente, cada extração com o kit de extração e purificação *Quiagen*[®] adaptado para *An. darlingi*. Os adultos não foram alimentados com sangue ou sacarose, porém as larvas foram alimentadas, no intervalo de um dia. Esses exemplares foram oriundos de criação de insetário do INPA.

Larvas e adultos foram adicionados, separadamente, em microtubo de 2 mL em um isopor com nitrogênio líquido para maceração. Em seguida, adicionou-se 450 µl de tampão RLT. Submeteu-se o microtubo contendo a amostra macerada ao agitador.

Transferiu-se o lisado a uma coluna spin *QIAshredder* para um microtubo de 2 mL e centrifugou-se por 2 minutos na velocidade máxima. Transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para novo microtubo. Adicionou-se 0,5 volume de etanol (96-100%) ao lisado e misturou-se, imediatamente, por pipetagem. A amostra foi transferida para uma coluna de spin *RNAeasy*, colocado em um tubo de coleta de 2 mL. Centrifugou-se o material por 15s a (≥ 10.000 rpm). Descartou-se o material coletado e reutilizou-se a mesma coluna nas próximas etapas.

Adicionaram-se 700 µl de tampão RW1 à coluna spin *RNeasy*, centrifugou-se por 15s a (≥ 10.000 rpm) e descartou-se o escoamento. Repetiu-se a lavagem, na mesma coluna, e colocou-se 500 µL tampão RPE. A coluna spin *RNeasy* foi colocada em um novo tubo de coleta de 1,5 mL, e acrescentou-se 30 µL de água livre de diretamente à membrana da coluna de rotação. Centrifugou-se por 1 minuto (≥ 10.000 rpm). O microtubo RNA total foi estocado em - 80 °C.

Réplicas biológicas de ótima qualidade são extremamente relevantes para a obtenção de bons resultados. Porém, as extrações de RNA total de larvas de *An. darlingi* oferecem baixo rendimento, devido a contaminantes intestinais (bactérias), que dificultam obter mais material amplificado e sequenciado de interesse. Além disso, para a extração de RNAt é necessária uma quantidade elevada de larvas (1^o e 2^o estádios), pois estas possuem massa de baixo peso. Assim, aumentou-se o *n* amostral de larvas e adultos (anteriormente de 10 adultos e 60 larvas), para 30 e 120, respectivamente, de *An. darlingi* coletados na natureza.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

A quantificação do RNA total foi realizada por meio do gel desnaturante de agarose a 1% em tampão MOPS 1X (ácido 3-[N-morfolino] propanesulfônico), por eletroforese horizontal a 100 V, por 40 minutos. Os acessórios da cuba em contato com gel e tampão foram previamente tratados com peróxido de Hidrogênio a 10%, por 20 minutos, e lavados com água mili-Q DEPC (Dietilpirocarbonato), por 3 vezes.

3.4 TRATAMENTO DO RNA TOTAL COM DNase

As amostras de RNA total foram tratadas com tampão DNase 10X, DNase, RNaseOUT *Ambion*[®] Turbo, conforme o fabricante. Adicionou-se cerca de 6 µg do RNA total e água livre de DNA. O material foi incubado por 30 minutos, a 37 °C e fez-se a inativação do DNA, na amostra do RNA, com 2 µL de tampão de inativação *Ambion*[®] Turbo, por 5 minutos. Centrifugou-se a 10.000 RPM, por 10 minutos a 4 °C e foram recuperados cerca de 15 µL do sobrenadante (3,75 µg de RNA), com concentração final de ~0.25ug/µL.

3.5 DESENHO E SÍNTESE DE PRIMERS

Os *primers* das sequências escolhidas foram desenhados com o auxílio do Programa *Gene Runner*. Os parâmetros utilizados, no referido programa, para desenho de cada par de *primers* foram os seguintes: *Tm* de 58-60 °C; GC% de 60. Foram retirados os *hairpins* e *dímeros*.

Inicialmente, foi escolhida uma região de aproximadamente 150 pares de bases (pb) das *ESTs* de interesse de *An. darlingi*, próxima à região 3' UTR. Optou-se por essa região, pois a transcriptase reversa pode não estender a amplificação até o começo do gene e utilizou-se oligo-dT que anela na cauda *poli-A* e, a partir daí, a transcriptase reversa começa a polimerização. Desenhar os possíveis *primers* próximos à região 3' UTR aumenta a probabilidade de abranger todos os RNAm. Em seguida verificou-se nesse *amplicon*, uma região que fosse composta por metade GC e AT, de aproximadamente 20 pb (e conferiu-se a *Tm* no *GeneRunner*, que foi de 60 graus, calculadas pela fórmula: $Tm=4x(G+C)+2x(A+T)$). A síntese dos *primers* desenhados foi realizada pela *Integrated DNA Technologies IDT*[®] (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Genes de interesse dos bancos de ESTs de *Anopheles darlingi* (Contigs 68 – Actina; 433 – GAPDH; 517 – Tripsina e 637 – *Phosrestin II* (*Arrestin-A*) (*Arrestin-A*)).

Genes	Oligonucleotídeos	Sequências (5' – 3')	Referências
Endógeno	GAPDH de <i>An. darlingi</i> Contig433	Fw: 5'-CGAGTACGGCTACTCCAACC-3'	Banco de dados da biblioteca de cDNA de <i>An. darlingi</i> do INPA < https://valine.cenargen.e mbrapa.br/Anopheles200807/ >
		Rv: 5'-CTGGCACACAAGTGAGGCTA-3'	
Genes de interesse	Actina de <i>An. darlingi</i> Contig 68	Fw: 5'-TCGTGCGTGACATTAAGGAG-3'	
		Rv: 5'-GCAGCTCGTACGACTTTTCC-3'	
	Tripsina de <i>An. darlingi</i> Contig 517	Fw: 5'-TTCGAAAGGAAACCGTATCG-3'	
		Rv: 5'-ATCCGTTGGAGATGATCGAG-3'	
	<i>Phosrestin II</i> (<i>Arrestina</i>) Contig 637	Fw: 5'-CTTGCTCGGGTCTTGATG-3'	
		Rv: 5'-ATACCCGACGCTGGCTTC-3'	

3.6. OBTENÇÃO DE CDNA

Para a síntese da fita complementar de RNAm (cDNA) utilizou-se o *kit Promega*, segundo as instruções do fabricante. Após a quantificação do cDNA fêz-se padronização de sua concentração, para posterior amplificação por PCR em Tempo Real, sendo que para a obtenção do cDNA, em um microtubo de 0,5 mL, adicionou-se 6 µg de RNA total tratado com DNase e 1,5 µL de oligo-dT *Invitrogen*[®]. Submeteu-se ao agitador e spin por 10.000 RPM, a 4 °C. Incubou-se o microtubo com RNA em 70 °C durante 10 min. E colocou-se em gelo, posteriormente adicionou-se os reagentes: tampão 5x, MgCl₂, dNTP, *RNAseOUT*, enzima *Transcriptase Reversa RT – Impron II* e completou-se o volume final de 11,5 µL (por amostra) com água DEPC. Submeteu-se o microtubo contendo o mix ao agitador por 10.000 RPM, a 4 °C. Adicionou-se a cada microtubo com RNA, o volume total de 11,5 do mix. Incubou-se o microtubo com RNA em 42 °C durante 40 min; posteriormente em 65 °C durante 15 min e estocou-se em -20 °C.

3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR CLÁSSICA)

Fêz-se a amplificação dos genes GAPDH, Actina, Tripsina e *Phosrestin II* (*Arrestin-A*), pelo método da PCR clássica, para testar e validar os *primers* sintetizados. Cada reação foi composta pela adição dos reagentes: 2 µL de Tampão 10x, 1 µL de MgSO₄, 1 µL de dNTP 10mM, 0,5 µL de cDNA de *An. darlingi*, água Mili-Q (q.s.p.) e 13,35 µL de *Taq Hi-Fi*. De cada par de *primer* a 10 µM foi adicionado 1 µL ao microtubo, cujo valor total da reação para cada amostra foi de 20 µL. O termociclo da reação é mostrado na **Figura 4**:

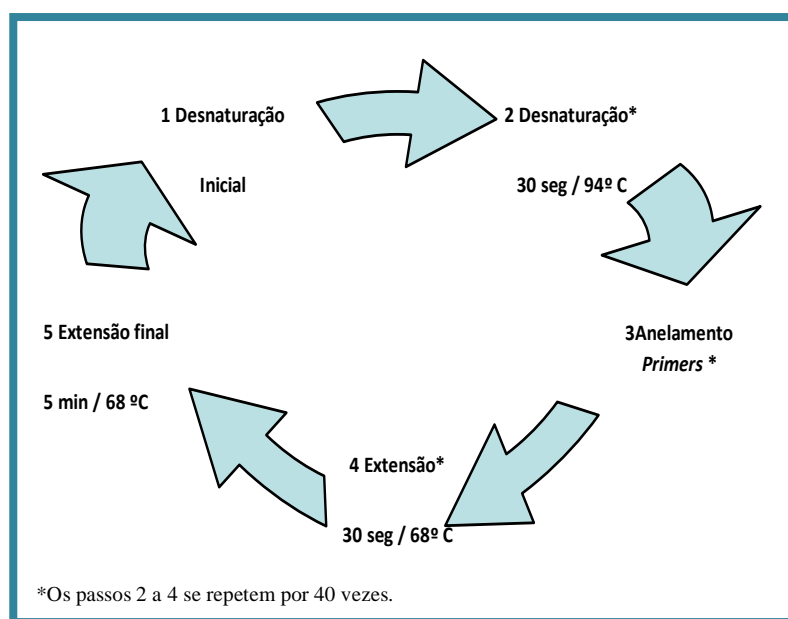


Figura 4 - Termociclo da Reação em Cadeia da Polimerase *in vitro* - PCR clássica

3.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR QUANTITATIVA (QRT-PCR)

A qRT-PCR foi realizada, de acordo com protocolo para o sistema *SYBR Green*[®] (*Applied Biosystems*[®]), adaptado para *An. darlingi*. Realizaram-se dois *mixes*, sendo que o primeiro *mix* para cada reação foi composto por: *SYBR Green*, *ROX* a 50 nM e água Milli-Q. A este *mix* foi adicionado 0,2 μ L de cDNA de *An. darlingi* diluídos em uma mesma concentração. O segundo *mix* continha os *primers* F e R, a 2,5 μ M. Aplicou-se 23,1 μ L do *mix* contendo o cDNA e 4,4 μ L do *mix* de *primer* em microtubos, sendo 2 réplicas técnicas e em seguida aplicou-se 12,5 μ L de amostra em cada *well* da placa de PCR. Posteriormente, a placa contendo as reações foi submetida ao equipamento *Real-Time PCR System*[™] 7.500 da *Applied Biosystems*[®].

As condições de reação para amplificação gênica foram: um passo inicial de 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C, por 60 segundos. Controles negativos foram realizados para a detecção de possíveis contaminações. O gene *GAPDH* de *An. darlingi* foi utilizado como referência para a normalização das reações (controle endógeno) das análises.

3.9 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS GENES DE INTERESSE DE *An. darlingi*

Após os testes de padronizações, por meio dos iniciadores (**Tabela 1**), procedeu-se a quantificação dos níveis relativos de expressão dos transcritos dos genes *Actina*,

Phosrestin II - arrestin a, Tripsina e GAPDH de *An. darlingi*, por meio do método da qRT-PCR. As amostras de cada estágio foram analisadas em triplicata (réplica biológica), e cada réplica foi utilizada em duas reações individuais (réplicas idênticas - técnicas), a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados.

Os valores do nível de expressão relativa desses 4 genes de interesse foram calculados pelo método de Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) comparativo, segundo Livak e Schmittgen (2001). Neste procedimento, as amostras de RNA de larvas foi escolhida como calibrador (amostra controle) das reações de qRT-PCR, pois apresentou-se pouco variável no sentido de que o Ct variou pouquíssimo entre as réplicas biológicas. Desse modo, o nível de expressão das outras amostras (estágio adulto) não alimentadas foi quantificado em relação às larvas. Nesse aspecto, verificou-se a validação dos níveis de expressão dos genes Actina, *Phosrestin II - arrestin A*, Tripsina e GAPDH.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram analisados sob a forma de média e desvio padrão. A significância de diferenças nos níveis de expressão gênica foi analisada estatisticamente por meio do teste *t* de Student, utilizando-se o sistema Microsoft® Office Excel 2003. O nível de significância assumido foi $p < 0,05$ em todos os testes (Zar, 1984).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis de expressão gênica, a partir do RNA de larvas de 1^o e 2^o estádios e adultos de *An. darlingi* foram analisados no presente trabalho. A **Figura 5** mostra as sub-unidades do RNA ribossomal, onde o RNAm pode estar íntegro, extraído de larvas de 1^o e 2^o estádios e de adultos de *An. darlingi* em gel desnaturante de agarose a 1%.

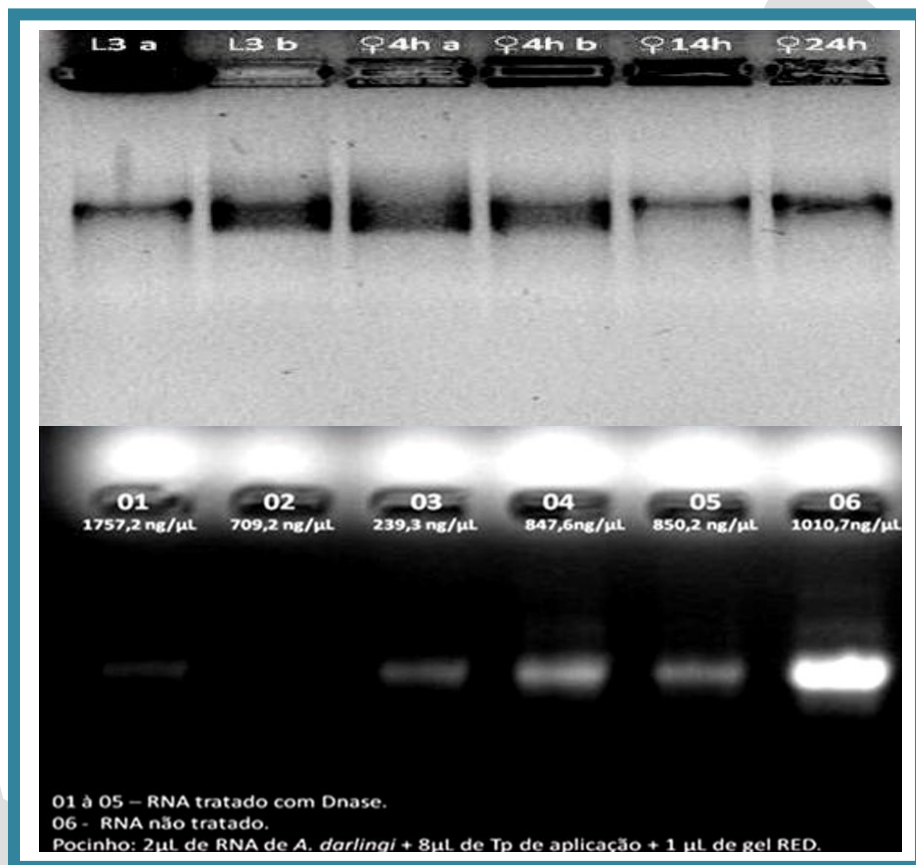


Figura 5 - Perfis eletroforéticos de cada extração de RNA total de larvas (L3a, L3b) e adultos (fêmeas 4h a, 4h b, 14h e 24h) de *Anopheles darlingi* com amostras tratadas nos pocinhos (01 a 05) e não tratadas (06) com DNase, em gel desnaturante de agarose a 1%, corado com gel *red*.

4.1 NÍVEIS DE EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES ACTINA, TRIPSINAE E PHOSRESTIN II DE *An. darlingi*

Na literatura, os estudos acerca da expressão gênica em anofelinos ainda são escassos. Em *An. darlingi*, os genes alvos Actina, Tripsina e *Phosrestin II* foram testados como genes de referência, entretanto o GAPDH se mostrou mais estável, ou seja, não apresentou variação durante as reações. Portanto, o GAPDH foi escolhido como gene endógeno e a *Phosrestin II*, a Actina e a Tripsina foram diferencialmente expressas e, por isso, foram selecionados como genes alvos.

4.1.1 Análise da Expressão Relativa do Gene GAPDH

A GAPDH, como muitas outras enzimas, tem várias funções. Participa do processo metabólico, atuando na glicólise (TRISTAN, 2011) e em diversos processos celulares, incluindo reparo de DNA (MEYER-SIEGLER, et al., 1991), exportação de RNAt (SINGH e GREEN, 1993), fusão de membrana e transporte (GLASER e GROSS, 1995; TISDALE, 2001), dinâmica do citoesqueleto (KUMAGAI e SAKAI, 1983) e morte celular (SAWA, et al., 1997; HARA, et al., 2005).

Zheng e colaboradores (2003) verificaram que a GAPDH pode ativar a transcrição. O Complexo Transcricional Co-Ativador (OCA-S) contém GAPDH e lactato desidrogenase, duas proteínas que anteriormente pensava-se estar envolvidas apenas em metabolismo. Em 2005, Hara e colaboradores mostraram que GAPDH dá início à apoptose ou morte celular. Embora não seja a sua função propriamente dita, mas pode ser vista como uma atividade mediada de ligação do DNA ao processo de ativação da transcrição. A GAPDH se move entre o citosol e o núcleo, ligando o estado metabólico à transcrição de genes. Além disso, catalisa a conversão de gliceraldeído 3-fosfato (etapa 6 de quebra da glicose), uma via importante de energia e fornecimento de molécula de carbono localizado no citosol das células eucarióticas e, age em outros processos celulares (TRISTAN, et al., 2011).

A **Figura 6** do presente estudo mostrou os valores de Ct de GAPDH em todas as placas, tanto para larvas quanto para adultos, mostrou pouca variação, principalmente entre as larvas. Isso possibilitou escolher o tratamento com larvas, como alvo normalizador das reações de qRT-PCR.

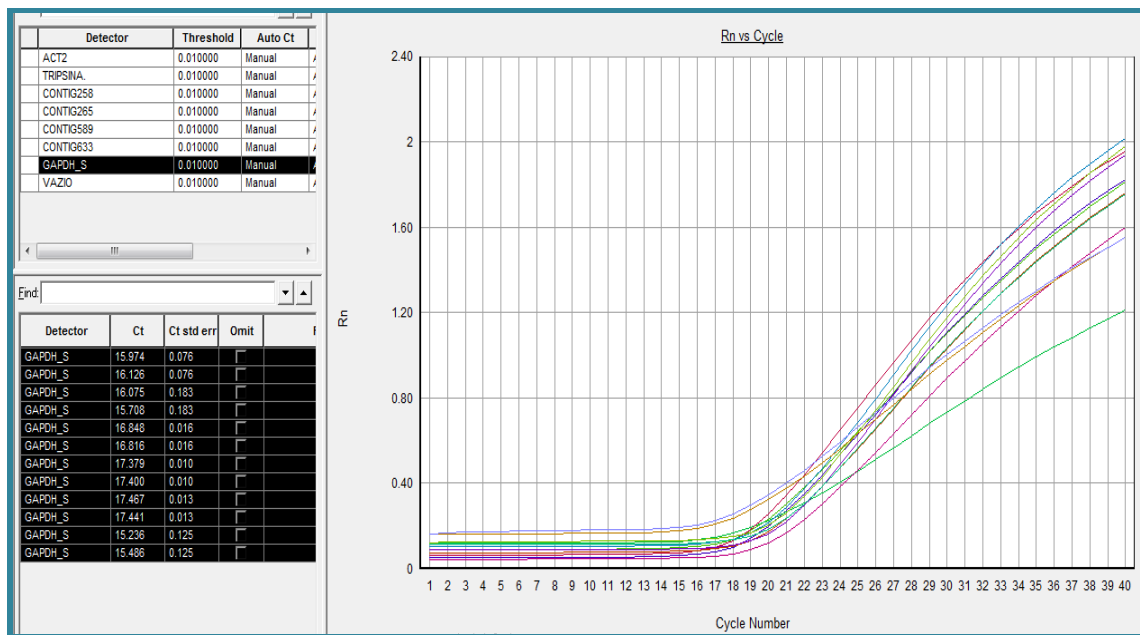


Figura 6 - Amplificação dos fragmentos de cDNA de larvas e adultos de *Anopheles darlingi*, utilizando o primer de GAPDH, por PCR em Tempo Real (7500 System SDS Software – Applied Biosystems®). O quadro na cor preta em destaque, no canto inferior direito, mostra os valores de Ct de cada réplica técnica.

Dados de expressão quantitativa são muitas vezes normalizados em relação aos níveis de expressão de genes controle ou de referência. Um pressuposto inerente ao uso de genes de referência ou manutenção é que a expressão dos genes permaneça constante nas células ou tecidos sob investigação (CHEN et al., 2008). GAPDH é um dos genes de manutenção mais comuns e é frequentemente usado para normalizar os dados de expressão gênica (GUNNARSSON, et al., 2007). As reações de qRT-PCR do gene GAPDH de *An. darlingi* corroboram esse achado.

Segundo Tristan e colaboradores (2011), um gene endógeno ou controle para ser utilizado como tal, não deve apresentar diferença significativa na variação do nível de expressão. Utilizou-se o GAPDH nos dois estágios (larvas de 1º e 2º estádios e adultos) de *An. darlingi*, em princípio, como um gene alvo. Porém, ao longo das reações de RT-PCR, esse gene foi expresso diferencialmente entre ambos os estágios (larvas e adultos) com pouquíssima variação (test $t = 0,41$, admitindo-se $p < 0,05$), conforme a **Figura 7**. Assim, GAPDH se mostrou pouco variável entre amostras de larvas e adultos sendo que no estágio de larvas o nível de expressão foi maior e menos variável, caracterizando-o como um excelente gene de referência nas reações de qRT-PCR. A variação no nível de expressão desse gene confirma o trabalho descrito por Rodriguez e colaboradores (2000) sobre desenvolvimento ontogenético em diferentes anofelinos, onde GAPDH mostrou uma única

zona de atividade, detectada especialmente em larvas do quarto estágio, tornando-se mais intensa a partir da fase de pupa.

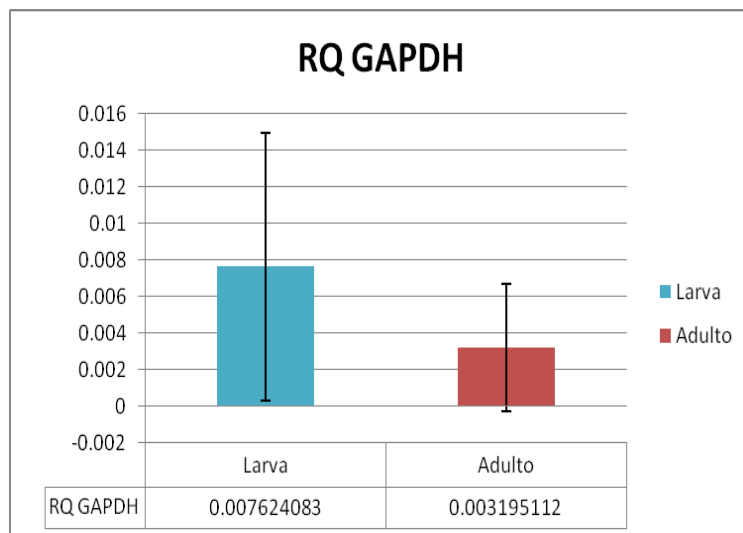


Figura 7 - Quantificação relativa (RQ) de GAPDH em *Anopheles darlingi*, dado em valores de média \pm desvio padrão ($t=0,41$, com $p<0,05$).

4.1.2 Análise da expressão relativa do gene actina de *An. darlingi*

Actina é uma proteína ubíqua e altamente conservada entre todos os organismos eucariotos. Está envolvida na formação de filamentos que são um importante componente do citoesqueleto. Participa de outros processos celulares tais como a morfogênese (POLLARD & WEIHING, 1974) e interage com a proteína miosina, fornecendo a base da contração muscular e muitos aspectos da motilidade celular. Cada promotor da Actina se liga a uma molécula de ATP e íons de cálcio ou magnésio. O domínio ATPase de ações da Actina apresenta similaridade com domínios ATPase de hexoquinase e proteínas hsp70. Membros da família de Actina têm funções no citoesqueleto bem caracterizados, mas também têm ocorrência em atividades nucleares. Análises anteriores da família da proteína Actina identificaram quatro subfamílias conservadas, mas muitas proteínas relacionadas à Actina (ARPs) não se enquadram nesses grupos (GOODSON, 2002).

A Actina é encontrada em todas as células eucarióticas e é altamente conservada em níveis nucleicos e sequências de aminoácidos (FYRBERG et al., 1980; ZAFAR e SODJA, 1983; MOUNIER et al., 1987; HADDEN e SODJA, 1994). Suas funções incluem a determinação da forma celular, contração muscular, movimento celular e cromossômico, fagocitose e sinalização intracelular (POLLARD et al., 2000; FOX, 2001; SODJA et al., 2007). Em artrópodes, a Actina pode ser dividida em três grupos funcionais: Actina do

citoesqueleto, Actina dos músculos de adultos e Actinas dos músculos de larvas-adultos, (SALAZAR et al., 1994).

Em *An. darlingi*, os valores de *Ct* de Actina em todas as placas analisadas, tanto para larvas quanto para adultos, não foi constante como se esperava (**Figura 8**). Admite-se variação, principalmente entre os adultos, sendo que uma dessas réplicas biológicas apresentou *Ct* superior a $p < 0.05$, que é o limite admissível.

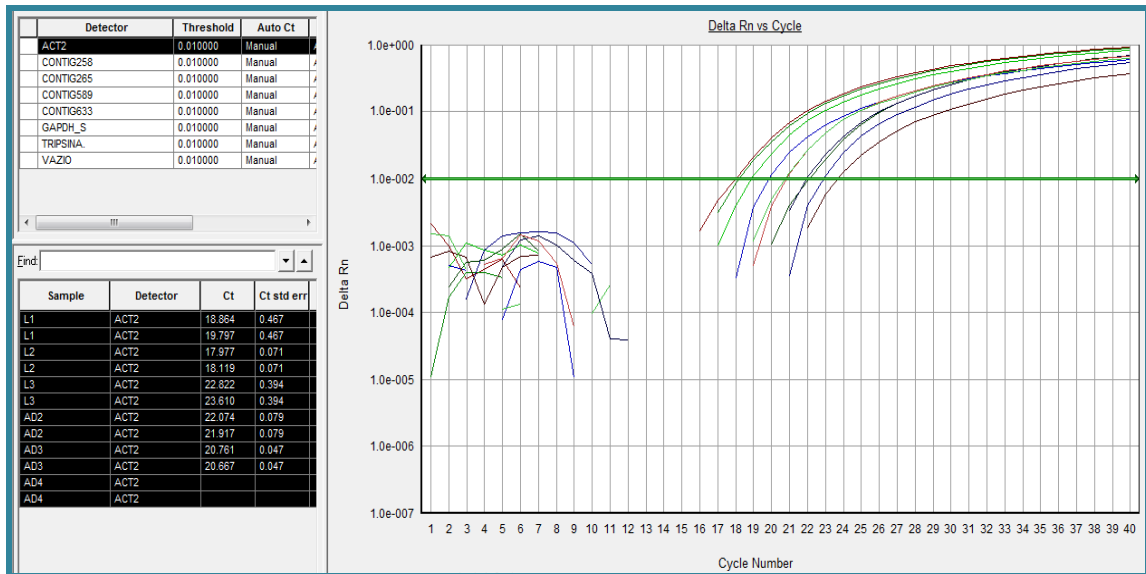


Figura 8 - Amplificação dos fragmentos de cDNA de larvas e adultos de *Anopheles darlingi*, utilizando o primer de Actina, por PCR em Tempo Real (7500 System SDS Software – Applied Biosystems®). O quadro na cor preta em destaque, no canto inferior direito, mostra os valores de *Ct* de cada réplica técnica.

Sobre a quantificação relativa de Actina em relação ao gene endógeno GAPDH em *An. darlingi*, verificou-se que o acúmulo de transcrito nos adultos é consistente. Todavia, o teste *t* de Student não apresenta um *p-value* significativo ($t = 0.42$). Isto ocorreu devido a uma amostra discrepante nas réplicas biológicas dos adultos, que não foi descartada durante a análise, e ainda os três valores de *Ct* das larvas apresentaram-se muito distantes entre si, configurando um maior nível de expressão de Actina em adulto, mas que não foi estatisticamente significativo (**Figura 9**). Como o teste *t* de Student avalia a distribuição normal dos dois grupos experimentais, o fato do desvio padrão ser alto nos adultos ($dp = 3110,7$) resulta em uma distribuição normal achatada, que por fim está em uma área de sobreposição elevada nos dois grupos amostrais. O *p-value* representa a área de sobreposição entre as duas distribuições.

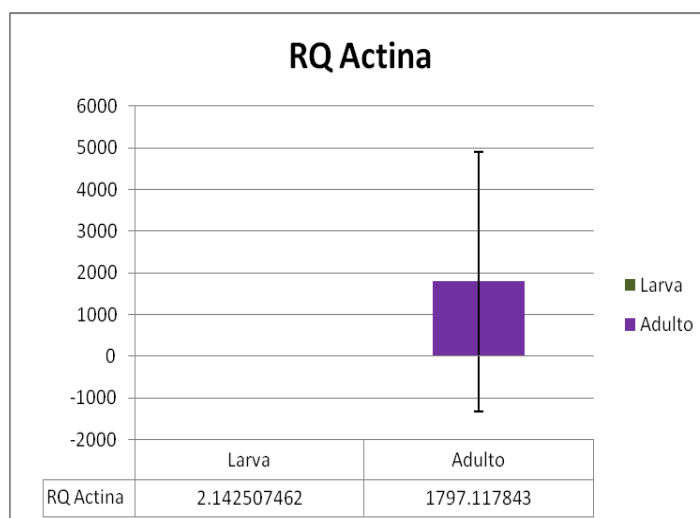


Figura 9 - Quantificação relativa (RQ) de Actina em larva e adulto de *Anopheles darlingi*, dado em valores de média \pm desvio padrão.

A Actina de *An. darlingi* foi consistentemente expressa em adulto, se comparado com larvas, o que valida os dados normalizados de nível de expressão *in silico* da biblioteca de ESTs de *An. darlingi* depositadas no banco de dados *Valine* (CENARGEN), onde Actina é expressa 15.38% em adulto (**Figura 10**).

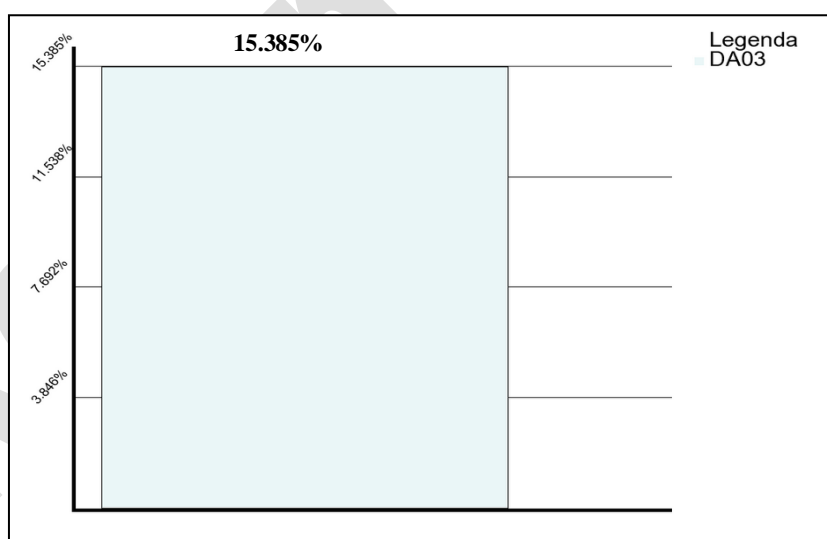


Figura 10 – Normalização *in silico* de Actina ([gij113215|sp|P18600|ACT1_ARTSX Actin, clone 205 >gij5663|emb|CAA](#)) para os clusters mais expressos nas bibliotecas de L1L2 e adultos de *Anopheles darlingi* do Banco de Dados *Valine* (CENARGEN) – DA: Darlingi/Adulto.

A Actina na maioria dos eucariotos possui uma sequência gênica altamente conservada (HENNESSEY et al., 1993). Vários trabalhos sugerem que as diferentes isoformas de Actina possuem propriedades únicas, mas é conhecido também, que as

isoformas não estão distribuídas de maneira uniforme nas células. Uma das principais isoformas, ausente nos músculos, é a β -Actina que juntamente com o RNA mensageiro que a codifica estão localizados nas membranas celulares (HOOCK et al., 1991; SINGER, 1992).

Salazar e colaboradores (1994) identificaram no mosquito *Anopheles gambiae*, cinco *loci* gênicos que provavelmente codificam para Actina, dos quais um foi mapeado, o gene *actWior*, localizado no cromossomo X. Os genes identificados pelos autores expressaram-se em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito, o que indicou que tais genes estavam relacionados ao citoesqueleto. O gene Act5C foi utilizado por Bondinas e colaboradores (2001) para mapear genes de Actina *in situ* em quatro espécies de *Drosophila* paleárticas: *Drosophila ambigua*, *Drosophila tristis*, *Drosophila obscura*, *Drosophila subsilvestris* e a espécie “trans-paleártica” *Drosophila bifasciata*. Neste último, os autores concluíram que os genes de Actina estão distribuídos de forma uniforme nos cromossomos das espécies estudadas, o que reforça a hipótese de que os elementos cromossômicos em *Drosophila* mantiveram suas características durante a evolução.

A excessiva expressão ectópica de isoformas de Actina em culturas de células confere fenótipos distintos (SCHEZNOV et al., 1992), sugerindo novamente que as diferentes isoformas possuem propriedades únicas, indicando que as isoformas de Actina não possuem funcionalidades equivalentes, considerando as correlações das sequências com seus padrões de expressão. Segundo Fyrberg e colaboradores (1983) e Sattler e colaboradores (2011), há seis isoformas de Actina para *D. melanogaster*, divididas em três pares: Act5C (mapeada no cromossomo X) e Act42A (localizada no cromossomo 2R), expressas no citoesqueleto; Act57B (mapeada no cromossomo 2R) e Act87E (localizada no cromossomo 3R), expressas em músculos de larvas e adultos e, por último, Act79B (localizado no cromossomo 3L) e Act88F (localizado no cromossomo 3R), expressas em músculos relacionadas ao voo.

Nas anotações automática e manual do banco de *ESTs* de larvas e adultos de *An. darlingi*, o gene Actina também está inserido no domínio Componente Celular, onde ocorre no citoplasma, citoesqueleto; e no domínio Função Molecular participa das ligações da molécula de ATP e de proteína ou complexo protéico (AZEVEDO-JÚNIOR, 2011).

Actina é um gene predito específico de machos que pode ter especificidade nos músculos de mosquitos adultos. Nesse sentido, a proteína predita AeAct-3 (clone de cDNA do gene de Actina) de *Ae. aegypti* (VYAZUNOVA e LAN, 2004) apresentou 94% de similaridade com o produto gênico ENSANGP00000022175 de *An. darlingi*. Esse achado corrobora os dados de hibridização *in silico* do ENSANGP00000022175 nos braços 2L, 2R, 3L e X politênicos de *An. darlingi* do Município de Coari, Estado do Amazonas (BRIDI, 2009). No presente estudo sugere-se que, a Actina *An. darlingi* na fase adulta seja a mesma isoforma ou uma das isoformas de Actina de *Ae. aegypti*, confirmando que o seu nível de

expressão gênica aumenta no estágio adulto e não nos estádios larvais (1^o e 2^o) desse mosquito.

4.1.3 Análise da Expressão Relativa do Gene Tripsina de *An. darlingi*

A Tripsina é a principal enzima responsável pela digestão da alimentação sanguínea em anofelinos (BILLINGSLY e HECKER, 1991). Muller e colaboradores (1995) alimentaram *An. gambiae* com sangue e, descreveram sete diferentes genes para Tripsinas digestivas em adultos (*AnTryp1* a 7). Dentre esses, dois genes: *AnTryp1* e *AnTryp2*, parecem estar envolvidos diretamente com a digestão do sangue (CARLOS, 2008).

Em *An. darlingi*, os valores de *Ct* de Tripsina em todas as placas, tanto para larvas quanto para adultos, semelhante à Actina não foi constante como esperado (**Figura 11**), admitindo-se variação entre as réplicas biológicas de larvas, sendo que uma dessas réplicas apresentou *Ct* elevado ao limite admissível. Entretanto, os resultados para Tripsina foram considerados estatisticamente significativos.

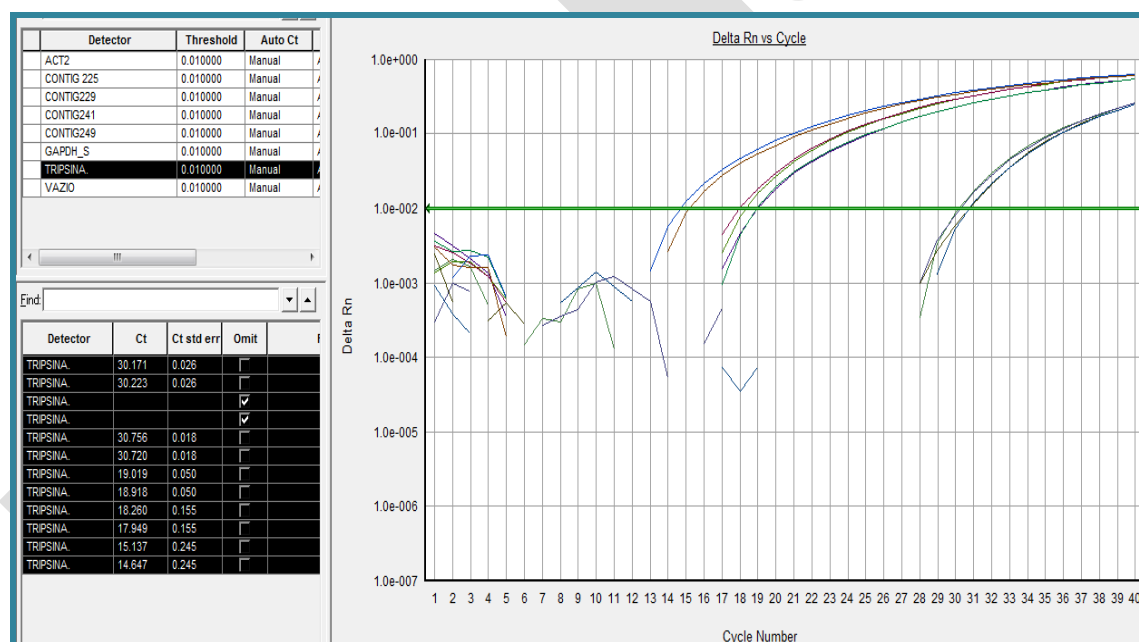


Figura 11 - Amplificação dos fragmentos de cDNA de L1L2 e adultos de *Anopheles darlingi*, utilizando o primer de Tripsina, por PCR em Tempo Real (7500 System SDS Software – Applied Biosystems®). O quadro na cor preta em destaque, no canto inferior direito, mostra os valores de *Ct* de cada réplica técnica.

Curiosamente, no presente trabalho, o gene Tripsina de *An. darlingi* apresentou-se significativamente mais expresso em larvas ($dp=1,0$) do que em adulto ($dp=5,5^{-5}$), apresentado *p-value* significativo ($t=0,02$, sendo $p<0,05$) (**Figura 12**).

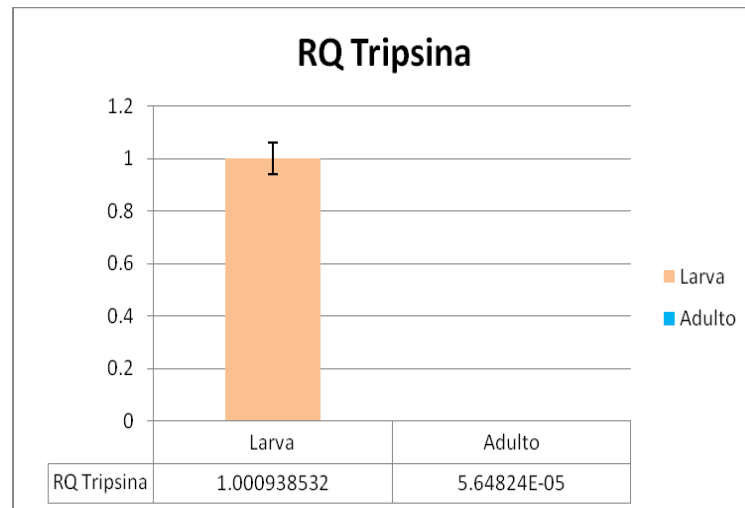


Figura 12 - Quantificação relativa (RQ) de Tripsina em diferentes estágios de desenvolvimento de *Anopheles darlingi* (larva e adulto), dado em valores de média \pm desvio padrão.

A Tripsina foi expressa principalmente em larvas de 1^o e 2^o estádios e que apresentou expressão reduzida em adultos, talvez, em consequência da não alimentação sanguínea. Entretanto para confirmar isso é necessário um comparativo com adultos alimentados. Nesse sentido, considerando o *habitat* natural de *An. darlingi* na Amazônia, Tadei e colaboradores (2007), estudando amostras do Lago Coari, Município de Coari, Amazonas, observaram que no período de enchentes, o desenvolvimento das formas imaturas ocorre entre raízes e plantas aquáticas, onde essas formas se alimentam de algas, rotíferos, ciliados entre outros microorganismos. As fêmeas adultas são hematófagas e antropofílicas, já os machos adultos, alimentam-se de seiva que contém a glicose como sua principal fonte de energia.

Nas condições de desenvolvimento de *An. darlingi* de rotina no insetário, do Laboratório de Vetores da Malária e Dengue/INPA, as fêmeas adultas realizam repasto sanguíneo em pato doméstico (híbrido entre pato-real domesticado: *Anas platyrhynchos* e pato-mudo domesticado: *Cairina moschata momelanotus*) ou em galo (*Gallus gallus domesticus*), sendo adicionadas na sua alimentação soluções de açúcar a 10%, farinha de peixe e pó de fígado (como substrato para desenvolvimento de microorganismos, dos quais as larvas se alimentam). No presente experimento, adultos (machos e fêmeas) de *An. darlingi* não receberam essa alimentação. Por isso, é prematuro afirmar que a Tripsina tenha

sido induzida em adultos. Em contrapartida não foi realizada uma análise comparativa de adultos alimentados e não alimentados, fazendo-se necessária, portanto, a realização de mais testes experimentais.

Na busca por similaridade do produto gênico Tripsina do banco de dados *in silico* da biblioteca de *ESTs* de *An. darlingi* contra outros bancos de dados públicos do NCBI, a Tripsina desse mosquito apresentou maior similaridade com a Tripsina de *Ae. aegypti*. Os resultados *in silico* do banco de dados de *ESTs* de *An. darlingi*, mostraram maior nível de expressão da tripsina em adultos (6,2%) do que em larvas (3,1%) (**Figura 13**).

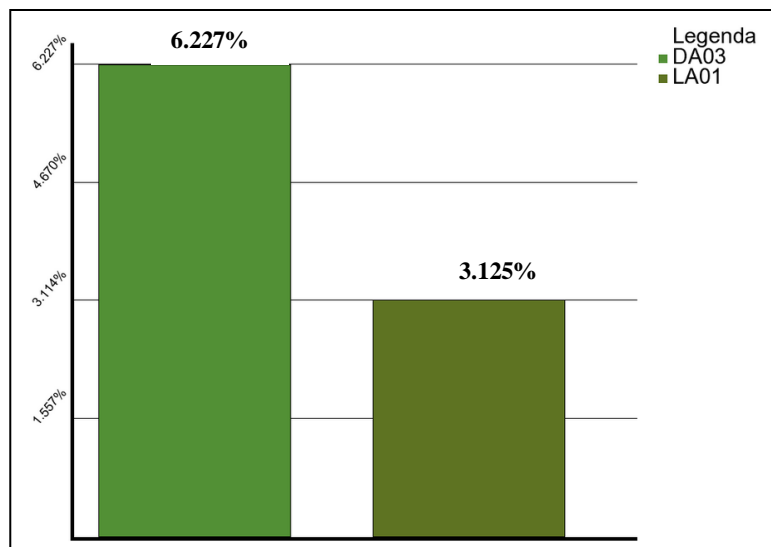


Figura 13 – Normalização *in silico* de Tripsina ([\[gi|157113343|ref|XP_001657786.1|trypsin \[Aedes aegypti\] gi|108877776|gb|EAT42001.1|trypsin \[Aedes aegypti\]](#)) para os clusters mais expressos em cada biblioteca de *Anopheles darlingi* do Banco de Dados *Valine* (CENARGEN) – DA: Darlingi/Adulto e LA: Larva.

Infere-se que a Tripsina, que é geralmente induzida pela alimentação sanguínea de fêmeas adultas em *An. gambiae* segundo Muller e colaboradores (1995), não foi induzida unicamente pela ingestão de sangue por fêmeas de *An. darlingi*, já que as fêmeas não foram alimentadas ou, ainda, que a tripsina tenha sido estimulada por uma protease homóloga controlada por um sinal de indução diferente. Assim, fazem-se necessários estudos proteômicos específicos sobre essa proteína de *An. darlingi*.

4.1.4 Análise da Expressão Relativa do Gene *Phosrestin II* (*Arrestin A*) de *An. darlingi*

A *Phosrestin II* é uma proteína quinase fotoreceptora, pertencente à Família Arrestin A. Provavelmente desempenha um papel importante na tradução de fotorreceptores (MATSUMOTO e YAMADA, 1991); é específica do tecido de segmentos interno e externo e da região plexiforme interna da retina de *D. melanogaster* (MATSUMOTO et al., 1994) e

apresenta modificação pós-traducional em função da fosforilação pela exposição à luz (MATSUMOTO e YAMADA, 1991; MATSUMOTO, 1994).

No presente estudo, os valores de *Ct* de *Phosrestin II* (*Arrestin-A*), tanto para larvas quanto para adultos foram constantes em todas as placas analisadas pelo método qRT-PCR (Figura 14).

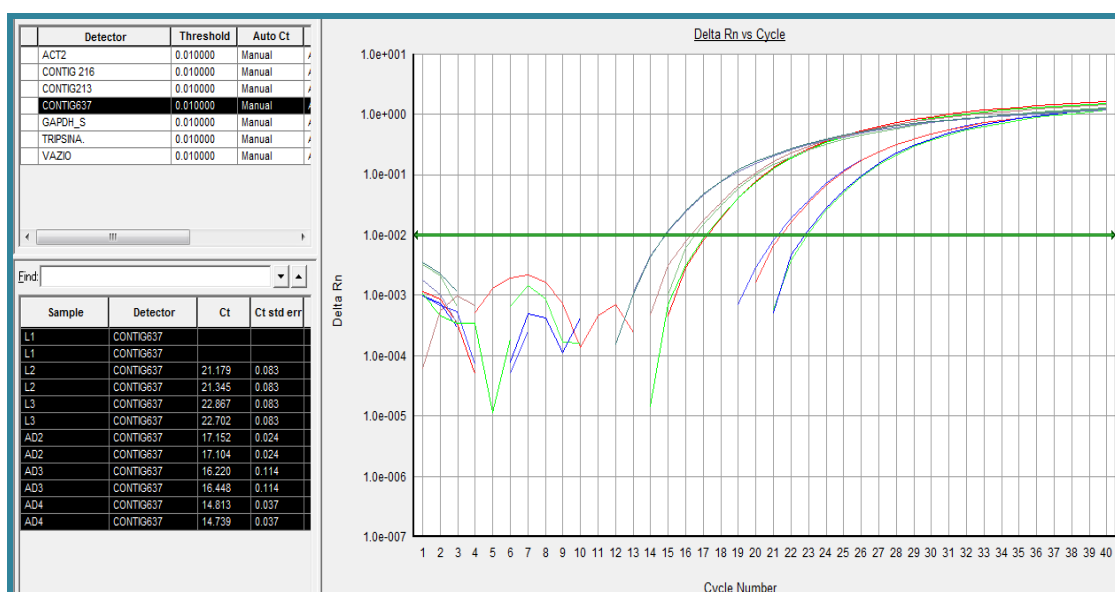


Figura 14 - Amplificação dos fragmentos de cDNA de larvas e adultos de *Anopheles darlingi*, utilizando o primer de *Arrestina* (*Phosrestin II*), por PCR em Tempo Real (7500 System SDS Software – Applied Biosystems®). O quadro na cor preta em destaque, no canto inferior direito, mostra os valores de *Ct* de cada réplica técnica.

Ocorreu variação em uma das réplicas biológicas de larvas, que apresentou *Ct* elevado. Entretanto, os resultados para *Phosrestin II* (*Arrestin-A*) foram considerados os mais estatisticamente significativos, do ponto de vista biológico, para o tratamento com larvas, que apresentou maior nível de expressão em relação ao tratamento com adultos.

A Figura 15 mostra o nível de expressão diferencial da *Phosrestin II* (*Arrestin-A*) em larvas (1,0) e adultos (0,01) e desvio padrão (0,06), resultado muito próximo de ser significativo ($p < 0,05$). Estes resultados do *Ct* desse gene merecem ser ajustados, o que implica obter de mais réplicas biológicas.

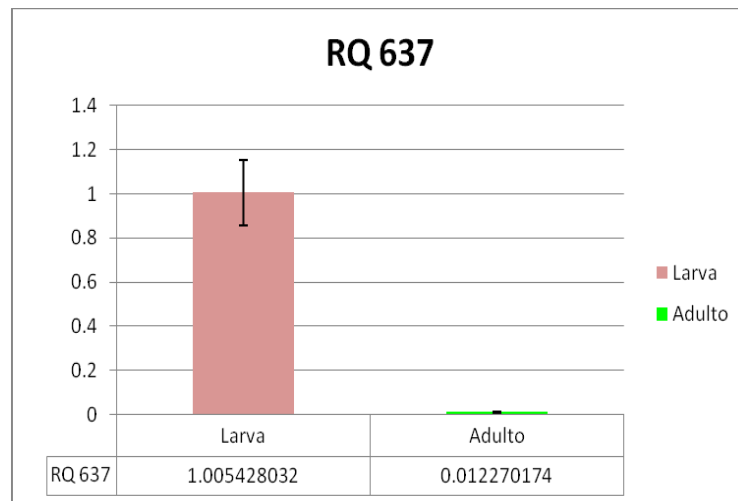


Figura 15 - Quantificação relativa (RQ) de *Phosrestin II* em diferentes estágios de desenvolvimento de *Anopheles darlingi* (larva e adulto), dado em valores de média \pm desvio padrão.

Estes resultados corroboram os dados provenientes da análise *in silico* da expressão de *Phosrestin II* de *An. darlingi*, disponíveis no banco de dados <https://valine.cenargen.embrapa.br/Anopheles200807/>, onde o nível percentual de expressão em adulto foi de 0,7% e em larva foi de 7,18% (**Figura 16**).

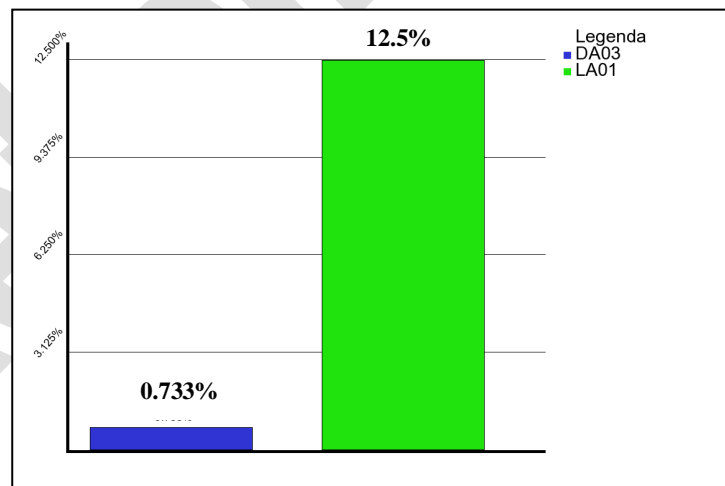


Figura 16 - Normalização *in silico* de *Phosrestin II* (Arrestina) ([gi|157113343|ref|XP_001657786.1|](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/157113343/) trypsin [*Aedes aegypti*] [gi|108877776|gb|EAT42001.1|](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/108877776/) trypsin [*Aedes aegypti*]) para os clusters mais expressos em cada biblioteca de *Anopheles darlingi* do Banco de Dados Valine (CENARGEN) – DA: Darlingi/Adulto e LA: Larva.

Matsumoto e colaboradores (1994) relataram que *Phosrestin II* em *D. melanogaster* sofre fosforilação induzida pela luz, numa escala de tempo mais rápida do que qualquer

outra proteína *in vivo* e, que *Ser366* (Serina) é o sítio de fosforilação *PRI in vivo* e concluíram que a via *CaMK*, é responsável pela ativação da proteína de fosforilação por fotorreceptores em *D. melanogaster*.

Arrestina foi identificado como um dos receptores sensoriais relacionados com transcrição, com maior expressão em adultos de *An. gambiae* (MARINOTTI et al., 2006). Segundo descrevem BIESSMANN e colaboradores (2005), genes que codificam proteínas relacionadas com o olfato se expressam preferencialmente em machos e, provavelmente, estão envolvidos na localização de fontes de néctar para a alimentação ou fêmeas, para o acasalamento em *An. gambiae*. Pode-se inferir também que diferenças como o *habitat*, condições climáticas, comportamento e variabilidade genética entre populações de anofelinos, podem influenciar no nível de expressão gênica (MARINOTTI et al., 2006; CHEN et al., 2008).

Sobre a ontologia da *Phosrestin II* em *A. darlingi*, sugere-se que ela esteja relacionada aos processos celulares, tais como respostas a estímulos, percepção sensorial e tradução de sinal (AZEVEDO-JUNIOR, 2011), confirmando o trabalho de Matsumoto e Yamada (1991), Matsumoto e colaboradores (1994) e NENE e colaboradores (2007) que descreveram funções semelhantes em *Ae. aegypti*, vetor das arboviroses febre amarela e dengue.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

-A qRT-PCR mostrou que, mesmo com o acúmulo de transcritos de Actina em adultos de *An.darlingi*, o teste estatístico *t* de Student não confirmou um *p-value* significativo ($t=0,42$), mas indicou sobreposição elevada nos resultados dos dois tratamentos (L1L2 e adultos).

-A Actina de *An. darlingi* foi mais expressa diferencialmente em adultos, em comparação com larvas, corroborando o nível de expressão *in silico* da biblioteca de ESTs de adultos de *An. darlingi* (15,385%).

-A Tripsina foi expressa principalmente em L1L2 e apresentou expressão reduzida em adultos, talvez em consequência da não alimentação sanguínea destes, corroborando os dados *in silico* da biblioteca de ESTs. Entretanto, é necessário testar o nível de expressão gênica diferencial de larvas contra adultos alimentados, a fim de confirmar esse achado.

- Dentre os quatro genes estudados, a expressão diferencial de *Phosrestin II* (*Arrestin-A*) foi considerada estatisticamente significativa, do ponto de vista biológico, para o tratamento com larvas, que apresentou maior nível de expressão ($t=0,06$) em relação aos adultos (0,7%), corroborando as análises *in silico* da expressão de *Phosrestin II* (*Arrestin-A*) do banco de ESTs de *An. darlingi*.

- A análise da expressão dos genes Actina, Tripsina e *Phosrestin II* e GAPDH em larvas de 1º e 2º estádios e adultos de *An. darlingi* corroborou os dados *in silico* da biblioteca de ESTs desse mosquito. Este trabalho pioneiro mostra boas perspectivas para auxiliar estudos de novas alternativas para o controle de *An. darlingi* e reduzir os casos de malária, especialmente na Amazônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.D.; KELLEY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M.H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.; KERLAVAGE, A.R.; MCCOMBIE, W.R.; VENTER, J.C. Complementary DNA sequencing: “expressed sequence tags” and the human genome project. *Science*, n. 252, p. 1651-1656, 1991.
- ARRUDA, M.; CARVALHO, M.B.; NUSSENZWEIG, R.S.; MARACIC, M.; FERREIRA, A.W.; COCHRANE, A.H. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Northern Brazil identified by immunoassay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. n. 35, v. 5, p. 873-881, 1986.
- AZEVEDO-JUNIOR, G.M. Anotação do transcriptoma parcial de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926. [s.n.], 201. xi, 66. Dissertação (mestrado)- INPA, Manaus, 2011. CDD 19. ed. 595.770415.
- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL – Blastx. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 10/02/2006.
- BASSET, JR.D.E.; BOGUSKI, M.S.; HEITER, P. Yeast genes and human disease. *Nature*, n. 379, p. 589-590, 1996.
- BOGUSKI, M.S. The turning point in genome research. *Trends in Biochemistry Science.*, n. 20, p. 295-296, 1995.
- BOGUSKI, M. and SCHULER, G. Establishing a human transcript map. *Nature Genetics*. n. 10, p. 369-371, 1995.
- BUSTIN, S.A.; HANDS, R.E.; NOLAN T. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature*. v. 1, n. 3, p. 1559-1582, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA NO BRASIL – Sivep Malária e Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil – 2010. Disponível em http://saude.gov.br/sivep_malaria Acesso em: 03/05/2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FNS) – 2009. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Casos_confirmados_malaria_90a09_serie_historica.pdf > Acesso em: 12/06/2011.

BIESSMANN, H.; NGUYEN, Q.K.; LE, D.; WALTER, M.F. Gene expression in sensory tissues of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*. n.14, p. 575–589, 2005.

BONDINAS, G.; LOUKAS, M.; GOULIELMOS, G.; SPERLICH, D. The actin loci in the genus *Drosophila*: establishment of chromosomal homologies among five palaeartic species of the *Drosophila obscura* group by in situ hybridization. *Chromosoma*. n.110, p.441–450, 2001.

BRIDI, L.C. Mapeamento físico de genes expressos de *Anopheles darlingi* Root, 1926 e sua análise in silico em *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (Diptera: Culicidae). xi, 87 p. Dissertação/INPA-Manaus, AM. CDD 19. ed. 595.770415, 2009

CALSA JR, T. ; BENEDITO, V.A. ; FIGUEIRA, A. Análise Serial da Expressão Gênica - Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE) em plantas. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 33, p. 86-98, 2004.

CARLOS, B.C. Análise de Expressão e silenciamento de genes do trato digestivo de *Anopheles aquasalis*. 2005. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Mestrado em Ciências Biológicas (Genética).

CHEN, X.G.; MATHUR, G.; JAMES, A.A. Gene expression studies in mosquitoes. *Advances in genetics*. n. 64, p.19–50, 2008.

COLLINS, F.H. and PASKEWITZ, S.M. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, n. 5, v. 1, p. 9, 1996.

CONN, J.E.; FREITAS-SIBAJEV, M.G.R.; LUZ, S.L.B.; MOMEN, H. Molecular population genetics of the primary neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. *Journal of the American Mosquito Control Association*. n. 15, p. 468-474, 1999.

CONSOLI, R. e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, p. 225. Rio de Janeiro: *Fiocruz*. 1994.

CRAWFORD J.E.; GUELBEOGO W.M.; SANOU, A.; TRAORÉ, A.; VERNICK, K.D. De Novo Transcriptome Sequencing in *Anopheles funestus* Using Illumina RNA-Seq Technology. *PLoS ONE*. v.5, n.12, p. e14202, 2010.

DIABATE, A. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic entroggression and de novo phenomena. *Tropical Medicine & International Health*. v. 9, n. 12, p. 1267-1273, 2004.

FARAN, M.E.; LINTHICUM, K.L.A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, n. 13, p. 1-81, 1981.

FORATTINI, O.P. *Entomologia Médica*. I. Parte Geral, Diptera, Anophelini. Volume 1, Faculdade de Saúde Pública da USP, p. 622. São Paulo: Edusp, 1962.

FORATTINI, O.P. *Culicidologia Médica*. v. 2, p. 860. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

FOX, J.E. Cytoskeletal proteins and platelet signalling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. n. 86, p. 198–213, 2001.

FREITAS-SIBAJEV, M.G.R.; CONN, J.; MITCHELL, S.E.; COCKBURN, A.F.; SEAWRIGHT, J.A.; MOMEN, H. Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*. n. 27, v. 2, p. 78-99, 1995.

FYRBERG, E.A.; KINDLE, K.L.; DAVIDSON, N. The actin genes of *Drosophila*: A dispersed multigene family. *Cell*. n.19, p.365, 1980.

FYRBERG, E.A.; MAHAFFEY, J.W.; BOND, B.J.; DAVIDSON, N. Transcripts of the six *Drosophila* actin genes accumulate in a stage and tissue-specific manner. *Cell*. n. 33, p.115, 1983.

GLASER, P.E.; GROSS, R.W. *Biochemistry (Mosc)*. n. 34, p. 12-19, 1995.

GOODSON, H.V.; HAWSE, W.F. Molecular evolution of the actin family. *Journal Cell Science*. v1, n.11, p. 2619–2622, 2002.

GOMEZ, S.M.; EIGLMEIER, K.; SEGURENS, B.; DEHOUX, P.; COULOUX, A.; SCARPELLI, C.; WINCKER, P.; WEISSENBACH, J.; BREY, P.T.; WROTH, C. Pilot *Anopheles gambiae* full-length cDNA study: sequencing and initial characterization of 35,575 clones. *Genome Biology*, v. 6, Artigo R39, p. 1-10, 2005.

GUNNARSSON D, NORDBERG G, SELSTAM G. Differential effects of cadmium on the gene expression of seven-transmembrane-spanning receptors and GAPDH in rat testis. *Toxicol Lett*. n.168, p.51–57, 2007.

HADDEN, T.J. and SODJA, A. An oligogene family encodes actins in the housefly, *Musca domestica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. n.303, p. 523–531, 1994.

HARA, M.R.; AGRAWAL, N.; KIM, S.F.; CASCIO, M.B.; FUJIMURO, M.; OZEKI, Y.; TAKAHASHI, M.; CHEAH, J.H.; TANKOU, S.K.; HESTER, L.D.; FERRIS, C.D.; HAYWARD, S.D.; SNYDER, S.H.; SAWA, A. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature Cell Biology*. n. 7, p.665, 2005.

HEMINGWAY, J. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. v. 34, p. 653-665.

HENNESSEY, E.S.; DRUMMONDT, D.R.; SPARROW, J.C. Molecular genetics of actin function. *Journal Biochemistry*. J. n. 282, p. 657-671, 1993.

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.; BERARDINIS, V.DE; BALDWIN, D.; BENES, V.; BIEDLER, J.; BLASS, C.; BOLANOS, BOSCUS, D.; BARNSTEAD, M.; CAI, S.; CENTER, A.; CHATUVERDI, K.; CHRISTOPHIDES, G.K.; CHRYSAL, M.A.; CLAMP, M.; CRAVCHIK, A.; CURWEN, V.; DANA, A.; DELCHER, A.; DEW, I.; EVANS, C.A.; FLANIGAN, M.; GRUNDSCHOBBER-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.; BIRNE, E.; BORK, P.; BREY, P.T.; VENTER, J.C.; WEISSENBACH, J.; KAFATOS, F.C.; COLLINS, F.H.; HOFFMAN, S.L. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, n. 298, p. 129-149, 2002.

HOOCK, T.C.; NEWCOMB, P.M.; HERMAN, I.M. Actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *Journal Cell Biologic*. n.112, p. 653, 1991.

KUMAGAI, H., SAKAI, H. *Journal Biochemistry*. n. 93, p. 1259, 1983.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, n. 22, p. 402-408, 2001.

LOAIZA, J.R.; BERMINGHAM, E.; SANJUR, O.I.; SCOTT, M.E.; BICKERSMITH, S.A.; CONN, J.E. Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). *Infection, Genetics and Evolution*. Available online 16 August 2011 (IN PRESS).

LOUNIBOS, L.P.; CONN, J.E. Malaria Vector Heterogeneity in South America. *American Entomologist*, n. 46. p. 4, 2000.

MARINOTTI, O.; CALVO, E.; NGUYEN, Q.K.; YAKE, S.D.; RIBEIRO, J.M.C.; JAMES, A.A. Genome-wide analysis of gene expression in adult *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v. 1, n. 15, p. 1-12, 2006.

MATSUMOTO, H. and YAMADA, T. Phosrestins I and II: arrestin homologs which undergo differential light-induced phosphorylation in the *Drosophila* photoreceptor in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. n.177, p.1306-1312, 1991.

MATSUMOTO, H.; KURIEN, B.T.; TAKAGI, Y.; KAHN, E.S.; KINUMI, T.; KOMORI, N.; YAMADA, T.; HAYASHI, F.; ISONO, K.; PAK, W.L. Phosrestin I undergoes the earliest light-induced phosphorylation by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*. n.12, p.997-1010, 1994.

MEYER-SIEGLER, K.; MAURO, D.J.; SEAL, WURZER, G.J.; DERIEL, J.K.; SIROVER, M.A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. USA n.88, p. 84, 1991.

MOUNIER, N.; GOUY, M.; MOUCHIRAND, D.; PRUDHOME, J.C. Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins. *Journal of Molecular Evolution*. n.34, p. 406-415, 1987.

MÜLLER, H.M.; CATTERUCCIA, F.; VIZIOLI, J.; DELLA TORRE, A.; CRISANTI, A. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*. *Experimental Parasitology*. v. 3, n. 81, p. 371-385, 1995.

MULLINS, K. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, p. 56-65, 1990.

NENE, V.; WORTMAN, J.R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C.; TU, Z.J.; LOFTUS, B.; XI, Z.; MEGY, K.; GRABHERR, M.; REN, Q.; ZDOBNOV, E.M.; LOBO, N.F.; CAMPBELL, K.S.; BROWN, S.E.; BONALDO, M.F.; ZHU, J.; SINKINS, S.P.; HOGENKAMP, D.G.; AMEDEO, P.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.W.; BIDWELL, S.; BIEDLER, J.; BIRNEY, E.; BRUGGNER, R.V.; COSTAS, J.; COY, M.R.; CRABTREE, J.; CRAWFORD, M.; DEBRUYN, B.; DECAPRIO, D.; EIGLMEIER, K.; EISENSTADT, E.; EL-DORRY, H.; GELBART, W.M.; GOMES, S.L.; HAMMOND, M.; HANNICK, L.I.; HOGAN, J.R.; HOLMES, M.H.; JAFFE, D.; JOHNSTON, J.S.; KENNEDY, R.C.; KOO, H.; KRAVITZ, R.; KRIVENTSEVA, E.V.; KULP, D.; LABUTTI, K.; LEE, E.; LI, S.; LOVIN, D.D.; MAO, C.; MAUCELI, E.; MENCK, C.F.M.; MILLER, J.R.; MONTGOMERY, P.; MORI, A.; NASCIMENTO, A.L.; NAVEIRA, H.F.; NUSBAUM, C.; O'LEARY, S.; ORVIS, J.; PERTEA, M.; QUESNEVILLE, H.; REIDENBACH, K.R.; ROGERS, W.Y.; ROTH, C.H.; SCHNEIDER, J.R.; SCHATZ, M.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STINSON, E.O.; TUBIO, J.M.C.; VANZEE, J.P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WERNER, D.; WHITE, O.; WYDER, S.; ZENG, Q.; ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; HILL, C.A.; RAIKHEL, A.S.; SOARES, M.B.; KNUDSON, D.L.; LEE, N.H.; GALAGAN, J.; SALZBERG, S.L.; PAULSEN, I.T.; DIMOPOULOS, G.; COLLINS, F.H.; BIRREN, B.; FRASER-LIGGETT, C.M.; SEVERSON, D.W. Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. *Science*. v.316, n.5832, p. 1718 – 1723, 2007.

NUNES-SOUZA, K.C.; SILVA, C.G.N.; TADEI, W.P.; RAFAEL, M.S. Sequenciamento de genes expressos de larvas de 1o e 2o estádios de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae), da Amazônia. In: As mudanças climáticas e o futuro da Amazônia, 2007, Manaus. XVI Jornada de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/FAPEAM/INPA. Manaus. v. 16. p. 273-274, 2007

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.B.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, v.9, n.115, p.1-47, 2010.

PASSOS, A.D.C.; FIALHO, R.R. Malária: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. n. 31(Suplemento II), p. 93-105, 1998.

POLLARD, T.D. and WEIHING, R.R. Actin and myosin and cell movement. *CRC Crit. Review Biochemistry*. n. 2, p. 1-65, 1974.

PONTIUS, J.U. UniGene: A Unified View of the Transcriptome. *The NCBI Handbook*. 2003.

PLANGGER, A.; MALICKI, D.; WHITNEY, M.; PAULSEN, R. Mechanism of arrestin 2 function in rhabdomeric photoreceptors. *The Journal of Biological Chemistry*. v.269, n.43, p.26969-75,1994.

RODRIGUEZ, G.A.D.; SANTOS, J.M.M.; MAIA, J.F. Padrões ontogenéticos e variação genética em Chagas *Anopheles (Anopheles) intermedius*, 1908 e *Anopheles (Anopheles) mattogrossensis* Lutz & Neiva, 1911 (Diptera: Culicidae) na Amazônia brasileira. *Revista Brasileira de Biologia*. São Carlos, v. 60, n. 2, 2000.

SEGURA, M.N.O. Estudo do *Anopheles (Nys) darlingi* Root 1926 e *Anopheles (Nys) albitarsis arribalzaga* 1878 (Diptera:Culicidae) como Vetores de Malária numa Mesma Área de Transmissão, e Caracterização de Espécies do Complexo *albitarsis*. 1998. 128 p. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Pará, Belém.

SHARAKHOVA, M.V.; HAMMOND, M.P.; LOBO, N.F.; KRZYWINSKI, J.; UNGER, M.F.; HILLENMEYER, M.E.; BRUGGNER, R.V.; BIRNEY, E.; COLLINS, F.H. Update of the

Anopheles gambiae PEST genome assembly. *Genome Biology*, v. 8, Artigo R5, p. 1-13, 2007.

SINGH, R.; GREEN, M.R. *Science*. n.259, p.365, 1993.

RAFAEL, M.S.; TADEI, W.P.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Ribosomal genes location in chromosomes of *Anopheles darlingi* and *A. nuneztovari* (Diptera: Culicidae), Amazônia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. n. 98, p. 629-635, 2003.

RAFAEL, M.S.; NUNES-SILVA, C.G.; ASTOLFI-FILHO, S.; TADEI, W.P. Biblioteca de cDNA DE *Anopheles darlingi* (Diptera; Culicidae). In: 51o Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia, SP. 51o Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia-SP: Zeppelini Editorial & Comunicação. v. CD. p. 145-145, 2005.

RAFAEL, M.S.; NUNES-SILVA, C.G.; AZEVEDO JUNIOR, G.M.; GUIMARÃES, G.M.; BRIDI, L.C.; ASSUÇÃO, E.N.; ASTOLFI-FILHO, S.; TADEI, W.P. 2008. Banco de Genes Expressos de *Anopheles darlingi* adulto (Diptera; Culicidae), Coari, Amazonas. In: 54o Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador. 54o Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto : Editora da SBG.

REDE EPIDEMIOLÓGICA GENÔMICA DE MALÁRIA. A Global network for investigating the genomic epidemiology of malaria. *Nature*, n. 456, v.11, p.732-738, 2008.

ROSA-FREITAS, M.G; BROOMFIELD, G.; PRIESTMANN, A.; MILLIGAN, P.; MOMEN, H.; MOLYNEUX, D.H. Studies on cuticular components, isoenzymes and behaviour of 3 populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*. n. 8, p. 357-366, 1992.

SALAZAR, C.E.; HAMM, D.M.; WESSON, D.M.; BEARD, C.B.; KUMAR, K.; COLLINS, F.H. A cytoskeletal actin gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*. v. 1, n.3, p. 1 – 13, 1994.

SANTOS, J.M.M.; CONTEL, E.P.B.; KERR, W.E. Biology of Amazonian Mosquitoes. III. Esterase Isozymes in *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root. *Acta Amazonica*, n. 15, p. 167-177, 1985.

SANTOS, J.M.M; LOBO, J.A; TADEI, W.P.; CONTEL, E.P.B. Intrapopulational genetic differentiation in *Anopheles (N.) darlingi* Rot, 1926 (Diptera: Culicidae) in the Amazon region. *Genetic Molecular Biology*, n. 22, p. 325-331, 1999.

SATTLER, J.M.; GANTER, M.; HLISCS, M.; MATUSCHEWSKI, K.; SCHÜLER, H. Actin regulation in the malaria parasite. *European Journal of Cell Biologic (IN PRESS)*. [Epub ahead of print] PMID: 21256619 [PubMed - as supplied by publisher]. Jan 2011.

SAWA, A.; KHAN, A.A.; HESTER, L.D.; SNYDER, S.H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. USA. n. 94, 1997.

SCARPASSA, V.M. and CONN, J.E. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102: 319-327, 2007.

SERVICE, M.W. Medical Entomology. First Edition. London: Chapman & Hall, 1996.

- SCHEURLE D, D.E.; YOUNG M.P.; BINNINGER, D.M.; PAGE, H.; JAHANZEB, M.; NARAYANAN, R. Cancer gene discovery using digital differential display. *Cancer Res*, n.15, v.60, p.4037-43. 2000
- SCHEZNOV, G.; LLOYD, C.; GUNNING, P. High level expression of transfected beta- and gamma-actin genes differentially impacts myoblast morphology. *Journal Cell Biologic.* n. 117, p. 775, 1992.
- SCHULER, G.D. Sequence mapping by electronic PCR. *Genome Res.*, n. 7, v. 5, p. 541-50, 1997.
- SIM, C.; HONG, Y.S.; VANLANDINGHAM, D.L.; HARKER, B.W.; CHRISTOPHIDES, G.K.; KAFATOS, F.C.; HIGGS, S.; COLLINS, F.H. Modulation of *Anopheles gambiae* gene expression in response to o'nyong-nyong virus infection. *Insect Molecular Biologic.*, n. 14, v. 5, p. 475-481, 2005.
- SIMARD. First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, n. 75, v. 5, p. 795-797, 2006.
- SINGER, R.H. The cytoskeleton and mRNA localization. *Current Opinion in Cell Biology.* n.4, p.15, 1992.
- TADEI, W.P. Biologia de Anofelinos Amazônicos. XVIII. Considerações sobre as espécies de *Anopheles* (Culicidae), transmissão e controle da malária na Amazônia. Ver. U.A. Série: *Ciências da Saúde*, v.2, n. 1-2, p.1-34, jan/dez /1993.
- TADEI, W.P.; DUTARY-THATCHER, B.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES, I.B.; RAFAEL, M.S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, n. 59, p. 325-335, 1998.
- TADEI, W.P.; DUTARY -THATCHER, B.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES, I.B.; RAFAEL, M.S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, n. 59, p.325-335, 1998.
- TADEI, W.P., DUTARY-THATCHER, B. Malaria vectors in the brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical.*, v.42, n2, p. 87-94, 2000.
- TADEI, W.P. ; RODRIGUES, I.B. ; SANTOS, J.M.M.; RAFAEL, M.S. ; PASSOS, R.A.; COSTA, F.M. ; PINTO, R.C.; OLIVEIRA, A.E.M. O papel da entomologia no controle da malária. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p. 22-26, 2007.
- TISDALE, E.J. *Journal of Biological Chemistry.* n. 276, p. 24-80, 2001.
- TRISTAN, C.; SHAHANI, N.; SEDLAK, T.W.; SAWA, A. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. *Elsevier - Cellular Signalling.* n.23, p. 317-323, 2011.
- VYAZUNOVA, I. and LAN, Q. Stage-specific expression of two actin genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology.* v. 3, n. 13, p. 241-249, 2004.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2005. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, p. 294, Geneva: Switzerland, 2005.

ZAFAR, R.S. and SODJA, A. Homology in the actin coding and adjacent sequences in two widely divergent species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. n.111, p. 67–73, 1983.

ZAR, J.K. Biostatistical analysis. 2ed., p. 718. Prentice-Hall, New Jersey, 1984.

ZIMMERMAN, R.H. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. n.87, p. 371-383, 1992.

ZHENG, L.; ROEDER, R.G.; LUO, Y.S. phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell*. n.114, v.2, p. 255-66, 2003.

Ketlen Nunes